



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών
Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή βιομάζας βασιδιομυκήτων σε
βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου και απομόνωση
βιοδραστικών ουσιών



Ειρήνη Βαρδάκα

Επιβλέπων: Επ. Καθηγητής Ευάγγελος Τόπακας

ΑΘΗΝΑ 2016

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο καθηγητή κ. Ευάγγελο Τόπακα για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγησή του, την επιστημονική υποστήριξη, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Ζέρβα για την βοήθεια και τη συνεισφορά της σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, αλλά και όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη βοήθειά τους στα ζητήματα που προέκυψαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων μου.

Ειρήνη Βαρδάκα

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Μακρομύκητες	11
1.1.1 Ορισμός και Μορφολογία	11
1.1.2 Διατροφική αξία	12
1.1.3 Φαρμακευτική αξία	18
1.1.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές	19
1.2 Γλυκάνες.....	19
1.2.1 Γλυκάνες στους Βασιδιομύκητες – Ορισμός και Βιολογικός ρόλος.....	19
1.2.2 Απομόνωση β-γλυκανών	21
1.2.3 Άλλες πηγές β-γλυκανών.....	22
1.2.4 Βιομηχανικές εφαρμογές	23
1.3 Μελετώμενα είδη μακρομυκήτων	24
1.4 Καλλιέργεια μακρομυκήτων	26
1.4.1 Ζύμωση Στερεάς Κατάστασης (ΖΣΚ).....	27
1.4.2 Ζύμωση Υγρής Κατάστασης (ΖΥΚ)	27
1.5 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ/Olive-mill wastewater - OMWW)	30
1.5.1 Μέθοδοι παραγωγής ελαιολάδου και Απόβλητα.....	30
1.5.2 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ)	33
1.5.3 Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ	35
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
2.1 Μακρομύκητες	41
2.2 Χημικά Αντιδραστήρια	41
2.3 Εργαστηριακά σκεύη.....	41
2.4 Όργανα	42
2.5 Επεξεργασία κατσίγαρου.....	42
2.6 Στερεές καλλιέργειες στελεχών βασιδιομυκήτων	43
2.7 Υγρές προκαλλιέργειες βασιδιομυκήτων	43
2.8 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας	44
2.8.1 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη	44
2.8.2 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο	46

2.9 Παραλαβή βιομάζας και εξωκυτταρικού υγρού στο τέλος της καλλιέργειας	47
2.9.1 Παραλαβή και συμπύκνωση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας.....	48
2.9.2 Παραλαβή βιομάζας.....	49
2.10 Χημική ανάλυση.....	49
2.10.1 Προσδιορισμός των εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια με τη χρωματομετρική μέθοδο του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος (DNS).....	50
2.10.2 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου στην καλλιέργεια με τη χρωματομετρική μέθοδο του Folin-Ciocalteu	51
2.10.3 Προσδιορισμός του αποχρωματισμού της καλλιέργειας.....	51
2.10.4 Προσδιορισμός γλυκανών	52
2.10.5 Απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS).....	55
2.10.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας.....	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
3.1 <i>Ganoderma lucidum</i> 9720	59
3.1.1 Υγρές προκαλλιέργειες.....	59
3.1.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης.....	59
3.1.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου	61
3.1.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS).....	64
3.1.5 Προσδιορισμός γλυκανών	65
3.1.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας.....	65
3.1.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωση τους από τη βιομάζα	66
3.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> 1123.....	67
3.2.1 Υγρές προκαλλιέργειες.....	67
3.2.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης.....	67
3.2.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου	69
3.2.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS).....	71
3.2.5 Προσδιορισμός γλυκανών	71
3.2.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας.....	72
3.2.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωσή τους από τη βιομάζα	73
3.3 <i>Pleurotus citrinopileatus</i> 28684	74
3.3.1 Υγρές προκαλλιέργειες.....	74
3.3.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης.....	74
3.3.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου	76
3.3.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS).....	79
3.3.5 Προσδιορισμός γλυκανών	79

3.3.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας.....	80
3.3.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωση τους από τη βιομάζα	80
3.4 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων	82
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	83
4.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	83
4.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	85
4.3 <i>Pleurotus citrinopileatus</i>	86
4.4 Μελλοντικοί στόχοι.....	87
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στην ανάπτυξη τριών στελεχών Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με σκοπό την απομόνωση βιοδραστικών ουσιών και ιδιαίτερα των β-γλυκανών. Τα μελετούμενα στελέχη, *Ganoderma lucidum* 9720, *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Pleurotus citrinopileatus* 28684, αναπτύχθηκαν σε καθορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης και υγρού αποβλήτου ελαιουργείου, τον κασίγαρο.

Η καλλιέργεια στον βιοαντιδραστήρα διήρκησε 4-7 ημέρες, ανάλογα με το στέλεχος που βρισκόταν υπό μελέτη, με ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού, θερμοκρασίας, pH, υπό συνεχή ανάδευση. Το εμβόλιο του βιοαντιδραστήρα ήταν πλήρως ανεπτυγμένες υγρές προκαλλιέργειες, οι οποίες είχαν διάρκεια καλλιέργειας 10-33 ημέρες, ανάλογα με το μελετούμενο στέλεχος.

Η καλλιέργεια του *G. lucidum* στο υπόστρωμα του κασίγαρου είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερης μυκηλιακής βιομάζας σε σχέση με το θρεπτικό της ξυλόζης. Επίσης, σημείωσε την καλύτερη επίδοση στην αποτοξικοποίηση του αποβλήτου, δηλαδή στη μείωση των φαινολικών ενώσεων, και συντέλεσε στο μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού, σε σχέση με τα υπόλοιπα μελετούμενα στελέχη. Το *P. ostreatus* είχε τη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, τόσο στο υπόστρωμα της ξυλόζης, όσο και στο κασίγαρο, στον οποίο παρουσίασε αυξημένη μυκηλιακή παραγωγή, σε σχέση με την ξυλόζη. Ακόμα, η μεγαλύτερη ποσότητα εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) απομονώθηκε στην καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο υπόστρωμα της ξυλόζης. Όσον αφορά το *P. citrinopileatus*, δεν αναπτύχθηκε το ίδιο καλά με τα υπόλοιπα στελέχη στο θρεπτικό υπόστρωμα του κασίγαρου ούτε συνέβαλε στην αποτοξικοποίησή του. Στο θρεπτικό της ξυλόζης, ωστόσο, είχε τη δεύτερη καλύτερη επίδοση, με μικρή διαφορά, στην παραγωγή βιομάζας μετά το *P. ostreatus*.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η περιεκτικότητα των ολικών, των α- και β- γλυκανών στη βιομάζα και στα EPS που παράχθηκαν από το βιοαντιδραστήρα με τα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Η βιομάζα του *G. lucidum* είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες στα υποστρώματα ξυλόζης/κασίγαρου, ενώ σε γενικές γραμμές, σε όλα τα δείγματα βιομάζας και EPS, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα της ξυλόζης. Εξαίρεση αποτέλεσαν η βιομάζα του *P. ostreatus* και τα EPS του *P. citrinopileatus*, που σημείωσαν υψηλότερη περιεκτικότητα στο υπόστρωμα του κασίγαρου.

Τέλος, ακολούθησε η απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας με τις μεθοδολογίες των Song et al. (2008) και Synytsya et al. (2009) και ο προσδιορισμός των περιεχόμενων γλυκανών στα καθαρά κλάσματα. Με τη διαδικασία αυτή μάλιστα, δόθηκε η ευκαιρία για μία άμεση σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων απομόνωσης

γλυκανών, καθώς στη βιομάζα του *G. lucidum* πραγματοποιήθηκε η μεθοδολογία των Synytsya et al. (2009), στο *P. ostreatus* ο Song et al. (2008) και στο *P. citrinopileatus* και οι δύο μεθοδολογίες, αποκλειστικά όμως στο θρεπτικό υπόστρωμα της ξυλόζης.

Διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό ανάκτησης των αρχικών γλυκανών στο τελικό, καθαρό προϊόν του *G. lucidum* ήταν πολύ μικρό στις περιπτώσεις και των δύο εξεταζόμενων υποστρωμάτων, ενώ το κλάσμα της μεθοδολογίας που λειτουργεί ως δείκτης της απόδοσης (δεν αναμένεται συγκέντρωση γλυκανών) είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες. Η απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας του *P. ostreatus*, ωστόσο, αποδείχτηκε περισσότερο αποδοτική, καθώς το καθαρό προϊόν της βιομάζας που αναπτύχθηκε σε ξυλόζη είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα γλυκανών, κατά 94%, από την ακατέργαστη βιομάζα. Αντίστοιχα καλά αποτελέσματα μετρήθηκαν και στην περίπτωση του υποστρώματος του κατσίγαρου, όπου η αύξηση των περιεχόμενων γλυκανών είχε ποσοστό 81,2%. Οι μικρές ποσότητες προϊόντων από την απομόνωση γλυκανών στη βιομάζα του *P. citrinopileatus* δεν επέτρεψαν τη μέτρηση των γλυκανών για την περεταίρω αξιολόγηση των δύο μεθοδολογιών.

ABSTRACT

The present thesis focused on the development of three Basidiomycetes strains in a batch bioreactor, in order to isolate bioactive substances, particularly β -glucans. The strains studied in this research, *Ganoderma lucidum* 9720, *Pleurotus ostreatus* 1123 and *Pleurotus citrinopileatus* 28684, grown in a defined xylose medium and in olive mill wastewater (OMWW).

The culture in the bioreactor lasted 4-7 days, depending on the strain under study, with controlled aeration, temperature, pH, under constant stirring. The bioreactor inoculum was fully developed in liquid precultures that lasted 10-33 days, depending on the studied strain.

Cultivation of *G. lucidum* in OMWW substrate resulted in the production of more mycelial biomass compared with the xylose substrate. Also, it showed the best performance in the detoxification of the waste, namely the reduction of phenolic compounds, and contributed to higher decolourization rate, compared with the other strains studied. *P. ostreatus* had higher biomass production, when cultivated in the xylose substrate, as well as in the OMWW, which showed increased production of mycelial biomass compared to xylose. Furthermore, most of the extracellular polysaccharides (EPS) were isolated in the culture of *P. ostreatus* xylose substrate. *P. citrinopileatus*, on the other hand, did not grow as well as the other strains on the OMWW medium, neither contributed to the detoxification of the waste. In xylose substrate, however, it had the second best performance, with little difference in biomass production compared to *P. ostreatus*.

Moreover, the content of total, α - and β -glucans was measured in biomass and EPS produced by the bioreactor in xylose/OMWW substrate. The biomass of *G. lucidum* had higher total glucan content in both substrates. Generally, in all samples of biomass and EPS, the higher glucan content was reached in the xylose substrate. The exceptions, however, were the biomass of *P. ostreatus* and the EPS of *P. citrinopileatus*, which showed higher content of glucans in OMWW substrate.

Finally, the isolation of glucans of the biomass followed by the methodologies of Song et al. (2008) and Synytsya et al. (2009) was performed, in order to define the glucans contained in the partially purified fractions. With this process, we were given the opportunity for a direct comparison between the two methods of glucan isolation. The biomass of *G. lucidum* was treated according to the methodology by Synytsya et al. (2009), *P. ostreatus* by Song et al. (2008) and *P. citrinopileatus*'s biomass was treated following both methodologies, but exclusively on the xylose medium.

It was found that the recovery yield of the initial glucans in the final, partially purified product of *G. lucidum* was very small in the cases of both tested substrates, and the

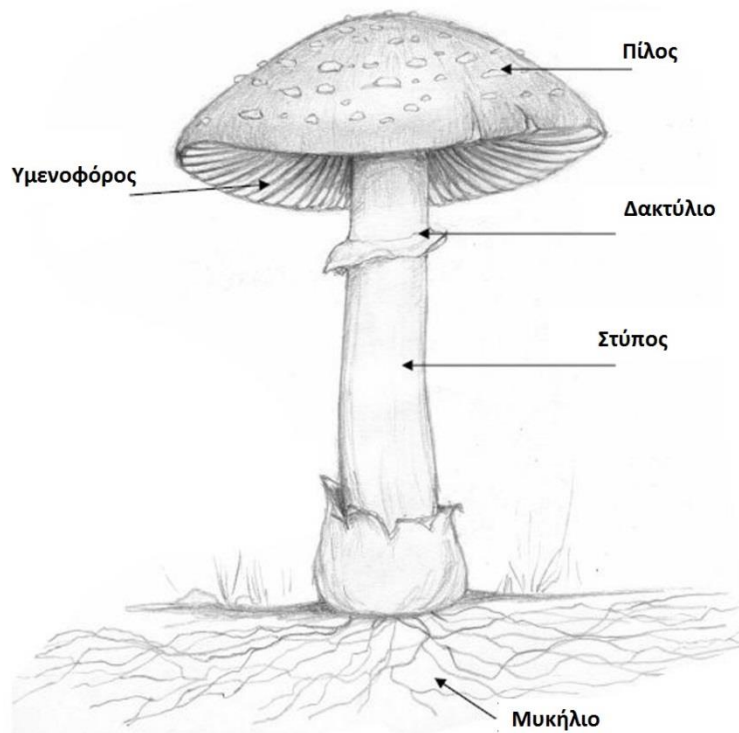
fraction resulted from the purification method that works as an indicator of performance (not expected to contain glucans) had a higher content of glucans. The isolation of glucans from *P. ostreatus*'s biomass, however, proved to be more effective, as the final product of the purification of the biomass grown on xylose had 94% more glycan content, compared to the crude biomass. Correspondingly good results were measured in the case of OMWW substrate, whereas the increase of the glucan content was 81.2%. Small amounts of purification products from *P. citrinopileatus* biomass did not allow the measurement of glucans for further evaluation of the two methodologies.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μακρομύκητες

1.1.1 Ορισμός και Μορφολογία

Μανιτάρια ορίζονται οι μακρομύκητες με διακριτά καρποσώματα που αναπτύσσονται υπέργεια ή υπόγεια (Chang & Miles, 1997). Τα καρποσώματα είναι ορατά με γυμνό μάτι, με μέγεθος από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και άνω του μισού μέτρου, και έχουν συνήθως μικρή διάρκεια ζωής. Σχηματίζονται κατά την εγγενή αναπαραγωγή των μακρομυκήτων και σκοπός τους είναι η παραγωγή σπορίων για τη διαίωσιση των ειδών. Το υπόλοιπο τμήμα του μακρομύκητα, που έχει μεγάλη διάρκεια ζωής, ονομάζεται μυκήλιο. Έχει τη μορφή ενός τριχόμορφου, αραχνοειδούς ιστού και συναντάται κάτω από το έδαφος και σε νεκρούς ή ζωντανούς κορμούς δέντρων.



Σχήμα 1.1.1: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός μακρομύκητα

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

είναι δηλητηριώδη είναι αρκετά μεγάλος, περίπου 10%, εκ των οποίων περίπου 30 είδη θεωρούνται θανατηφόρα.

Τα μανιτάρια και οι μύκητες σε γενικές γραμμές στερούνται χλωροφύλλης και δεν μπορούν να συνθέσουν την τροφή τους με τη βοήθεια της ενέργειας του ήλιου χρησιμοποιώντας απλά ανόργανα υλικά, όπως νερό, διοξείδιο του άνθρακα και τα νιτρικά άλατα, όπως συμβαίνει με τα πράσινα φυτά. Αντλούν την τροφή τους από οργανικά υλικά που βρίσκονται σε νεκρούς ή ζωντανούς ιστούς των φυτών και των ζώων. Εκείνοι που λαμβάνουν την τροφή από νεκρή οργανική ύλη, π.χ., από υπολείμματα γεωργικής καλλιέργειας, το ξύλο των νεκρών δέντρων, την κοπριά των ζώων κ.λπ., αναφέρονται ως σαπροφυτικοί μύκητες. Εκείνοι που απορροφούν θρεπτικές ουσίες από ζωντανούς οργανισμούς (φυτά και ζώα) και προκαλούν βλάβη στους ξενιστές τους ονομάζονται παρασιτικοί μύκητες. Υπάρχουν επίσης μερικοί μύκητες που ζουν κοντά στα φυτά ξενιστές τους και τα ζώα (π.χ., εκείνες που ζουν μέσα σε φωλιές των τερμιτών ή μανιτάρια που ζουν σε συνδυασμό με τις ρίζες κάποιων χόρτων ή δέντρων, όπως πεύκα) έχοντας μια ειδικού τύπου εταιρική σχέση, σύμφωνα με την οποία κάθε εταίρος έχει κάποια ζωτικής σημασίας οφέλη από τον άλλον. Αυτοί αναφέρονται ως συμβιωτικοί μύκητες.

1.1.2 Διατροφική αξία

Πρωτεΐνες

Οι μακρομύκητες περιέχουν συνήθως 19 με 35 % πρωτεΐνη σε βάση ξηρού βάρους. Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη των εδώδιμων μανιταριών είναι περίπου διπλάσια από αυτή των σπαραγγιών και του λάχανου, ενώ είναι 4 και 12 φορές μεγαλύτερη από αυτή των πορτοκαλιών και των μήλων αντίστοιχα.

Η κατανομή των πρωτεϊνών στο καρπόσωμα και οι αλλαγές στην περιεκτικότητα πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του παραμένουν ως επί το πλείστον ασαφείς. Οι Vetter & Rimóczy (1993) ανέφεραν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη, σε καλλιεργούμενο *Pleurotus ostreatus* με πύλο διαμέτρου 5-8 cm. Σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης, το περιεχόμενο της ακατέργαστης πρωτεΐνης ήταν 36,4 % και 11,8 % στο πύλο και στον στύπο αντίστοιχα. Στην συνέχεια της ανάπτυξης, η περιεκτικότητα ακατέργαστης πρωτεΐνης μειώθηκε.

Απαραίτητα αμινοξέα

Η εκτίμηση της ακατέργαστης πρωτεΐνης είναι μια έμμεση ανάλυση για το σύνολο των αμινοξέων, καθώς επηρεάζεται από τα ποικίλα επίπεδα μη πρωτεϊνικού αζώτου στο δείγμα. Συνεπώς, ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών αμινοξέων που υπάρχουν μετά την όξινη υδρόλυση δίνει αναμφίβολα μια πιο ακριβή αξιολόγηση. Συνολικά, υπάρχουν εννέα απαραίτητα αμινοξέα (λυσίνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη,

θρεονίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, ιστιδίνη, και φαινυλαλανίνη), τα οποία πρέπει να είναι παρόντα ταυτόχρονα και σε σωστή σχετική αναλογία για είναι δυνατή η σύνθεση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες των κοινών καλλιεργούμενων μανιταριών περιέχουν όλα τα εννέα απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο.

Στον πίνακα 1.1.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές των απαραίτητων αμινοξέων σε διάφορα είδη μακρομυκητών σε g αμινοξέων ανά 100 g διορθωμένης ακατέργαστης πρωτεΐνης.

Πίνακας 1.1.1: Περιεκτικότητα αμινοξέων (g αμινοξέων/100 g διορθωμένης ακατέργαστης πρωτεΐνης) (Chang & Miles, 2004)

Amino Acids	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus florida</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Volvariella diplasia</i>	<i>Volvariella volvacea</i>	Hen's Egg ^a
Leucine	7.5	7.9	7.5	6.8	7.0	5.0	4.5	8.8
Isoleucine	4.5	4.9	5.2	4.2	4.4	7.8	3.4	6.6
Valine	2.5	3.7	6.9	5.1	5.3	9.7	5.4	7.3
Tryptophan	2.0	nd	1.1	1.3	1.2	1.5	1.5	1.6
Lysine	9.1	3.9	9.9	4.5	5.7	6.1	7.1	6.4
Threonine	5.5	5.9	6.1	4.6	5.0	6.0	3.5	5.1
Phenylalanine	4.2	5.9	3.5	3.7	5.0	7.0	2.6	5.8
Methionine	0.9	1.9	3.0	1.5	1.8	1.2	1.1	3.1
Histidine	2.7	1.9	2.8	1.7	2.2	4.2	3.8	2.4
Total essential amino acids ^b	38.9	36.0	46.0	33.4	37.6	48.5	32.9	47.1

Note: Data presented as grams of amino acids per 100 grams of corrected crude protein. nd = not determined.

Sources: Data from Bano, Z. and Rajarathnam, S., in *Tropical Mushrooms – Biological Nature and Cultivation Methods*, Chinese University Press, Hong Kong, 363–380, 1982; and Li, G.S.F. and Chang, S.T., in *Tropical Mushrooms – Biological Nature and Cultivation Methods*, Chinese University Press, Hong Kong, 199–219, 1982.

^a For comparison.

^b Excluding arginine and cystine.

Λίπος

Η περιεκτικότητα σε λίπος σε διάφορα είδη μανιταριών κυμαίνεται από 1,1 έως 8,3% σε βάση ξηρού βάρους, με μέση περιεκτικότητα το 4,0 %. Γενικά, το ακατέργαστο λίπος των μανιταριών αποτελείται από όλες τις τάξεις των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων λιπαρών οξέων, των μονογλυκεριδίων, των διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων, των στερολών και των εστέρων στερολών, καθώς και των φωσfolιπιδίων. Τουλάχιστον το 72% του συνόλου των λιπαρών οξέων που έχουν βρεθεί στους μακρομυκητες είναι ακόρεστα. Το υψηλό αυτό ποσοστό, που οφείλεται κυρίως στην υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ, είναι επιθυμητό για τον χαρακτηρισμό των μανιταριών ως τρόφιμο μεγάλης θρεπτικής αξίας.

Κατά την φάση της καρποφορίας, έχει αναφερθεί εξάρτηση της σύνθεσης λιπαρών οξέων από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε καλλιεργούμενα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*, σε θερμοκρασίες ανάπτυξης κάτω από 17 °C, παρατηρήθηκε αύξηση του περιεχομένου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα σε σχέση με μανιτάρια που παρήχθησαν σε θερμοκρασίες πάνω από 17 °C (Pedneault et al., 2007).

Βιταμίνες

Τα εδώδιμα μανιτάρια είναι μια καλή πηγή βιταμινών, συμπεριλαμβανομένων των θειαμίνη (Βιταμίνη B₁), ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B₂), νιασίνη, βιοτίνη, και του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Επίσης, έχει αναθεωρηθεί η παρουσία στερολών σε μύκητες από Weete & Weber (1980), οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη D με υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, η γ-εργοστερόλη που είναι η προβιταμίνη - D₂, είναι η κοινή στερόλη που βρέθηκε στους Βασιδιομύκητες, με περιεκτικότητα 0,35% σε ξηρή βάση στον μακρομύκητα *Volvariella volvacea*. Η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε γ-εργοστερόλη θα μπορούσε να έχει σημασία για άτομα με περιορισμένη πρόσληψη βιταμίνης D₂ από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, π.χ. για χορτοφάγους.

Υδατάνθρακες

Η περιεκτικότητα των υδατανθράκων στα μανιτάρια, με την παρουσία κυρίως των πολυσακχαριτών, κυμαίνεται 50-90% σε ξηρό βάρος. Η γλυκόζη και η τρεχαλόζη είναι ο βασικότεροι από τους μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες, αντίστοιχα. Η περιεχόμενη γλυκόζη και τρεχαλόζη είναι συνήθως μικρή, της τάξης του g/100 g ξηρής ουσίας. Το περιεχόμενο σε μανιτόλη, που είναι παράγωγο της γλυκόζης και είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του όγκου και της σταθερότητας του καρποσώματος διαφέρει ανάμεσα στα είδη. Ενδεικτικά, βρέθηκε 1,0%, 6,5% και 13,7% σε ξηρό βάρος στα *T. portentosum*, *A. arvensis* και *L. deliciosus*, αντίστοιχα (Barros et al. 2007).

Ο κύριος αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης είναι το γλυκογόνο, με κύριο περιεχόμενο 5-10% σε ξηρό βάρος, ενώ η χιτίνη, ένας μη υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης, αποτελεί το 80-90% του ξηρού βάρους των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Διαιτητικές ίνες

Σύμφωνα με τον Αμερικανικό Σύλλογο Χημικών των Δημητριακών (American Association of Cereal Chemists –AACC), οι διαιτητικές ίνες (dietary fiber - DF) είναι το βρώσιμο μέρος των φυτών ή ανάλογοι υδατάνθρακες που είναι ανθεκτικοί στην πέψη και την απορρόφηση από το λεπτό έντερο του ανθρώπου και έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία, όπως τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης και χοληστερόλης στο αίμα και την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας (Retsetnikov et al. 2001, Cheung 2008, Wasser et al. 2002, Zhang et al. 2007). Μειώνουν, επίσης, το κίνδυνο του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς μειώνουν την απορρόφηση τοξικών και καρκινογόνων ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, διαιτητικές ίνες είναι τα πολυμερή υδατανθράκων με δέκα ή περισσότερα μονομερή, τα οποία δεν υδρολύονται από τα ενδογενή ένζυμα των ανθρώπων.

Οι μακρομύκητες θεωρούνται ως καλή πηγή διαιτητικών ινών, κυρίως λόγω των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, τα οποία περιέχουν ινώδη συστατικά που περιλαμβάνουν χιτίνη (ευθείας αλυσίδα β - (1 → 4) συνδεδεμένο πολυμερές της N-

ακετυλο- γλυκοζαμίνης) και πολυσακχαρίτες όπως β -D-(1 \rightarrow 3) γλυκάνες και μαννάνες. Αυτά τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος είναι Μη Εύπεπτοι Υδατάνθρακες (non-digestible carbohydrates -NDCs) και είναι ανθεκτικοί σε ανθρώπινα ένζυμα, άρα μπορούν να θεωρηθούν ως πηγή διαιτητικών ινών. NDC θεωρείται επίσης και ο ολιγοσακχαρίτης τρεχαλόζη, που υπάρχει σε αφθονία στους μακρομύκητες. Οι διαιτητικές ίνες χωρίζονται σε υδατοδιαλυτές (water-soluble fiber-SDF) και μη υδατοδιαλυτές (water-insoluble fiber-IDF), όπως η χιτίνη και οι β -γλυκάνες, οι οποίες είναι σε ποσοστό έως και 90% τους ξηρούς βάρους. Στον πίνακα 1.1.2 φαίνονται οι περιεκτικότητες σε IDF και SDF % σε ξηρό βάρος σε διάφορα καλλιεργημένα μανιτάρια.

Πίνακας 1.1.2: Ποσοστό IDF και SDF (% σε ξηρό βάρος) σε καλλιεργημένους μακρομύκητες (Cheung, 2013)

Mushroom species	TDF (%)	IDF (%)	SDF (%)
<i>Aa</i>	26.7 \pm 1.51	26.2 \pm 1.29	0.51 \pm 0.22
<i>Ab</i>	29.6 \pm 3.52	27.6 \pm 2.29	1.93 \pm 1.24
<i>Ac</i>	36.4 \pm 1.01	34.9 \pm 0.95	1.52 \pm 1.53
<i>Cc</i>	34.6 \pm 5.28	32.8 \pm 4.20	1.79 \pm 1.13
<i>Fv</i>	38.2 \pm 2.77	33.8 \pm 1.93	4.42 \pm 0.99
<i>Gf</i>	44.0 \pm 1.55	43.1 \pm 1.43	0.91 \pm 0.13
<i>He</i>	34.0 \pm 0.98	31.8 \pm 0.56	2.12 \pm 0.42
<i>Hm</i>	32.0 \pm 1.35	30.1 \pm 1.60	1.89 \pm 0.26
<i>Hr</i>	26.9 \pm 0.84	23.6 \pm 0.29	3.25 \pm 0.93
<i>Lg</i>	34.8 \pm 0.53	34.3 \pm 0.76	0.50 \pm 0.26
<i>Pa</i>	30.8 \pm 0.48	27.7 \pm 0.67	3.08 \pm 0.20
<i>Pn</i>	37.9 \pm 0.79	34.8 \pm 0.77	3.15 \pm 0.11
<i>Sra</i>	28.4 \pm 0.91	26.2 \pm 0.80	2.26 \pm 0.31

Agrocybe aegerita (*Aa*); *Agaricus blazei* (*Ab*); *Agrocybe chaxinggu* (*Ac*); *Coprinus comatus* (*Cc*); *Flammulina velutipes* (*Fv*); *Grifola frondosa* (*Gf*); *Hericiium erinaceus* (*He*); *Hypsizigus marmoreus* (*Hm*); *Hericiium ramosum* (*Hr*); *Lentinus giganteus* (*Lg*); *Pholiota adiposa* (*Pa*); *Pholiota namkeo* (*Pn*); *Stropharia rugoso-annulata* (*Sra*). Modified from Ref. [22].

Μια ακόμα πηγή διαιτητικών ινών, όπως έχει προκύψει από έρευνες (Duboundieu et al. 1981, Backhouse & Willetts 1984, Cheung & Lee, 2000) είναι το σκληρώτιο, δηλαδή η μυκηλιακή δομή που αναπτύσσουν ορισμένα μανιτάρια κάτω από δυσμενείς συνθήκες, ενώ περιμένουν κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για την ανάπτυξη των καρποσωμάτων. Τα κυτταρικά τοιχώματα του σκληρωτίου αποτελούνται από χιτίνη και β -γλυκάνες με β -(1 \rightarrow 3) σκελετό και β -(1 \rightarrow 6) συνδεδεμένες αλυσίδες. Στο σκληρώτιο του *P. tuber-regium*, οι IDF αποτελούν το 80% του ξηρού βάρους, ενώ οι SDF το 2,5 % του ξηρού βάρους. (Wong & Cheung, 2005).

Γλυκάνες

Οι μακρομύκητες είναι σημαντική πηγή πολυσακχαριτών με αντικαρκινικές και ανοσοποιητικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες είναι συνήθως παρόντες ως γλυκάνες ευθείς ή διακλαδισμένης αλυσίδας με διαφορετικούς τύπους γλυκοζιδικών δεσμών, όπως οι β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) γλυκάνες και οι α -(1 \rightarrow 3) γλυκάνες (Wasser 2002).

Περισσότερα στοιχεία για τη δομή, την εξαγωγή, τη χρησιμότητα και τις βιομηχανικές εφαρμογές των β- γλυκανών αναφέρονται στο κεφάλαιο 1.2.

Μεταλλικά στοιχεία

- Τέφρα

Η περιεκτικότητα σε τέφρα είναι συνήθως 5-12 % επί ξηρού βάρους. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τιμές περιεκτικότητας τέφρας (% σε ξηρό βάρος) ορισμένων μανιταριών.

Πίνακας 1.1.3: Περιεκτικότητα τέφρας διάφορων μανιταριών (% σε ξηρό βάρος) (Kalac, 2008)

Species	Ash
<i>Agaricus arvensis</i>	3.5
<i>Amanita rubescens</i>	10.0
	4.6
<i>Armillariella mellea</i>	-
<i>Boletus edulis</i>	5.3
<i>Cantharellus cibarius</i>	11.5
<i>Lactarius deliciosus</i>	5.1
<i>Lepista nuda</i>	5.4
	6.0
	18.5
<i>Lycoperdon perlatum</i>	32.0
<i>Macrolepiota procera</i>	5.4
<i>Ramaria botrytis</i>	8.8
<i>Suillus granulatus</i>	5.2
<i>Tricholoma flavovirens</i>	-
<i>Tricholoma portentosum</i>	9.9
	11.7
<i>Tricholoma terreum</i>	12.1
Mixtures of dried <i>Boletus</i> spp. (eight samples)	5.7-8.2

- Κύρια μέταλλα

Τα μέταλλα που υπάρχουν στο υπόστρωμα λαμβάνονται από το αναπτυσσόμενο μυκήλιο και μετατοπίζεται προς το καρπόσωμα των μανιταριών. Όπως και στα ανώτερα φυτά, το μεταλλικό στοιχείο με την υψηλότερη περιεκτικότητα είναι το κάλιο (K), ακολουθούμενο από το φώσφορο (P), το νάτριο (Na), το ασβέστιο (Ca) και το μαγνήσιο (Mg).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα περιεχόμενα σε μεταλλικά στοιχεία σε άγρια μανιτάρια.

Πίνακας 1.1.4: Περιεκτικότητα μεταλλικών στοιχείων των άγριων μανιταριών (σε mg/kg ξηρού δείγματος) (Kalac, 2008)

Element	Usual content
Sodium	100–400
Potassium	20,000–40,000
Calcium	100–500
Magnesium	800–1800
Phosphorus	5000–10,000
Sulphur	1000–3000

Το κάλιο έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα, ωστόσο δεν κατανέμεται ομοιόμορφα μέσα στα καρποσώματα, καθώς η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη στον πύλο σε σχέση με τον στύπο. Επίσης, η συγκέντρωσή του είναι 20 με 40 φορές υψηλότερη στα κασποσώματα σε σχέση με τα υποκείμενα υποστρώματα.

Ιχνοστοιχεία

Τα κυριότερα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στους μακρομύκητες είναι το κάδμιο (Cd), ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb), ο ψευδάργυρος (Zn) και ο χαλκός (Cu). Τα επίπεδα αρκετών από τα ιχνοστοιχεία εκτιμώνται με τη βοήθεια αναλυτικών οργάνων, όπως AAS, ICP - OES και ICP –MS. Σύμφωνα με τους Kalac & Svoboda (2000), το περιεχόμενο σε Cd προσδιορίστηκε μεταξύ 0,5 και 5 mg/kg ξηρού βάρους σε 25 διαφορετικά ήδη μακρομυκήτων, ενώ αυτό του Cu ήταν μεταξύ 20 και 100 mg/kg ξηρού βάρους σε περιοχές χωρίς μόλυνση. Το περιεχόμενο Pb ήταν μεταξύ 1,0 και 10 mg/kg ξηρού βάρους σε 24 εξεταζόμενα είδη μακρομυκήτων μέχρι το 1999, ενώ έχει παρατηρηθεί μικρή μείωση έκτοτε. Ο Hg έχει τιμές από 0,5 έως 10 mg/kg ξηρού βάρους και ο Zn από 25 έως 200 mg/kg ξηρού βάρους.

Έχει παρατηρηθεί ότι το περιεχόμενο πολλών ιχνοστοιχείων, κυρίως του καδμίου και του υδραργύρου, αυξάνει στα μανιτάρια που βρίσκονται σε μολυσμένες περιοχές, σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από αγροτικές περιοχές. Για παράδειγμα, σημαντικά αυξημένη περιεκτικότητα σε κάδμιο και υδράργυρο προσδιορίστηκε στα *Agaricus maleolens* και *Agaricus arvensis* που αναπτύσσονται σε πόλεις (Svoboda & Kalac, 2003), όπως και σε περιοχές με μεταλλουργία χαλκού και υδραργύρου για πολλά είδη μανιταριών. (Svoboda, Zimmermannova, & Kalac, 2000)

Τα περισσότερα ιχνοστοιχεία διανέμονται άνισα στα καρποσώματα. Συνήθως τα υψηλότερα περιεχόμενα παρατηρούνται στο σημείο του πύλου όπου δημιουργούνται τα σπόρια (αλλά όχι στα σπόρια), ύστερα στο υπόλοιπο μέρος του πύλου και τέλος στον στύπο.

1.1.3 Φαρμακευτική αξία

Ολόκληρο το μέρος του μακρομύκητα (αλλά κυρίως τα καρποσώματα), τα εκχυλίσματα (καρποσωμάτων ή μυκηλίου, που παράγονται με την εκχύλιση των μακρομυκήτων με τους κατάλληλους διαλύτες) και οι ουσίες που έχουν απομονωθεί είναι κατάλληλα για την αξιοποίηση τους στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων με τη μορφή φαρμάκων ή συμπληρωμάτων διατροφής. Συγκεκριμένα, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, οι διαιτητικές ίνες και κυρίως οι β-γλυκάνες, οι φαινολικές ενώσεις και τοκοφερόλες, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως λειτουργικά συστατικά με δράση κατά των μικροβιακών μολύνσεων.

Οι κυριότερες βιολογικές και θεραπευτικές δράσεις των μακρομυκήτων είναι οι εξής: αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, ανοσοδιεγερτική, αντιφλεγμονώδη, υποχοληστεροναϊμική, αντιπεργλυκαιμική, ηπατοπροστατευτική, υπογλυκαιμική, καθώς και δράση κατά των ιών και της αγγειογένεσης.

Ο ακόλουθος Πίνακας υποδεικνύει τις φαρμακευτικές ιδιότητες διάφορων μακρομυκήτων και τις χημικές ενώσεις στις οποίες οφείλονται.

Πίνακας 1.1.5: Φαρμακευτικές ιδιότητες μακρομυκήτων (Chang & Miles, 1997)

Pharmacodynamic	Component	Species
1. Antibacterial effect	Hirsutic acid	Many species
2. Antibiotic	E-beta-methoxyacrylate	<i>Oudemansiella radicata</i>
3. Antiviral effect	Protein, Polysaccharide	<i>Lentinula edodes</i> and <i>Polyporaceae</i>
4. Cardiac tonic	Volvatoxin, Flammutoxin	<i>Volvariella</i>
5. Decrease cholesterol	Eritadenine	<i>Collybia velutipes</i>
6. Decrease level of blood sugar	Peptide glycogen, Ganoderan	<i>Ganoderma lucidum</i>
7. Decrease blood pressure	Triterpene	<i>Ganoderma lucidum</i>
8. Antithrombus	5'-AMP,5'-GMP	<i>Psalliota hortensis</i>
9. Inhibition of PHA	r-GHP	<i>Psalliota hortensis</i> and <i>Lentinula edodes</i>
10. Antitumor	Beta-glucan RNA-complex	Many species, <i>Hypsizygus marmoreus</i> (<i>Lyophyllum shimeji</i>)
11. Increase secretion of bile	Armillarisia A	<i>Armillariella tabescens</i>
12. Analgesic, Sedative effect	Marasmic acid	<i>Marasmius androsaceus</i>

Source: Pai, S.H., S.C. Jong, & D.W. Lo. Uses of mushrooms. *Bioindustry* 1:126-131. 1990.

1.1.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές

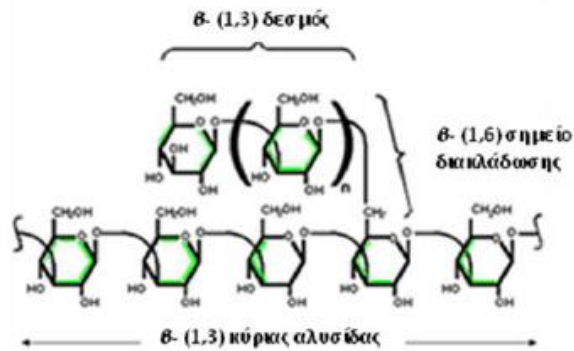
Σαφώς, ο τρόπος με τον οποίο οι μύκητες αποκτούν τα θρεπτικά συστατικά τους στη φύση, μπορεί να έχει αντίκτυπο στο πώς επιδιώκουμε να τους μεγαλώσουμε στους ζυμωτήρες και πώς μπορούμε αναβαθμίσουμε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των μεταβολιτών σε συστήματα υγρής καλλιέργειας, ώστε να προκύψουν οικονομικά βιώσιμες βιομηχανικές διεργασίες. Παρακάτω συνοψίζονται οι κυριότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μακρομυκήτων (Fazenda 2008):

- Παραγωγή μυκηλίων βρώσιμων μανιταριών για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση ως τροφή, ως γευστικούς παράγοντες και φυσικά αρωματικά.
- Παραγωγή τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση από τους μύκητες.
- Παραγωγή χημικών, όπως υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, ένζυμα, οργανικά οξέα και νουκλεοτίδια.
- Παραγωγή θεραπευτικών ενώσεων, όπως τα αντιβιοτικά, αντικαρκινικοί και αντιμυκητιασικοί παράγοντες και ελέγχου των αφλατοξινών.
- Εφαρμογή των διαδικασιών με στόχο την ανακύκλωση των βιομηχανικών και γεωργικών αποβλήτων.

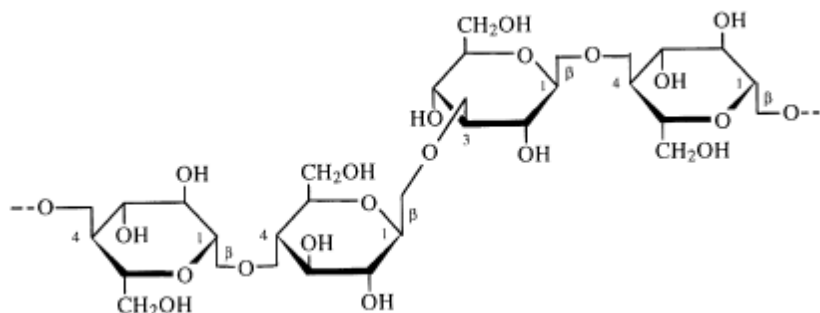
1.2 Γλυκάνες

1.2.1 Γλυκάνες στους Βασιδιομύκητες – Ορισμός και Βιολογικός ρόλος

Οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες ευθείας ή διακλαδισμένης αλυσίδας που έχουν ως μονομερές την γλυκόζη, η οποία ενώνεται συνήθως με β -(1 \rightarrow 3) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Έχουν προσδιοριστεί, επίσης, β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) ή β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), καθώς και α -(1 \rightarrow 3) γλυκοζιδικοί δεσμοί. Δεν έχουν βρεθεί β -(1 \rightarrow 3) ή β -(1 \rightarrow 6) γλυκάνες χωρίς διακλάδωση, ωστόσο η έκταση των διακλαδώσεων είναι σημαντικά διαφορετική ανάμεσα στα στελέχη Βασιδιομυκήτων. (Schmid et al. 2001)



Σχήμα 1.2.1: Βασική δομή των β-(1,3), (1,6) γλυκανών (Παπασπυρίδη 2011)



Σχήμα 1.2.2: Βασική δομή των β-(1,3), (1,4) γλυκανών (Rop 2009)

Περίπου η μισή μάζα του κυτταρικού τοιχώματος των μακρομυκήτων αποτελείται από β- γλυκάνες (Klis et al. 2001). Ακόμα, οι β- γλυκάνες βρίσκονται στα μυκήλια των μακρομυκήτων (ενδοπολυσακχαρίτες – Intracellular Polysaccharides-IPS) ενώ εκκρίνονται και στο μέσο καλλιέργειάς τους (εξωπολυσακχαρίτες - Exopolysaccharides-EPS). Έχουν βρεθεί επίσης στο σκληρώτιο, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% του ξηρού βάρους του (Wong & Cheung, 2008), ενώ όταν απομονώθηκαν από το *P. tuber-regium*, πέτυχαν την πρόκληση απόπτωσης των οξειών προμυελοκυτταρικών λευκαϊμικών κυττάρων (HL-60) (Wong et al. 2007). Οι β-γλυκάνες που απομακρύνονται από το κυτταρικό τοίχωμα δεν χρησιμοποιούνται ευρέως βιοτεχνολογικά, αφού η απομόνωση και ο καθαρισμός τους είναι πολύ πιο δύσκολος από τις β-γλυκάνες που βρίσκονται στο μέσο καλλιέργειας ή στα μυκήλια.

Οι β-γλυκάνες χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική, καθώς λειτουργούν αποτελεσματικά ως ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος και εμφανίζονται να επηρεάζουν θετικά περιπτώσεις καρκίνων και βακτηριακών λοιμώξεων. (Vetvicka & Yin 2004, Brown & Gordon 2005). Επίσης, βοηθούν στην ανάρρωση των ασθενών μετά τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία (Harada et al. 2002, Gu et al. 2005). Η ικανότητα των μυκητιακών β-γλυκανών να δρουν ως ανοσολογικοί ρυθμιστές στηρίζεται στον μηχανισμό δράσης τους, σύμφωνα με τον οποίο οι πολυσακχαρίτες προσδένονται σε υποδοχείς του κυττάρου, ώστε να ενεργοποιηθούν οι κατάλληλοι οδοί σήματος που προωθούν ανοσολογικές αποκρίσεις στα πληγέντα κύτταρα.

Η δομή των β-γλυκανών επηρεάζει την ενεργότητά τους. Αναμένεται υψηλότερη αποτελεσματικότητα από β-γλυκάνες μακρύτερης αλυσίδας, δηλαδή μεγαλύτερου μοριακού βάρους (MB=100,000-200,000), ενώ η ενεργότητα μικρότερων πολυσακχαριτών (MB= 5,000-10,000) που προέρχονται από τον ίδιο μακρομύκητα είναι σχεδόν μηδενική. (Blaschek et al. 1992, Fabre et al. 1984, Kojima et al. 1986) Επίσης, ο βαθμός της διακλάδωσης του πολυσακχαρίτη φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία. Έχει βρεθεί ότι οι γλυκάνες με βαθμό διακλάδωσης στην περιοχή 0,20-0,33 έχουν τη μεγαλύτερη ενεργότητα. Για παράδειγμα, η β-γλυκάνη που παράγεται από τον μύκητα *Lentinus edodes* έχει β-D-γλυκοπυρανοζυλικές μονάδες στο O6 της κύριας αλυσίδας γλυκόζης με βαθμό διακλάδωσης 0.33. Η διαλυτότητα των β-γλυκανών στο νερό, καθώς και η διαμόρφωσή τους σε τριπλές έλικες είναι δύο ακόμα ενδείξεις της ενεργότητάς τους (Goodridge et al. 2011, Lehtovaara & Gu 2011). Ενδεικτικά, στον πίνακα 1.2.1 παρουσιάζονται το περιεχόμενο των β- γλυκανών σε 4 στελέχη μακρομυκήτων και τα ποσοστά των υδατοδιαλυτών και μη υδατοδιαλυτών β-γλυκανών.

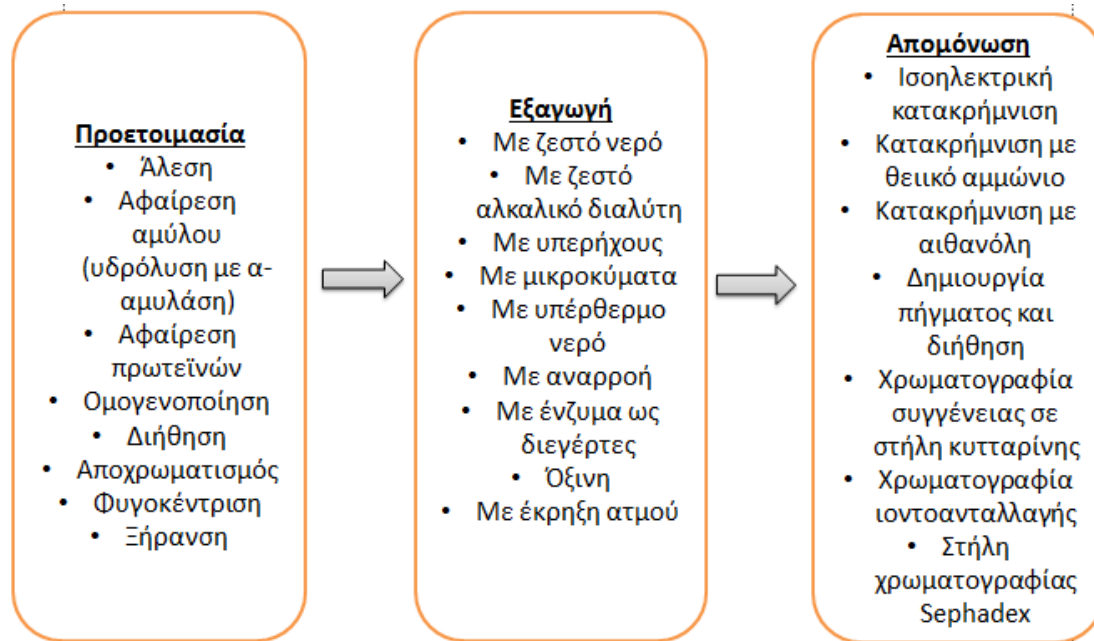
Πίνακας 1.2.1: Περιεχόμενη ποσότητα β-γλυκανών (σε mg 100/g ξηρής ουσίας) και ποσοστό υδατοδιαλυτών/μη- υδατοδιαλυτών β- γλυκανών (Rop et al. 2009)

Latin name of fungus	Content of β-glucans (mg.100/g DM)	Water-soluble percentage β-glucans	Water-insoluble percentage β-glucans
<i>Pleurotus ostreatus</i>	38	37.8%	62.2%
<i>Pleurotus eryngii</i>	38	16.8%	83.2%
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	53	18.7%	81.3%
<i>Lentinus edodes</i>	22	46.1%	53.9%

Data from Manzi and Pizzoferrato (2000)¹⁷.

1.2.2 Απομόνωση β-γλυκανών

Τα πιθανά βήματα που ακολουθούνται για την εξαγωγή και την απομόνωση των β-γλυκανών σε εργαστηριακή κλίμακα, αλλά και στα εργοστάσια πιλοτικής λειτουργίας, παρουσιάζεται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 1.2.3: Πιθανά βήματα για την εξαγωγή και την απομόνωση των β- γλυκανών σε εργαστηριακή και εργοστασιακή (σε πιλοτική λειτουργία εργοστασίου) κλίμακα (Zhu et al. 2015)

1.2.3 Άλλες πηγές β-γλυκανών

Είναι γνωστό ότι β- γλυκάνες υπάρχουν και σε κάποια άλλα είδη μυκήτων πέραν των Βασιδιομυκήτων, στις ζύμες, στα βακτήρια και στα δημητριακά (κριθάρι και βρώμη).

Κάποια είδη champignon (Αγαρικομύκητες), π.χ.μανιτάρια Himematsutake (*Agaricus blazei* syn. *Agaricus brasiliensis*), δείχνουν αντικαρκινικές δράσεις. Για παράδειγμα, η β-γλυκάνη που απομονώθηκε από αυτό το είδος μύκητα φαίνεται να καταστέλλει την ανάπτυξη καρκίνου στις ανθρώπινες ωοθήκες και στην αναπνευστική οδό των ποντικών. Τα μανιτάρια Himematsutake είναι σήμερα πολύ δημοφιλή στην Βραζιλία, την Ιαπωνία και την Κίνα, ενώ στην Ευρώπη η χρήση τους ως βρώσιμο τρόφιμο ή ως πηγή φαρμακευτικά αποτελεσματικών ουσιών είναι σπάνια.

Επίσης, β- γλυκάνες που έχουν απομονωθεί από ζύμες και έχουν χορηγηθεί στοματικώς σε συνεργασία με θεραπεία των μονοκλωνικών αντισωμάτων, έχουν πετύχει τη μείωση του νευροβλαστώματος και την επιβίωση των ποντικών (Yan et al. 2005). Όσον αφορά την παραγωγή των β- γλυκανών που προέρχονται από τα βακτήρια, γίνεται σε αναδεδυόμενες φιάλες ή σε βιοαντιδραστήρες. Για παράδειγμα, οι Jung et al. (2007) έχουν χρησιμοποιήσει 4 είδη του *Paenibacillus polymyxa* που απομονώθηκε από την Κορέα και οι Crognale et al. (2007) το βακτήριο *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 για την παραγωγή β- γλυκανών. Τέλος, η παραγωγή των β- γλυκανών από τα δημητριακά βασίζεται στη διάλυση σε θερμό νερό και σε αλκαλικά διαλύματα, στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ισοηλεκτρική

κατακρήμνιση και στην καταβύθιση των β-γλυκανών σε θειικό αμμώνιο, 2-προπανόλη ή αιθανόλη. Θεωρείται δύσκολη μέθοδος, γεγονός που καθιστά πολύ ακριβή τη β- γλυκάνη που παράγεται από τα δημητριακά.

1.2.4 Βιομηχανικές εφαρμογές

Οι φυσικές ιδιότητες των β-γλυκανών, όπως η πύκνωση, η σταθεροποίηση, η ικανότητα γαλακτωματοποίησης και δημιουργίας πηκτής, προσδίδουν στις β-γλυκάνες την ικανότητα χρησιμοποίησης τους σε διατροφικά προϊόντα και σε άλλες βιομηχανικές εφαρμογές. Παρακάτω δίνονται συνοπτικά οι συνήθεις χρήσεις των β-γλυκανών:

Στα τρόφιμα

Ο εμπλουτισμός τροφίμων με β-γλυκάνες χρησιμοποιείται ευρέως προκειμένου να κατασκευαστούν τρόφιμα με πρεβιοτικές ικανότητες, όπως λουκάνικα. Επίσης, η προσθήκη β- γλυκάνης (από βρώμη) μεγάλου μοριακού βάρους σε γάλα πέτυχε την μείωση των θερμίδων και της χοληστερόλης στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Sharafbafi et al. 2014). β- γλυκάνη έχει προστεθεί επίσης σε ψωμί χωρίς γλουτένη, έχοντας πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Στη βιομηχανία φαρμάκων

Χρησιμοποιούνται στην ίαση των εγκαυμάτων του δέρματος, ώστε να μειώσουν τον πόνο μετά τον τραυματισμό και στις πολυμεμβράνες για την ίαση τραυμάτων. Επίσης, χρησιμεύουν ως υλικό για την αντικατάσταση των οστών, καθώς προσφέρουν εύκολο χειρισμό και καλή προσαρμογή στο σχήμα και στις διαστάσεις ακόμα και σε περιπτώσεις μεγάλων οστικών ελλειμμάτων (Belcarz et al., 2013).

Στα καλλυντικά

Οι β- γλυκάνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε καλλυντικές κρέμες ή αλοιφές, καθώς αυξάνουν την παραγωγή κολλαγόνου, ενώ προλαμβάνουν την εμφάνιση ρυτίδων, την κυτταρίτιδα, την ακμή, διάφορες δερματίτιδες, το έκζεμα και άλλα προβλήματα του δέρματος. Συγκεκριμένα, η προερχόμενη από μανιτάρια β- γλυκάνη χρησιμοποιείται σε σταγόνες για τα μάτια, καθώς κρατάει σε υψηλά επίπεδα την υγρασία της περιοχής Chen (2014).

Στις ζωοτροφές

Η χρήση β- γλυκανών ως προσθετικά στις ζωοτροφές, ενισχύει τη φυσική ανοσία και δρα ως δυνητικός παράγοντας κατά του όγκου για τα ζώα. Τα ίδια οφέλη συναντώνται και στη χρήση β- γλυκανών στις τροφές των ψαριών (Zhu et al. 2015).

1.3 Μελετώμενα είδη μακρομυκήτων

Pleurotus spp.

Το γένος *Pleurotus* (ή οστρακοειδές μανιτάρι) αναπτύσσεται φυσικά κυρίως σε υποτροπικές και εύκρατες περιοχές στις πιο δροσερές εποχές σε δέντρα υπό σήψη όπως η βαλανιδιά, φτελιά, λεύκη και πουρνάρι. Χαρακτηρίζεται ως σαπροφυτικός μύκητας. Έχει μια αρωματική μυρωδιά και νόστιμη γεύση και καταναλώνεται ευρέως ως τρόφιμο σε όλο τον κόσμο, καθώς η καλλιέργεια και ανάπτυξη των μανιταριών αυτών είναι μακράν η πιο εύκολη και λιγότερο δαπανηρή σε σχέση με άλλα βιομηχανικά καλλιεργούμενα εδώδιμα μανιτάρια. Επίσης, υπάρχει μια ευρεία επιλογή ειδών του γένους *Pleurotus* που διατίθενται για καλλιέργεια υπό διαφορετικές κλιματικές συνθήκες (Chang & Miles 2004).

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη που εκφράζεται ως ποσοστό του ξηρού βάρους είναι από 10 έως 30 % ή ακόμη και έως 40 %, που ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία περιλαμβάνουν το 40% του συνολικού περιεχομένου αμινοξέων. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι περίπου 3 έως 5% σε βάση ξηρού βάρους και είναι γενικά υψηλότερη στο στύπο σε σχέση με τον πύλο. Τα φρέσκα μανιτάρια σε γενικές γραμμές περιέχουν από 3 έως 28 % υδατάνθρακες και από 3 έως 32% φυτικές ίνες σε βάση ξηρού βάρους.

Πέρα από την υψηλή διατροφική αξία των μυκήτων *Pleurotus*, η φαρμακευτικές τους ιδιότητες είναι, επίσης, αδιαμφισβήτητες. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αντικαρκινικές ιδιότητες στους πολυσακχαρίτες (στις β-(1→3) γλυκάνες) των καρποσωμάτων στα *Pleurotus* spp. Επίσης, είναι γνωστές οι εξής δράσεις: ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, υπογλυκαιμική δραστηριότητα, αντιθρομβωτική δράση, αναστολή ανάπτυξης όγκου, μείωση φλεγμονών, αντιοξειδωτική δράση και μείωση της αρτηριακής πίεσης και της συγκέντρωσης λιπιδίων στο πλάσμα (Παπαστυρίδη 2011).

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι καλλιέργειας μυκήτων *Pleurotus* spp. Η καλλιέργεια σε κορμούς ξύλων ή στην επιφάνεια κορυφογραμμής και σε ειδικά πλαίσια χρησιμοποιώντας υποστρώματα όπως πριονίδι, αναποφλοιώτο άχυρο ή άλλα βιομηχανικά απορρίμματα αποτελούν τις στερεές μεθόδους καλλιέργειας. Είναι δυνατή, επίσης, η ανάπτυξη σε υγρό μέσο καλλιέργειας.

- *Pleurotus ostreatus*

Ανήκει στην κλάση Βασιδιομυκήτων, στην τάξη Agaricales και στην οικογένεια Tricholomataceae. Αποκαλείται συχνά οστρακοειδές μανιτάρι, επειδή ο πύλος έχει σχήμα που παραπέμπει σε κοχύλι με φαρδύ τελείωμα και στενή βάση και ο στύπος είναι συνήθως σε πλευρική θέση. Έχει ιδιαίτερα υψηλή διατροφική αξία και συγκεκριμένα, ένα εξαιρετικά υψηλό ποσοστό (57 %) περιεκτικότητας σε

υδατάνθρακες. Επίσης, έχει 14 % περιεκτικότητα σε ακατέργαστες ίνες, με ένα μεγάλο ποσοστό (47 %) που αποτελείται από διαιτητικές ίνες (Chang & Miles 2004).



Εικόνα 1.3.1: Μακρομύκητας *Pleurotus ostreatus*

- *Pleurotus citrinopileatus*

Ανήκει και αυτό στην κλάση Βασιδιομυκήτων, στην τάξη Agaricales και στην οικογένεια Tricholomataceae. Έχει ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με το *P. ostreatus* και αποκαλείται χρυσό οστρακοειδές μανιτάρι, λόγω του χρώματος του πύλου. Καλλιεργείται σε πολλές χώρες, ενώ είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Κίνα για τις φαρμακευτικές του, κυρίως, ιδιότητες.

Ganoderma lucidum

Το *Ganoderma lucidum* ανήκει στην τάξη των Βασιδιομυκήτων και στην οικογένεια Polyporaceae (ή Ganodermataceae). Χαρακτηρίζεται ως φυτοπαθογόνος μύκητας, αφού προκαλεί σήψη σε πολλούς κορμούς δέντρων. Αποτελεί πηγή πολλών βιοδραστικών και φαρμακευτικών ουσιών και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στην Κίνα και Ιαπωνία, στην Βόρεια Αμερική και σε άλλα μέρη του κόσμου. Συγκεκριμένα, έχει ανοσοτροπικές, αντιηπατοξικές και αναλγητικές ιδιότητες, επίσης ωφελεί το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα. Έρευνες δείχνουν, επίσης, αντιαλλεργικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, θετική επίδραση στο νευρικό σύστημα και ίαση των μολύνσεων του HIV. (Jong & Birmingham 1992, Tasaka et al. 1988, Mizumoto et al. 1990, Lee & Rhee, 1990)

Η λατινική λέξη lucidus σημαίνει «λαμπερός» ή «λαμπρή» και αναφέρεται στη λουστραρισμένη εμφάνιση της επιφάνειας του μανιταριού. Ο *G. lucidum* αποτελείται από καρποσώματα με κίτρινη έως κοκκινωπή λουστραρισμένη επιδερμίδα και ένα

ανώτερο στρώμα που είναι μαλακό ή σχηματίζει αυλάκια σε ομόκεντρα ζώνες. Το σχήμα είναι μεταβλητό: κυκλικό -ημικυκλικό ή θυμίζει ανεμιστήρα.



Εικόνα 1.3.2: Μακρομύκητας *Ganoderma lucidum*

Οι κυριότερες ουσίες στις οποίες οφείλει τις φαρμακευτικές του ιδιότητες είναι τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες (κυρίως οι β-γλυκάνες). Οι συνηθέστερες ενώσεις τριτερπενίων που απομονώθηκαν από τα καρποσώματα, τα σπόρια και το μυκήλιο του *G. lucidum* από τους Kubota et al. είναι τα γανοδερικά οξέα Α και Β. Προσφέρουν κυτοτοξικές (αντικαρκινικές), υπογλυκαιμικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες, ενώ προστατεύουν το ήπαρ.

Επί του παρόντος, οι μέθοδοι που υιοθετούνται ευρέως για την εμπορική παραγωγή του *G. lucidum* είναι η ανάπτυξη σε κορμό από ξύλο, σε μικρό τμήμα από ξύλο, σε κούτσουρο δέντρου, σε πριονίδι, και σε μπουκάλι με κατάλληλο υπόστρωμα, όπως πριονίδι ή αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα (Triratana et al. 1991). Επίσης, παράγεται σε καλλιέργεια με υγρό μέσο ανάπτυξης (Kohlmünzer et al. 1989).

1.4 Καλλιέργεια μακρομυκήτων

Η ανάπτυξη εδώδιμων μακρομυκήτων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να παραχθεί επαρκής ποσότητα βιομάζας και βιοενεργών μεταβολιτών. Οι μέθοδοι ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι η καλλιέργεια σταθερής κατάστασης (Solid State Fermentation- SSF) ή ζύμωση στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) και η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια (Submerged Liquid Fermentation- SLF) ή ζύμωση υγρής κατάστασης (ΖΥΚ).

1.4.1 Ζύμωση Στερεάς Κατάστασης (ΖΣΚ)

Στην ζύμωση στερεάς κατάστασης ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε στερεό υπόστρωμα με παρουσία ελάχιστου ή σχεδόν καθόλου ελεύθερου νερού (ενεργότητα νερού: $a_w \rightarrow 0$). Ωστόσο, πρέπει να υπάρχει επαρκής ποσότητα ώστε να υποστηρίζεται η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού (Mitchell & Lonsane 1992). Η ΖΣΚ είναι μια φιλική ως προς το περιβάλλον και οικονομική διεργασία, καθώς αξιοποιεί χαμηλά σε κόστος αγρο-βιομηχανικά απορρίμματα λύνοντας το πρόβλημα της διάθεσής τους στο φυσικό περιβάλλον. Επίσης, προσφέρει στον μικροοργανισμό ένα περιβάλλον παρόμοιο με το φυσικό από το οποίο απομακρύνθηκε, οδηγώντας σε υψηλές αποδόσεις παραγωγής βιομάζας. Η ΖΣΚ χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή κομπόστ, στην ανάπτυξη μακρομυκήτων, στη βιολογική αποτοξικοποίηση αγρο-βιομηχανικών απορριμμάτων, στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και βιοφαρμακευτικών και ενζύμων από μικροοργανισμούς (Gonzalez et al. 2003, Nwe et al. 2001, Ngai & Ng 2003).

Ωστόσο, η ΖΣΚ είναι συχνά μια αργή διαδικασία, που περιορίζεται από την επιλογή των οργανισμών που είναι σε θέση να ανεχθούν τα χαμηλά επίπεδα a_w . Επιπλέον, περιορίζεται σε διεργασίες που δεν απαιτούν επαφή με το προϊόν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, ενώ είναι δύσκολο να ελεγχθεί και να πραγματοποιηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα (scale-up) (Hölker et al. 2004). Το κρισιμότερο σημείο της διεργασίας είναι η κατανόηση των φαινομένων μεταφοράς θερμότητας και μάζας, καθώς αυτά συνιστούν πρόκληση για το σχεδιασμό και τη λειτουργία των βιοαντιδραστήρων και την εμπορευματοποίηση των διεργασιών της ΖΣΚ. Η ετερογενής φύση του υποστρώματος (αγρο-βιομηχανικά απορρίμματα) δημιουργεί πρόβλημα στην κινητική και στις μελέτες μοντελοποίησης, οι οποίες είναι υποχρεωτικές πληροφορίες για το σχεδιασμό του βιοαντιδραστήρα και τη λειτουργία του.

1.4.2 Ζύμωση Υγρής Κατάστασης (ΖΥΚ)

Στη ζύμωση υγρής κατάστασης (ΖΥΚ), ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υγρό μέσο μέσα σε μεγάλες δεξαμενές, τους ζυμωτήρες ή βιοαντιδραστήρες υπό έντονο αερισμό και ανάδευση.

Λόγω των μειονεκτημάτων της ΖΣΚ που αναφέρθηκαν, για την παραγωγή και ανάκτηση υψηλής αξίας μικροβιακών μεταβολιτών προτιμάται, πλέον, η ΖΥΚ (Fazenda et al. 2008). Είναι λιγότερο προβληματική, περισσότερο αξιόπιστη ως προς το τελικό προϊόν και επαναλήψιμη. Επίσης, η παραγωγή των μεταβολιτών είναι ανεξάρτητη των εποχιακών διακυμάνσεων, σε αντίθεση με την ΖΣΚ.

Τα βασικά στάδια της διεργασίας ZYK για την παραγωγή θρεπτικής μυκηλιακής βιομάζας είναι (Petre 2016):

- 1) προετοιμασία του υποστρώματος καλλιέργειας
- 2) αποστείρωση του βιοαντιδραστήρα της καλλιέργειας
- 3) ασηπτικός εμβολιασμός του αποστειρωμένου μέσου καλλιέργειας με καλλιέργειες επιλεγμένων στελεχών μανιταριών
- 4) λειτουργία της υγρής βυθισμένης καλλιέργειας υπό ελεγχόμενες συνθήκες
- 5) συλλογή, πλύση, και διήθηση των μυκητιακών σφαιριδίων που ελήφθησαν.

Προετοιμασία του υποστρώματος καλλιέργειας (ή μέσου ανάπτυξης)

Το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται είναι συνθετικό μέσο καθορισμένης χημικής σύστασης, απόβλητο (αγροτικά υπολείμματα) ή μέσο θρεπτικών συστατικών. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη σύσταση υποστρώματος καλλιέργειας για κάθε είδος μακρομύκητα, άρα κάθε είδος πρέπει να μελετάται ξεχωριστά. Σε κάθε περίπτωση, όμως, πρέπει να προωθεί τόσο την μυκηλιακή ανάπτυξη, όσο και την παραγωγή προϊόντων.

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες γενικές αρχές που πρέπει να εφαρμόζονται για την ανάπτυξη των μακρομυκήτων σε βυθισμένες καλλιέργειες:

- 1) Απαιτούνται, συνήθως, υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων για την επίτευξη υψηλής παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας.
- 2) Η αναλογία άνθρακα : αζώτου (C:N) είναι σημαντική, δεδομένου ότι επηρεάζει την απόδοση της παραγωγής βιομάζας και των μεταβολιτών. Επίσης, επηρεάζει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λιπίδια του μυκηλίου (Lee et al. 2007, Rogalski et al. 2006).
- 3) Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται απόβλητο ως μέσο ανάπτυξης, απαιτούνται συμπληρώματα αζώτου και ανόργανων αλάτων (Hsieh and Yang 2004, Lee et al. 2003).
- 4) Υπάρχει χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά μέσα καθορισμένης χημικής σύστασης σε σχέση με τα σύνθετα μέσα θρεπτικών συστατικών (Fan et al. 2007).
- 5) Το περιεχόμενο και η σύσταση σακχάρων οποιουδήποτε παραγόμενου πολυσακχαρίτη εξαρτάται από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται (Kim et al. 2006).
- 6) Η επιπλέον προσθήκη μεταλλικών και ανόργανων αλάτων μπορεί να ενισχύσει την μυκηλιακή ανάπτυξη, αλλά και να επηρεάσει τη σύσταση των αμινοξέων (Hwang et al. 2004).

Τέλος, οποιοδήποτε υπόστρωμα επιλεγθεί για την καλλιέργεια του μακρομύκητα πρέπει να αποστειρωθεί με ατμό.

Αποστείρωση του βιοαντιδραστήρα της καλλιέργειας

Είναι απαραίτητη η αποστείρωση με ατμό του βιοαντιδραστήρα της καλλιέργειας πριν τον εμβολιασμό του μακρομύκητα.

Ασηπτικός εμβολιασμός του αποστειρωμένου μέσου καλλιέργειας με καλλιέργειες επιλεγμένων στελεχών μανιταριών

Η συγκέντρωση και η μορφή του εμβολίου επιδρά στη διεργασία της ζύμωσης των μυκήτων. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση, ο τύπος (σπόρια, μυκήλιο), η ηλικία και η ζωτικότητα του εμβολίου επηρεάζουν τη μορφολογία των κυττάρων και τον τύπο των μυκηλιακών συσσωματωμάτων (Gibbs et al. 2000).

Στην υγρή βυθισμένη καλλιέργεια χρησιμοποιείται ασηπτικό εμβόλιο μυκηλιακής μορφής, από προηγούμενη υγρή βυθισμένη καλλιέργεια (μικρότερου όγκου) του μύκητα. Η «μικρότερη» καλλιέργεια (προκαλλιέργεια) έχει προκύψει από τον εμβολιασμό μικρών τεμαχιδίων μυκηλίου προσκολλημένου στο άγαρ ανάπτυξής του, απευθείας μέσα στο υγρό καλλιέργειας μιας αναδευόμενης φιάλης. Έτσι, το μυκήλιο περνά μεγάλη φάση υστέρησης προκειμένου να προσαρμοστεί από το στερεό στο υγρό περιβάλλον, αλλά πολύ μικρότερη όταν εμβολιαστεί στο νέο, υγρό περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα στην κατάλληλη ηλικία. Είναι σαφές ότι, προκειμένου να εφαρμοστεί η τεχνική που περιγράφεται, τόσο οι θρεπτικές όσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια που χρησιμοποιείται ως εμβόλιο για την ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα, να είναι κοινές με αυτές του βιοαντιδραστήρα.

Λειτουργία της υγρής βυθισμένης καλλιέργειας υπό ελεγχόμενες συνθήκες

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πρέπει να ελέγχονται ορισμένες συνθήκες και να κρατούνται στα βέλτιστα επίπεδα. Κάθε μακρομύκητας, προφανώς, αναπτύσσεται υπό διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες. Συγκεκριμένα, υπάρχουν φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις υγρές καλλιέργειες. Οι βασικότεροι φυσικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάδευσης, ο αερισμός και ο αφρισμός της καλλιέργειας. Οι σημαντικοί χημικοί παράγοντες είναι το pH του μέσου ανάπτυξης και η σύστασή του. Επιπλέον, οι βιολογικοί παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται είναι το εμβόλιο της υγρής καλλιέργειας, όπως αναλύθηκε παραπάνω, καθώς και η μορφολογία του μυκηλίου που επηρεάζει και τη ρεολογία του υγρού καλλιέργειας.

Συλλογή, πλύση, και διήθηση των μυκητιακών σφαιριδίων που ελήφθησαν

Στο τέλος της καλλιέργειας, η βιομάζα συλλέγεται και πλένεται. Η περαιτέρω κατεργασία που ακολουθείται εξαρτάται από το σκοπό του ερευνητή (εξαγωγή και μελέτη παραγόμενων μεταβολιτών κ.λπ.)

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

1.5.1 Μέθοδοι παραγωγής ελαιολάδου και Απόβλητα

1.5.1.1 Μέθοδοι παραγωγής ελαιολάδου

Η παραλαβή του ελαιολάδου πραγματοποιείται μετά την σύνθλιψη των καρπών με μηχανικά μέσα. Τα βασικά στάδια της μεθόδου εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, είναι το σπάσιμο του καρπού, η μάλαξη της ελαιοζύμης και ο διαχωρισμός του ελαιολάδου. Η διαδικασία συμπεριλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) Συγκομιδή του καρπού

Η συγκομιδή της ελιάς γίνεται στο βέλτιστο στάδιο της ωρίμανσής της (στάδιο βιομηχανικής ωρίμανσης), ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλότερη δυνατή ελαιοπεριεκτικότητα αλλά και η παραγωγή υψηλής ποιότητας (Salvador et al. 2001, Κυριτσάκης 2007, Μπαλατσούρας 1997). Για την εξασφάλιση της καλύτερης ποιότητας θα πρέπει να περιορίζονται οι τραυματισμοί κατά τη μεταφορά της στο ελαιοτριβείο και να υπάρχει επαρκής αερισμός. Συνήθως, μεταφέρεται σε πλαστικά τελάρα με οπές για τον κατάλληλο αερισμό.

2) Αποφύλλωση – Πλύσιμο – Σπάσιμο

Η απομάκρυνση των φύλλων είναι απαραίτητη, καθώς σε περίπτωση παραμονής τους, προκύπτει ελαιόλαδο με μεγάλη ποσότητα χλωροφύλλης, η οποία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και παρουσία φωτός, επιδρά αρνητικά στην ποιότητα του ελαιολάδου επιταχύνοντας την οξειδωσή του (Giuliani et al. 2001). Στη συνέχεια ακολουθεί το πλύσιμο του καρπού για την απομάκρυνση ξένων υλών όπως η σκόνη ή το χώμα. Μετά το πλύσιμο, ο ελαιοκαρπός μεταφέρεται στον σπαστήρα, όπου προκαλείται το σπάσιμο του με μεγάλο αριθμό στροφών (Μπαλατσούρας 1997).

3) Μάλαξη

Η μάλαξη είναι το σημαντικότερο στάδιο της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, καθώς συντελεί στη συνένωση των μικρών σταγονιδίων του ελαίου σε μεγαλύτερες σταγόνες, ώστε να διαχωριστεί πιο εύκολα από την υδατική φάση. Η αύξηση της θερμοκρασίας της ελαιοζύμης είναι απαραίτητη προκειμένου να εξέλθει το ελαιόλαδο

από τα φυτικά κύτταρα και επιτυγχάνεται μέσω της κυκλοφορίας νερού από τα διπλά τοιχώματα του μαλακτήρα. Η θερμοκρασία της ελαιοζύμης δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 30 °C και η διάρκεια της μάλαξης να μην ξεπερνά τα 90 λεπτά (Alonso et al. 1994).

4) Διαχωρισμός ελαιολάδου

Ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη επιτυγχάνεται, παραδοσιακά, με τη χρήση υδραυλικών πιεστηρίων. Με τη συμπίεση του ελαιοπολτού, διαχωρίζεται η υγρή φάση, δηλαδή το λάδι, τα φυτικά υγρά και τα νερά της έκπλυσης από τη στερεά φάση. Τέτοιου είδους πιεστήρια μπορούν να κρατήσουν μέχρι 500 kg ελαιοπολτού ανά πίεση, ενώ η διεργασία διαρκεί έως και 2 ώρες. Η μέθοδος αυτή είναι μια ασυνεχής διεργασία, αφού ο διαχωρισμός της υγρής φάσης, προκειμένου να παραληφθεί το ελαιόλαδο, πραγματοποιείται σε επόμενο στάδιο με φυγοκέντριση σε κατακόρυφο διαχωριστήρα (Κυριτσάκης 2007, Μπαλατσούρας 1997).



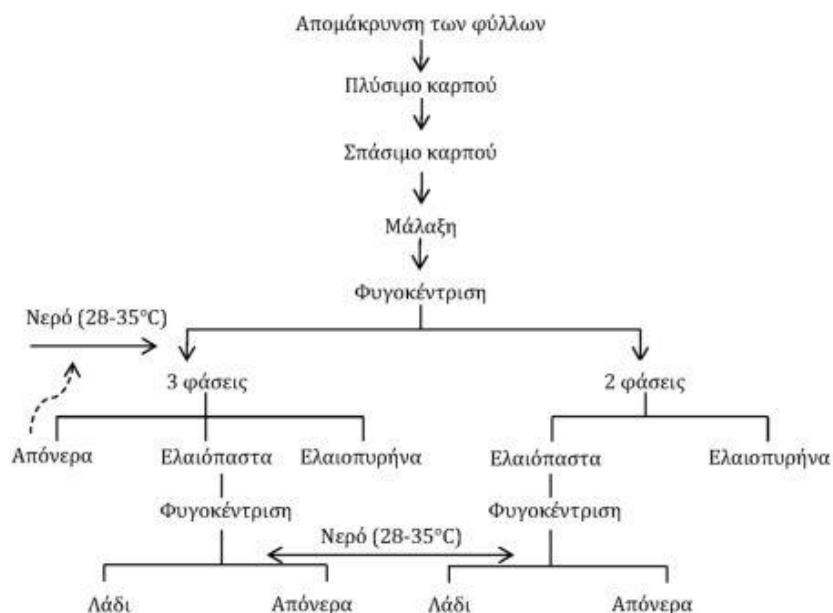
Σχήμα 1.3.1: Διαγραμματική παρουσίαση των σταδίων επεξεργασίας σε ελαιουργείο με υδραυλικό πιεστήριο (Λοϊζίδης, 2009)

Οι πιο πρόσφατες τεχνικές που ακολουθούνται για το διαχωρισμό του ελαιολάδου αφορούν τη χρήση φυγοκεντρικών συστημάτων διαχωρισμού δύο ή τριών φάσεων.

Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού τριών φάσεων, ο διαχωρισμός του λαδιού από την ελαιοζύμη γίνεται μέσω φυγοκέντρισης σε οριζόντιους τριφασικούς φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες (decanters). Για την παραγωγή του ελαιολάδου (1^η φάση), καταναλώνονται σημαντικές ποσότητες νερού και ως συνέπεια προκύπτουν ποσότητες υγρών αποβλήτων (2^η φάση). Επιπλέον, παράγεται η ελαιοπυρήνα (3^η

φάση), η οποία αντιστοιχεί στα στερεά συστατικά του ελαιοκάρπου (Petrakis 2006, Μπαλατσούρας 1986, 1997).

Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού δύο φάσεων, τα συστατικά του ελαιοκάρπου τροφοδοτούνται στον φυγοκεντρικό διαχωριστήρα δύο φάσεων και διαχωρίζονται στο ελαιόλαδο (1^η φάση) και στα υπόλοιπα συστατικά της ελιάς (πούλπα, φυτικά υγρά), που στο σύνολό τους αποτελούν τη διφασική ελαιοπυρήνα (2^η φάση).



Σχήμα 1.5.2: Διαγραμματική απεικόνιση της παραγωγής ελαιολάδου σε φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού δύο και τριών φάσεων (Κώτσιου, 2015)

1.5.1.2 Απόβλητα διεργασιών παραλαβής ελαιολάδου

Τα στερεά απόβλητα αποτελούν το σημαντικότερο παραπροϊόν. Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο ελαιοπυρήνας, τα κλαδιά, τα φύλλα ελιάς και οι πέτρες. Υπολογίζεται ότι κατά τη διάρκεια της αποφύλλωσης παράγονται 3-5 kg ελαιοφύλλα από 100 kg ελαιοκάρπου στο ελαιοτριβείο. Τα στερεά προϊόντα είναι πλούσια σε κάλιο και οργανικό άζωτο και φτωχά σε φώσφορο και μικροστοιχεία (Γεωργακάκη 1994, Εί & Karakaya 2009).

Όσον αφορά τα αέρια απόβλητα, αποτελούνται από τα καυσαέρια που παράγονται από τα μηχανήματα εσωτερικής καύσης και από την καύση του ελαιοπυρήνα. Ωστόσο, η επιβάρυνση που προκαλούν θεωρείται αμελητέα λόγω της αραιώσής τους με τον ατμοσφαιρικό αποδέκτη.

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ) αποτελούν προϊόντα χωρίς εμπορική αξία, αλλά είναι πλούσια σε πολύτιμα συστατικά όπως σάκχαρα, φαινολικές ουσίες, πρωτεΐνες, υπολείμματα μαλακών φυτικών ιστών του ελαιοπολτού που τους

προσδίδουν τη μορφή γαλακτώματος, χρωστικές και χλωροφύλλες. Προέρχονται από τα φυτικά υγρά του καρπού και τα νερά που χρησιμοποιούνται στη γραμμική παραγωγή του ελαιολάδου. Οι τρεις διεργασίες παραγωγής ελαιολάδου που αναφέρθηκαν διαφέρουν ως προς την ποσότητα των υγρών αποβλήτων που παράγουν (Κώτσιου 2015, Μουτσοπούλου 2006, Λοϊζίδης 2009):

1) Ελαιουργείο με υδραυλικό πιεστήριο

Στον τύπο ελαιουργείου με υδραυλικό πιεστήριο παράγονται υγρά απόβλητα λόγω της χρήσης θερμού νερού στο στάδιο του διαχωρισμού του ελαιολάδου. Ωστόσο, η διεργασία αυτή τείνει να θεωρηθεί παρωχημένη, αφού χαρακτηρίζεται ως επίπονη και είναι πιθανό να αλλάξει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

2) Ελαιουργείο με τριφασική μέθοδο

Λόγω της μεγάλης ποσότητας νερού που χρησιμοποιείται, παράγονται υγρά απόβλητα που προκαλούν σοβαρή ρύπανση (Mechri et al. 2007). Η παραγόμενη ποσότητα υγρών αποβλήτων που παράγεται με αυτό το σύστημα εξαρτάται από τον τύπο των μηχανημάτων και κυμαίνεται από 0,5-1,4 L/kg επεξεργαζόμενου καρπού.

3) Ελαιουργείο με διφασική μέθοδο

Στο ελαιουργείο δύο φάσεων δεν παράγονται υγρά απόβλητα, αφού παραμένουν αναμειγμένα με τη στερεή φάση (Sierra et al. 2001). Ωστόσο, η στερεή φάση έχει πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία και είναι ημίρευστη, γεγονός που δυσκολεύει την επεξεργασία της. Η μηδενική κατανάλωση νερού, επομένως οδηγεί σε μηδενική παραγωγή υγρών αποβλήτων (Petraakis 2006, Μπαλατσούρας 1986, 1997).

1.5.2 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ)

1.5.2.1 Σύσταση

Τα ΥΑΕ περιέχουν 83-94% νερό, 4-16% οργανική ουσία και 0,4-2.5% ανόργανα άλατα (Ramos-Cormatzana, 1986). Η οργανική ουσία των ΥΑΕ αποτελείται από λάδι (1-14%), πολυσακχαρίτες (13-53%), πρωτεΐνες (8-16%), οργανικά οξέα (3-10%), πολυαλκοόλες (3-10%) και πολυφαινόλες (2-15%) (Fiestas Ros Ursinos 1986, Martinez Nieto et al. 1994). Τα ανόργανα συστατικά αποτελούνται κυρίως από άνθρακα (21%), φώσφορο (14%), κάλιο (47%) και νάτριο (7%) (Fiestas Ros Ursinos 1992).

Όσον αφορά τις υπόλοιπες παραμέτρους, όπως το pH, ή άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΥΑΕ, φαίνονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 1.5.1: Μέσες τιμές κύριων παραμέτρων στα ΥΑΕ (Μουτσοπούλου 2006)

Παράμετρος	Μέσες τιμές
pH	4,5-6,0
EC (ds/m)	8,0-22,0
BOD5 (g/l)	35-100
COD (g/l)	40-195
Οργανική Ουσία (g/l)	40-165
Ανόργανη Ουσία (g/l)	5-14
Πολυφαινόλες (g/l)	3-24
N (g /l)	5-15
P (g /l)	0,3-1,1
K (g/l)	2,7-7,2
Ca (g/l)	0,12-0,75
Mg (g/l)	0,10-0,40
Na (g/l)	0,04-0,90
ΟΣ (g/l)	35-120
ΟΠΣ (g/l)	24-105
ΟΑΣ (g/l)	1,0-22
Λάδι (g/l)	0,3-12
Πυκνότητα (g/l)	1016-1100
Δυναμικό Οξειδοαναγωγής (mV)	(-80)-(-330)
Χρώμα (U Pt-Co)	52270-180000
Θολότητα (UNT)	42000-46000
OUR (O ₂ uptake rate, mg/l h)	50-100
Ολικά βακτήρια (10 ⁶ col/ml)	0-5
Ολικοί μικροοργανισμοί (10 ⁶ col/ml)	0-5

1.5.2.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερεύοντος μεταβολισμού του ελαιόδεντρου και είναι υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες και τη θρεπτική αξία του ελαιολάδου. Λόγω της υδατοδιαλυτότητάς τους, μεταφέρονται, ως επί το πλείστον, στην υδατική φάση της διαδικασίας εκχύλισης του ελαιολάδου, δηλαδή στα ΥΑΕ.

Στα ΥΑΕ ανιχνεύονται πάνω από 50 διαφορετικές φαινόλες μαζί με αλκοόλες, αλδεύδες και άλλες μικρομοριακές ενώσεις (Tomati 1992). Η ανάλυση φρέσκων υγρών αποβλήτων ελαιουργείου έδειξε ότι τα φαινολικά χωρίζονται σε 3 κατηγορίες (Hamdi 2000):

- 1) Φαινολικές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, πάνω από 20.000, που είναι υπεύθυνες για το μαύρο χρώμα. Στην κατηγορία περιλαμβάνονται οι λιγνίνες και συστατικά αυτο-οξειδωσης των συστατικών της δεύτερης κατηγορίας.

- 2) Συστατικά μοριακού βάρους μικρότερου από 20.000, που είναι υπεύθυνα για το κόκκινο χρώμα. Περιλαμβάνει τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες, των οποίων η συγκέντρωση φτάνει τα 12 g/L.
- 3) Περιλαμβάνει φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, που είναι υπεύθυνες για το υποκίτρινο χρώμα.

1.5.3 Μέθοδοι επεξεργασίας ΥΑΕ

Λόγω του υψηλού οργανικού και τοξικού ρυπαντικού φορτίου, τα ΥΑΕ πρέπει να επεξεργάζονται κατάλληλα, ώστε η διάθεσή τους να μην αποτελεί πρόβλημα για το περιβάλλον, ειδικά στη Μεσόγειο, όπου η παραγωγή φτάνει τα $12 \cdot 10^{16}$ m³ και περιορίζεται σε μια μικρή περίοδο του έτους (Νοέμβριο-Μάρτιο).

Μέχρι και πρόσφατα στην Κρήτη, τα ΥΑΕ απορρίπτονταν σε υδάτινους αποδέκτες με σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως το χρωματισμό των νερών λόγω της οξείδωσης των συστατικών και ο ευτροφισμός λόγω της παρουσίας φωσφόρου και αζώτου. Πλέον, χρησιμοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα οι λιμνοδεξαμενές. Τα ΥΑΕ διοχετεύονται σε μεγάλες αδιαπέραστες δεξαμενές (κυρίως χωμάτινες) και με την ενέργεια του ήλιου γίνεται εξάτμιση και ξήρανση των αποβλήτων. Ωστόσο, έχουν προκύψει προβλήματα που αφορούν έντονες οσμές και πιθανή έκπλυση των υδατοδιαλυτών συστατικών των αποβλήτων, μέσω του εδάφους, στους υδάτινους αποδέκτες. Επίσης, αποτελεί πρόβλημα η εύρεση γης για την κατασκευή τέτοιων δεξαμενών, καθώς και η διάθεση του τελικού προϊόντος (λάσπη).



Εικόνα 1.5.3: Επεξεργασία του κατσίγαρου στη λιμνοδεξαμενή

Όσον αφορά την απόρριψή τους σε δημόσια φρεάτια, έχει απαγορευτεί στις περισσότερες χώρες, καθώς το COD των ΥΑΕ είναι 100 φορές μεγαλύτερο από αυτό των αποβλήτων που οδηγούνται στους σταθμούς επεξεργασίας. Επίσης, η οξύτητα είναι διαβρωτική στα υλικά των φρεατίων, ενώ η αναερόβια χώνευση των οργανικών

συστατικών προκαλεί παραγωγή αερίου, το οποίο είναι επικίνδυνο και διαβρωτικό για τα τοιχώματα των καναλιών που είναι από μπετόν και για όλο τον μεταλλικό εξοπλισμό (Melloyli & Hartmann, 2000).

Ακόμα και στην περίπτωση που επιθυμείται να χρησιμοποιηθούν τα ΥΑΕ ως λιπαντική άρδευση, λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου και του ουσιαστικού περιεχόμενου σε φυτικές θρεπτικές ουσίες (Cegarra et al., 1996), είναι απαραίτητη μια προκαταρκτική αποτελεσματική θεραπεία για τον περιορισμό της φυτοτοξικότητας και για αντιβακτηριακή δράση. Ωστόσο, οι συμβατικές χημικές και βιολογικές επεξεργασίες λυμάτων είναι ελάχιστα αποτελεσματικές στην απομάκρυνση τοξικών ρύπων (Flouri et al. 1996).

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

1.5.3.1 Φυσικές μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τον χωρισμό των διαφορετικών φάσεων μέσω μηχανικών διεργασιών.

1) Αραίωση

Αποτελεί την απλούστερη διαδικασία ελάττωσης του οργανικού φορτίου των αποβλήτων του ελαιουργείου. Σαν αραιωτικό μέσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί νερό δεύτερης ποιότητας ή άλλα απόβλητα με χαμηλότερο οργανικό φορτίο, όπως τα απόβλητα από το πλύσιμο του καρπού της ελιάς. Έτσι, αν το συνολικό ρυπαντικό φορτίο είναι χαμηλό, τα αραιωμένα απόβλητα θα μπορούσαν να οδηγηθούν σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων (Boari & Mancini, 1990). Ωστόσο, για να υποβιβαστούν τα χαρακτηριστικά των ΥΑΕ με αυτά των αστικών λυμάτων, χρειάζεται αραίωση τουλάχιστον 1:100, κάνοντας την αραίωση δύσκολη να εφαρμοστεί στις περιοχές με περιορισμένους υδάτινους πόρους.

2) Ιζηματοποίηση/Καθίζηση

Η ιζηματοποίηση είναι η συνηθέστερη φυσική μέθοδος που χρησιμοποιείται (Al-Malah et al. 2000, Velioğlu et al. 1987). Κατά τη μέθοδο αυτή, τα ΥΑΕ με παραμονή περίπου 10 ημερών σε ηρεμία δημιουργεί δύο υγρές στοιβάδες, μια υπερκείμενη στοιβάδα με χαμηλό COD και μια «λασπώδη» στοιβάδα υψηλού COD (Georgacakis & Dalis 1993, Georgacakis & Christopoulou 2002). Δεδομένου ότι τα περισσότερα οργανικά των ΥΑΕ βρίσκονται υπό μορφή αιωρούμενων στερεών, η απομάκρυνσή τους με τεχνικές καθίζησης μπορούν να ελαττώσουν σημαντικά το COD και το BOD στη διαλυτή φάση του αποβλήτου. Η λασπώδης μάζα απομακρύνεται με ένα συμβατικό σύστημα άντλησης και οδηγείται σε σύστημα ξήρανσης, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν στερεό καύσιμο είτε σαν λίπασμα σε διάφορες καλλιέργειες.

3) Φυγοκέντριση

Κατά τη φυγοκέντριση των ΥΑΕ λαμβάνονται τρεις στοιβάδες: μια επιφανειακή στοιβάδα που περιέχει τα έλαια, μια ενδιάμεση υδάτινη στοιβάδα που περιέχει τα υδατοδιαλυτά υλικά και μια λασπώδη στοιβάδα που περιέχει τα αιωρούμενα στερεά και τα κολλοειδή υλικά. Ο Mitrakas et al (1996) απέδειξε ότι η φυγοκέντριση μπορεί να ελαττώσει κατά 70% το αρχικό COD στην υδάτινη στοιβάδα, καθώς επίσης να πετύχει την ανάκτηση των ελαίων κατά 30-50%. Τα αποτελέσματα είναι ακόμα καλύτερα όταν τα πειράματα έγιναν σε όξινο περιβάλλον (H_2SO_4), όπου η ανάκτηση του ελαίου ανήλθε σε 47%, ενώ το COD μειώθηκε κατά 67,8%. Με τη μέθοδο αυτή παραλαμβάνεται περισσότερη και πιο συνεκτική λασπώδη ύλη σε σχέση με τη μέθοδο της ιζηματοποίησης, ωστόσο τα παραλαμβανόμενα έλαια είναι κατώτερης ποιότητας καθώς στο pH αυτό υδρολύονται.

1.5.3.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι

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

1) Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι μια φυσικοχημική μέθοδος κατά την οποία διαλυτά οργανικά μόρια αποχωρίζονται από την υγρή φάση και προσκολλώνται στην επιφάνεια ενός στερεού – προσροφητικού μέσου. Ένα από τα γνωστότερα προσροφητικά μέσα είναι ο ενεργός άνθρακας, ο οποίος διαθέτει υψηλή ροφητική ικανότητα λόγω της μεγάλης εσωτερικής του επιφάνειας. Με την προσρόφηση απομακρύνονται οι χρωστικές ουσίες (άρα υφίσταται διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων), η γεύση, ουσίες που βιοαποικοδομούνται δύσκολα και ουσίες που παρεμποδίζουν τη διαδικασία της βιοαποικοδόμησης.

2) Χημική οξείδωση

Τα οξειδωτικά που χρησιμοποιούνται είναι οξυγόνο, παράγωγα οξυγόνου (όπως όζον, υπεροξείδιο του υδρογόνου), χλώριο, παράγωγα χλωρίου και υπερμαγγανικό κάλιο ή μίγματα των προαναφερθέντων. Με τη χρήση του όζοντος (O_3), διασπώνται οι διπλοί δεσμοί των φαινολικών ενώσεων και το απόβλητο γίνεται πιο επιδεκτικό στην βιολογική αποικοδόμηση (γίνεται λιγότερο τοξικό), χωρίς να παρατηρείται ουσιαστική ελάττωση στο COD. Επιπλέον, το όζον επιδρά στον αποχρωματισμό των αποβλήτων, καθώς τα χρώματα στα φυτικά εκχυλίσματα οφείλονται σε ενώσεις που περιέχουν διπλούς και τριπλούς δεσμούς άνθρακα.

1.5.3.3 Θερμικές μέθοδοι

Οι θερμικές μέθοδοι αποσκοπούν στη συμπύκνωση των αποβλήτων, απομακρύνοντας το περιεχόμενο νερό.

1) Φυσικο-θερμικές διεργασίες

Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνεται η εξάτμιση και η απόσταξη, κατά τις οποίες παράγονται δύο προϊόντα: ένα πτητικό προϊόν που περιλαμβάνει νερό και VOCs και ένα συμπυκνωμένο διάλυμα ή μια συμπυκνωμένη «πάστα». Επιτυγχάνεται μεγάλη μείωση του COD και του BOD₅, αλλά απαιτείται ένα περαιτέρω στάδιο για να ολοκληρωθεί η επεξεργασία του αρχικού αποβλήτου (π.χ. ένα βιολογικό στάδιο). Το μειονέκτημα των διεργασιών αυτών σχετίζεται με τη διάθεση των τελικών προϊόντων στο περιβάλλον. Η «πάστα» δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφής, λόγω των σημαντικών ποσοτήτων καλίου που περιέχει, ενώ η χρήση της ως πηγή θερμικής ενέργειας για την εξάτμιση περιορίζεται στο γεγονός ότι παράγονται σημαντικοί αέριοι ρύποι. Επίσης, μεταφέρονται σημαντικές ποσότητες πτητικών οργανικών στο συμπύκνωμα, προσδίδοντας σε αυτό υψηλή συγκέντρωση COD έως και 3g/L

2) Αναντίστρεπτες χημικο-θερμικές διεργασίες

Στην κατηγορία αυτή είναι η καύση και η πυρόλυση, που είναι τερματικές τεχνικές και δεν επιτρέπουν την περαιτέρω αξιοποίηση των αποβλήτων που παράγονται από ένα ελαιουργείο. Και οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση των συμπυκνωμάτων των ΥΑΕ και για τον πυρήνα. Ωστόσο, εξαιτίας των προβλημάτων που δημιουργούν στο περιβάλλον με την εκτομπή τοξικών αέριων ρύπων, απαιτούν μεγάλη κατανάλωση ενέργειας και ακριβά συστήματα καύσης/πυρόλυσης. Μπορούν να συνεργαστούν με μια μονάδα εξάτμισης ή με έναν βιολογικό σύστημα επεξεργασίας.

1.5.3.4 Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές διεργασίες χρησιμοποιούν τους μικροοργανισμούς για να αποικοδομήσουν τις οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στα ΥΑΕ. Ταυτόχρονα, παράγονται προϊόντα με εμπορική αξία που θα μπορούσαν να καλύψουν ένα μέρος της δαπάνης της διαχείρισης τους. Είναι φιλικές προς το περιβάλλον και χωρίζονται σε αναερόβιες και αερόβιες, ανάλογα από τις συνθήκες συγκέντρωσης του οξυγόνου που επικρατούν.

1) Αναερόβιες διεργασίες

Κατά την αναερόβια ζύμωση, πραγματοποιείται μετατροπή της οργανικής ύλης των αποβλήτων σε μεθάνιο (CH₄) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) απουσία οξυγόνου. Η διεργασία χωρίζεται σε τέσσερις κύριες φάσεις: την υδρόλυση (διαλυτοποίηση του οργανικού κλάσματος), την οξυγένεση ή οξεογένεση (παραγωγή λιπαρών οργανικών

οξέων), την οξικογένεση (παραγωγή υδρογόνου και οξικού οξέος) και τη μεθανογένεση (παραγωγή μεθανίου). Λαμβάνει χώρα σε βιοαντιδραστήρες ή αεροστεγή δοχεία, όπου αναπτύσσονται οξεογόνα ή μεθανογόνα βακτήρια στη μεσόφιλη και θερμοφιλή φάση, στην περιοχή pH 6,5-7,6 (Βλυσίδης κ.α. 2014).

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για επεξεργασία αποβλήτων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο (COD 5000-40.000 g/L) και απαιτεί χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, ωστόσο είναι μια ασταθής και αργή διεργασία, καθώς τα μεθανογενή βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την αποδόμηση του αποβλήτου είναι ευαίσθητα στις πολυφαινόλες και τα λιπίδια που περιέχονται σε αυτό (Fiestas et al. 1981, Boari et al. 1984).

2) Αερόβιες διεργασίες

Κατά τις αερόβιες διεργασίες χρησιμοποιούνται αερόβιοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι καταναλώνουν τα ανόργανα άλατα και τις πηγές άνθρακα του αποβλήτου ως υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους, παρουσία οξυγόνου. Οξειδώνουν τις οργανικές ενώσεις και μειώνουν το οργανικό φορτίο, ώστε να παράγουν βιομάζα και χρήσιμα προϊόντα. Μειονέκτημα της διεργασίας αυτής είναι η απαίτηση σε συνεχή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών, ενώ εμφανίζει χαμηλή απόδοση σε απόβλητα με μεγάλη συγκέντρωση COD και πολυφαινολών. Επίσης, έχει μικρό ποσοστό αποχρωματισμού επειδή η κινητική απομάκρυνσης του αδρανούς κλάσματος είναι αργή (Rozzi et al. 1996).

Οι αερόβιες τεχνολογίες περιλαμβάνουν τα βιόφιλτρα, συστήματα ενεργού ιλύος, βιόδισκους, οξειδωτικές τάφρους, αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και ελεγχόμενους υγροβιότοπους. Γενικά, λόγω μεγάλων ενεργειακών απαιτήσεων και αναγκών σε θρεπτικά συστατικά, αλλά και λόγω της μεγάλης παραγωγής βιολογικής λάσπης που πρέπει να διατεθεί, η αερόβια βιολογικά επεξεργασία ΥΑΕ δεν προτιμάται συνήθως.

3) Χρήση μυκήτων

Αρκετές έρευνες έχουν γίνει με τη χρήση ειδικών μικροοργανισμών σε αραιωμένα διαλύματα ΥΑΕ με σκοπό την αποτοξικοποίησή τους από τις φαινολικές ενώσεις (Hamdi 1991, Gharsallah et al. 1994, Borja et al. 1995). Στον πίνακα 1.5.2 παρουσιάζονται οι ανώτεροι μύκητες, οι οποίοι παράγουν ένζυμα ικανά να διασπάσουν τις πολυαρωματικές ενώσεις υδρογονανθράκων, για την αποδόμηση των πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα ΥΑΕ, για τον αποχρωματισμό τους και για την παράλληλη μείωση του COD.

Πίνακας 1.5.2: Χρήση μυκήτων στην επεξεργασία ΥΑΕ (Λοϊζίδης, 2009)

<i>Aspergillus niger</i>	Hamdi, 1991
<i>Aspergillus terreus</i>	Borja and Gonzalez, 1994; Martinez-Nieto et al., 1993; Borja et al., 1995, 1998
<i>Geotrichum candidum</i>	Borja et al., 1992, 1995, 1998; Martin et al., 1993; Assas et al., 2000, 2002a-b; Fadil et al., 2003
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sayadi and Ellouz, 1992, 1995; Gharsallah et al., 1999; Kissi et al., 2001
<i>P/eurotus ostreatus</i>	Sanjust et al., 1991; Zervakis et al., 1996; Setti et al., 1998; Kissi et al., 2001
<i>Lentinus edodes</i>	Vinciguerra et al., 1993, 1995; D'Annibale et al., 1998

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μακρομύκητες

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων, εκ των οποίων δύο ανήκουν στο γένος *Pleurotus* και ένα στο γένος *Ganoderma*. Συγκεκριμένα, οι μακρομύκητες που επιλέχθηκαν προέρχονται από το Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και είναι οι εξής:

- i. *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
- ii. *Pleurotus ostreatus* LGAM 1123
- iii. *Pleurotus citrinopileatus* LGAM 28684

Οι αναγραφόμενοι κωδικοί κάθε στελέχους ανήκουν στη βιβλιοθήκη μυκήτων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου.

2.2 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού καθαρότητας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις παρακάτω εταιρίες:

- Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.)
- AppliChem (Γερμανία)
- LAB-SCAN (Ιρλανδία)
- Panreac (Ισπανία)
- Fisher Scientific (Η.Π.Α.)

2.3 Εργαστηριακά σκεύη

Τα γυάλινα και πλαστικά εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών:

- SCHOTT AG (Γερμανία)
- Eppendorf (Γερμανία)
- Millipore (Η.Π.Α.)
- Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο)
- Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο)
- ISO LAB (Γερμανία)
- Greiner-Bio One (Γερμανία)
- SIMAX (Τσεχία)
- BOMEX (Κίνα)

2.4 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας ήταν τα παρακάτω:

- Βιοαντιδραστήρας υγρής καλλιέργειας χωρητικότητας 2L BIOFLO & CELLIGEN 310
- Αυτόκαυστο LaboAutoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας EppendorfThermomixer Comfort (Γερμανία)
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-2, B. Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενοι επωαστήρες
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.)
- Φούρνοι ξήρανσης (60 °C και 100-120 °C)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού RE11 (Buchi, Σουηδία)
- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μ. Βρετανία)
- Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Σύστημα διήθησης υπό κενό
- Φωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα
- Αναλυτικός ζυγός
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αναδευτήρες Vortex Mixer

2.5 Επεξεργασία κατσίγαρου

Αρχικά πραγματοποιείται ρύθμιση του pH στην τιμή 6, στην οποία παρατηρείται βέλτιστη ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων, με χρήση NaOH 3M. Το διάλυμα NaOH παρασκευάζεται ζυγίζοντας 24 g NaOH και διαλύοντας την ποσότητα σε 200 mL απιονισμένου νερού με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια το απόβλητο φυγοκεντρείται στα 5000 rpm και σε θερμοκρασία 4 °C για 15 min. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο παραλαμβάνεται και οδηγείται στη διήθηση υπό κενό. Στην περίπτωση που δεν έχουν απομακρυνθεί τα ανεπιθύμητα στερεά του κατσίγαρου, επαναλαμβάνεται η διήθηση υπό κενό. Στη συνέχεια, συλλέγεται το διήθημα και φυλάσσεται στους -20 °C για μελλοντική χρήση στις καλλιέργειες στον βιοαντιδραστήρα.

2.6 Στερεές καλλιέργειες στελεχών βασιδιομυκήτων

Τα στελέχη βασιδιομυκήτων αναπτύχθηκαν, αρχικά, σε στερεές καλλιέργειες, οι οποίες επιτρέπουν τη διατήρηση και την αποθήκευσή τους. Επίσης, από τις καλλιέργειες αυτές εμβολιάστηκαν στη συνέχεια οι υγρές καλλιέργειες. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και στα τρία στελέχη βασιδιομυκήτων είναι το Potato Dextrose Agar (PDA).

Συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 9 cm σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (ζωμός πατάτας, δεξτρόζη και άγαρ) σε συγκέντρωση 39 g/L. Στα 15 τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν (5 για κάθε στέλεχος), ζυγίστηκαν 14, 63 g PDA και διαλύθηκαν υπό ανάδευση και θέρμανση σε 375 mL απιονισμένο νερό (υπολογίστηκαν 25 mL υποστρώματος περίπου ανά τρυβλίο). Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C και απλώθηκε στα τρυβλία υπό στείρες συνθήκες. Ύστερα από την πήξη του θρεπτικού υποστρώματος, ακολούθησε ο εμβολιασμός των τρυβλίων με τα επιθυμητά στελέχη από μητρικές καλλιέργειες. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάστηκαν στους 27 °C για 12-14 ημέρες μέχρι να καλυφθούν από μυκήλιο περίπου τα 2/3 της επιφάνειάς τους και τελικά αποθηκεύτηκαν στους 4 °C.

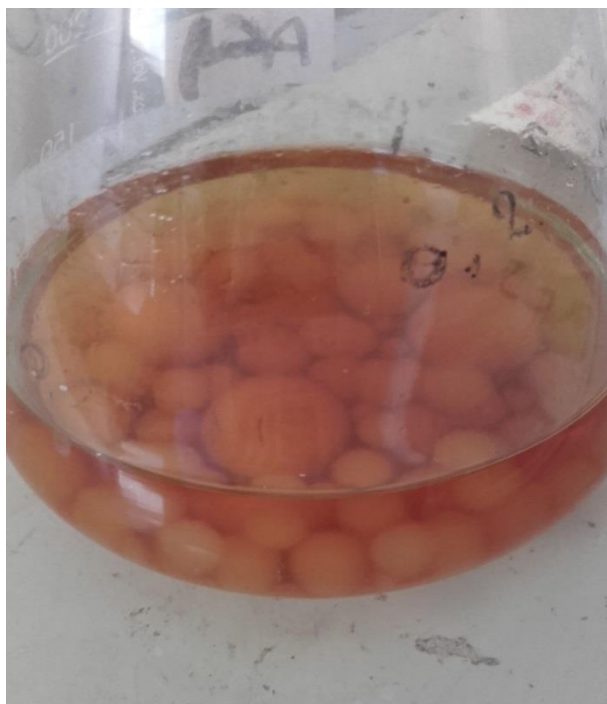
2.7 Υγρές προκαλλιέργειες βασιδιομυκήτων

Για κάθε ένα από τα τρία στελέχη βασιδιομυκήτων παρασκευάστηκαν 10 προκαλλιέργειες των 100 mL σε κωνικές φιάλες των 250 mL. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε έχει την εξής σύσταση:

- Ξυλόζη 57 g/L
- Εκχύλισμα μαγιάς (Yeast extract) 30 g/L
- Ένυδρο K_2HPO_4 1 g/L
- $MgSO_4(H_2O)_7$ 0.2 g/L

Για κάθε στέλεχος, επομένως, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Το εκχύλισμα μαγιάς, το K_2HPO_4 και το $MgSO_4(H_2O)_7$ διαλύονται σε 1 L (10 φιάλες * 100 mL η κάθε καλλιέργεια = 1000 mL θρεπτικού υλικού) απιονισμένου νερού και το διάλυμα αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C. Η ξυλόζη αποστειρώνεται ξεχωριστά, μέσα στις 10 κωνικές φιάλες (ζυγίζονται 5,7 g ξυλόζης σε κάθε μία). Μετά την αποστείρωση, η μετάγγιση των 100 mL του διαλύματος με το θρεπτικό υλικό πλην της ξυλόζης σε κάθε κωνική φιάλη, επιτρέπει την διάλυση της στερεοποιημένης ξυλόζης. Το έτοιμο θρεπτικό υλικό της κάθε φιάλης αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εμβολιάζεται με τη μεταφορά δύο τετραγωνικών τμημάτων (με πλευρά περίπου 5 mm) από τα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

Οι φιάλες επωάζονται σε συνθήκες συνεχούς ανάδευσης 100 rpm και θερμοκρασίας 27 °C.



Εικόνα 2.7.1: Υγρή προκαλλιέργεια *P. ostreatus*

2.8 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας

Τα τρία στελέχη αναπτύχθηκαν με τις ίδιες συνθήκες σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Οι συνθήκες ανάπτυξής τους αναλύονται παρακάτω.

2.8.1 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη

Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου βυθισμένης καλλιέργειας BIOFLO & CELLIGEN 310 όγκου 2 L με ενεργό όγκο 1,5 L. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση είναι η ίδια με τις προκαλλιέργειες:

- Ξυλόζη 57 g/L
- Εκχύλισμα μαγιάς (Yeast extract) 30 g/L
- Ένυδρο K_2HPO_4 1 g/L
- $MgSO_4(H_2O)_7$ 0.2 g/L

Το θρεπτικό μέσο και ο βιοαντιδραστήρας αποστειρώθηκαν για 20 min στους 121 °C, με την ξυλόζη να αποστειρώνεται πάλι ξεχωριστά από τα υπόλοιπα συστατικά του θρεπτικού μέσου. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη της πλήρους

αναπτυγμένης προκαλλιέργειας, η οποία διήρκησε 33 ημέρες για το *Ganoderma lucidum*, 14 ημέρες για το *Pleurotus ostreatus* και 10 ημέρες για το *Pleurotus citrinopileatus*. Το εμβόλιο είχε αναλογία 13,33% του συνολικού ενεργού όγκου του βιοαντιδραστήρα, δηλαδή εισήλθαν 2 φιάλες (σύνολο 200mL) στον βιοαντιδραστήρα του 1,5 L.

Το pH και η θερμοκρασία στο βιοαντιδραστήρα ρυθμίζονται αυτόματα στις βέλτιστες τιμές 6 και 28 °C, αντίστοιχα. Για τη ρύθμιση του pH χρησιμοποιούνται διαλύματα NaOH και HCl 2M. Σημειώνεται ότι σε περίπτωση αύξησης του pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, η τιμή πρέπει να επανέλθει στην επιθυμητή με τη χρήση διαλύματος HCl 2M. Το HCl προστίθεται στάγδην υπό ασηπτικές συνθήκες. Η ανάδευση διατηρήθηκε στα 80 rpm, ενώ ο αερισμός προσαρμόζεται ώστε το διαλυμένο οξυγόνο να διατηρείται πάνω από το 10% της τιμής κορεσμού (D.O: 0,4-0,6). Επίσης, όταν ο αφρισμός της καλλιέργειας φτάσει σε υψηλά επίπεδα, είναι απαραίτητη η χρήση αντιαφριστικού, που προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 2.8.1: Καλλιέργεια *G. lucidum* σε υπόστρωμα ξυλόξης

Η παρακολούθηση της καλλιέργειας πραγματοποιείται με τη λήψη δειγμάτων (περίπου 7 mL) από τον βιοαντιδραστήρα κάθε 24 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση με σκοπό το διαχωρισμό της υγρής από την στερεά φάση. Η στερεά φάση (αναπτυγμένη βιομάζα) εισάγεται στην υπερκατάψυξη (-80 °C), ξηραίνεται στη

συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (λυοφιλίωση) για 24 περίπου ώρες και στη συνέχεια μετράται το βάρος της αναπτυγμένης βιομάζας στον αναλυτικό ζυγό. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας ανάπτυξης της βιομάζας σε όλες τις μέρες της καλλιέργειας. Στο υπερκείμενο (υγρή φάση) προσδιορίζεται η εναπομείνασα ποσότητα σακχάρων με τη χρωματομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος DNS. Η μέθοδος αναλύεται στο υποκεφάλαιο 2.10.1.

2.8.2 Ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο

Μελετήθηκε η ανάπτυξη των τριών στελεχών βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου βυθισμένης καλλιέργειας BIOFLO & CELLIGEN 310 όγκου 2 L με ενεργό όγκο 1,5 L, με διαφορετικό μέσο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό μέσο είχε την ακόλουθη σύσταση:

- Διάλυμα επεξεργασμένου απόβλητου κατσίγαρου - ρυθμιστικού φωσφορικών ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) με pH 6, 50% (v/v)
- Εκχύλισμα μαγιάς (Yeast extract) 30 g/L

Το θρεπτικό μέσο και ο βιοαντιδραστήρας αποστειρώθηκαν για 20 min στους 121 °C και ακολούθησε ο εμβολιασμός με τις προκαλλιέργειες των βασιδιομυκήτων. Το εμβόλιο έγινε ακριβώς τις ίδιες μέρες ανάπτυξης των προκαλλιιεργειών, όπως στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου της ξυλόζης και είχε και αυτό αναλογία 13,33% του συνολικού ενεργού όγκου του βιοαντιδραστήρα (1,5 L).

Οι συνθήκες λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα ήταν κοινές με την περίπτωση του βιοαντιδραστήρα ξυλόζης και αναφέρονται, συνοπτικά, ακολούθως:

- pH= 6.0
- θερμοκρασία T=28 °C
- σταθερή ανάδευση = 80 rpm
- αερισμός = προσαρμοσμένος ώστε το διαλυμένο οξυγόνο να διατηρείται πάνω από το 10% της τιμής κορεσμού (D.O: 0,4-0,6)



Εικόνα 2.8.2: Καλλιέργεια *P. citrinopileatus* σε υπόστρωμα κασίγαρου

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας λαμβάνονται καθημερινά δείγματα των 7 mL περίπου από τον βιοαντιδραστήρα. Μετά τον διαχωρισμό της υγρής με τη στερεή φάση, η μεν στερεή φάση εισάγεται στους -80°C ώστε, ύστερα, να λυοφιλιωθεί και να μετρηθεί το βάρος της βιομάζας, στη δε υγρή φάση πραγματοποιούνται μετρήσεις ποσότητας των εναπομείναντων σακχάρων (με τη μέθοδο DNS), του ολικού φαινολικού περιεχομένου (με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu) και του αποχρωματισμού του αποβλήτου. Οι χημικές αναλύσεις αναλύονται στα υποκεφάλαιο 2.10.1, 2.10.2 και 2.10.3, αντίστοιχα.

2.9 Παραλαβή βιομάζας και εξωκυτταρικού υγρού στο τέλος της καλλιέργειας

Όταν κριθεί, με τη βοήθεια των δειγμάτων που λαμβάνονται ανά 24ωρό, ότι η ανάπτυξη του κάθε στελέχους βασιδιομυκήτων έχει φτάσει στη στάσιμη φάση, διακόπτεται η καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα. Στη συνέχεια, διαχωρίζεται η βιομάζα από το εξωκυτταρικό υγρό και οι δύο φάσεις κατεργάζονται ως εξής:

2.9.1 Παραλαβή και συμπύκνωση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

2.9.1.1 Παραλαβή εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Σε πρώτη φάση, ο διαχωρισμός της βιομάζας από το εξωκυτταρικό υγρό γίνεται με διήθηση και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση στα 4000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C για 20min. Το καθαρό από βιομάζα και λοιπά αιωρούμενα στερεά εξωκυτταρικό υγρό οδηγείται για συμπύκνωση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα κενού (Rotary Evaporator), ώστε ο όγκος του δείγματος να είναι διαχειρίσιμος και να ακολουθήσει η απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) με μεθόδους που αναφέρονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.10.5.

2.9.1.2 Συμπύκνωση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας

Αρχή της μεθόδου

Ο περιστροφικός εξάτμιστήρας χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση διαλυμάτων ή την απομάκρυνση των πτητικών ουσιών που περιέχουν. Αποτελείται από ένα θερμόλουτρο, συνήθως με νερό ή λάδι, στο οποίο τοποθετείται μια περιστρεφόμενη φιάλη η οποία περιέχει το δείγμα προς εξάτμιση. Το δείγμα αρχικά θερμαίνεται μέσω του λουτρού θέρμανσης έως ότου η θερμοκρασία φτάσει το σημείο ζέσεως του διαλύτη ή των άλλων πτητικών ουσιών, σημείο στο οποίο ξεκινά η εξάτμιση. Το κενό που εφαρμόζεται αυξάνει την αποτελεσματικότητα της εξάτμισης.

Εφαρμογή της μεθόδου

Το εξωκυτταρικό υγρό που συλλέγεται, λοιπόν, από τις υγρές καλλιέργειες των μελετούμενων στελεχών, συμπυκνώνεται στο 1/10 περίπου του αρχικού του όγκου σε περιστροφικό εξάτμιστήρα κενού με συνθήκες πίεσης $P=70$ mbar και θερμοκρασίας $T=75$ °C.



Εικόνα 2.9.1: Συμπύκνωση εξωκυτταρικού υγρού καλλιέργειας με περιστροφικό εξάτμιστήρα

2.9.2 Παραλαβή βιομάζας

Η συλλεγόμενη βιομάζα ύστερα από το διαχωρισμό των δύο φάσεων του βιοαντιδραστήρα, τοποθετείται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια λυοφιλιώνεται (για 24 ώρες) και ζυγίζεται. Παράλληλα, στις φιάλες που περιείχαν τις υγρές προκαλλιέργειες και δεν εμβολιάστηκαν στον βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων και λυοφιλίωση στη βιομάζα. Από τη ζύγιση της βιομάζας δύο φιαλών προσδιορίζεται το καθαρό βάρος εμβολίου και, με τη ζύγιση που αναφέρθηκε παραπάνω, δηλαδή της συνολικής βιομάζας του βιοαντιδραστήρα, είναι δυνατό να βρεθεί η απόδοση της ανάπτυξης του κάθε στελέχους μακρομύκητα.



Εικόνα 2.9.2: Ληφθείσα βιομάζα *P. citrinopileatus* από θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου μετά από λυοφιλίωση

Οι γλυκάνες της ληφθείσας βιομάζας του βιοαντιδραστήρα απομονώνονται με τις μεθόδους των Song et al. (2008) και Synytsya et al. (2009) με ταυτόχρονη απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών, όπως οι πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι αναλύονται στο υποκεφάλαιο 2.10.6. Ακολουθεί, τέλος, η μέτρηση των πολυσακχαριτών (ακατέργαστης και καθαρής βιομάζας), όπως εξηγείται στο υποκεφάλαιο 2.10.4.

2.10 Χημική ανάλυση

Τα δείγματα που λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας στον βιοαντιδραστήρα (η υγρή τους φάση), αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε σάκχαρα και, στην περίπτωση του κατσίγαρου μόνο ως προς το περιεχόμενο σε φαινολικά και τον αποχρωματισμό του αποβλήτου. Επίσης, η συνολική βιομάζα και το εξωκυτταρικό υγρό που παράχθηκαν από τις καλλιέργειες των βασιδιομυκήτων, αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικές γλυκάνες (α - και β - γλυκάνες)

και εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS), αντίστοιχα. Καθεμία από τις τεχνικές και τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω:

2.10.1 Προσδιορισμός των εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια με τη χρωματομετρική μέθοδο του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της εναπομείνουσας ποσότητας αναγωγικών σακχάρων στα δείγματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος – DNS. (Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31(3), 426-428).

Τα σάκχαρα δρουν ως χημικοί αναγωγείς λόγω της παρουσίας ελεύθερων μονάδων αλδεϋδης ή κετόνης στο μόριό τους. Τα αναγωγικά σάκχαρα έχουν την δυνατότητα να ανάγουν το 3,5 δινιτροσαλικυλικό οξύ σε 3-άμινο-5 νιτροσαλικυλικό οξύ σχηματίζοντας σύμπλοκο ανάμεσα στο ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιό τους και στο αντιδραστήριο DNS κατά τη θέρμανση πάνω από τους 80 °C. Αποτέλεσμα του σχηματισμού του συμπλόκου είναι η εμφάνιση πορτοκαλί χρώματος του οποίου η ένταση εξαρτάται από τη συγκέντρωση σε αναγωγικά σάκχαρα και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm.

Εφαρμογή της μεθόδου

Παρασκευάζονται διαλύματα σύστασης 250 μ L δείγματος καλλιέργειας και 250 μ L αντιδραστήριου DNS. Για κάθε δείγμα-ημέρα βιοαντιδραστήρα, παρασκευάζονται δύο διαλύματα, προκειμένου να υπάρχει στατιστικός έλεγχος των μετρήσεων. Σε περίπτωση που χρειαστεί αραίωση των δειγμάτων, αυτή γίνεται με απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα αναδεύονται στην συσκευή Vortex και μεταφέρονται στο υδατόλουτρο των 100 °C, όπου αφήνονται για 5 min. Αφού ψυχθούν στους 25 °C, προστίθεται ποσότητα απιονισμένου νερού 8-πλάσια της ποσότητας του δείγματος, δηλαδή 2 mL. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 540 nm με το φασματοφωτόμετρο τύπου UV-VIS Cam Spec M302., έπειτα από ανάδευση σε Vortex. Στη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται τυφλό διάλυμα σύστασης 250 μ L απιονισμένου νερού αντί δείγματος καλλιέργειας, στο οποίο εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία της μεθόδου.

Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων εκφράστηκε σε g/L, χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.10.2 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου στην καλλιέργεια με τη χρωματομετρική μέθοδο του Folin-Ciocalteu

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (Waterhouse, A. L. (2001). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.) βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από ενώσεις του φωσφομολυβδαινικού οξέος και του φωσφοβολφραμικού οξέος. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί μείγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραμικού νατρίου (Na_2WO_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) και έτσι προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ιόντων με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Τα οξέα που ανάγονται, σχηματίζουν μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), το οποίο απορροφά στην περιοχή των 760 nm.

Εφαρμογή της μεθόδου

Παρασκευάζονται διαλύματα σύστασης 50 μL δείγματος καλλιέργειας (αν είναι επιθυμητή αραίωση, γίνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6), 3,95 μL απιονισμένου νερού και 250 μL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Για κάθε δείγμα-ημέρα βιοαντιδραστήρα, παρασκευάζονται δύο διαλύματα, προκειμένου να υπάρχει στατιστικός έλεγχος των μετρήσεων. Τα διαλύματα αναδεύονται στη συσκευή Vortex. Ύστερα από ηρεμία για διάστημα 30 sec έως 8 min, στα διαλύματα προστίθενται 750 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και το μείγμα αναδεύεται. Το διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 που προστίθεται κατά την εφαρμογή της μεθόδου ρυθμίζει το αλκαλικό περιβάλλον απαραίτητο για την αναγωγική δράση των φαινολικών. Στη συνέχεια, τα διαλύματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 40 $^\circ\text{C}$, όπου αφήνονται για 30 min και φωτομετρούνται στα 765 nm με το φασματοφωτόμετρο τύπου UV-VIS Cam Spec M302. Στη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται τυφλό διάλυμα, σύστασης 50 μL απιονισμένου νερού έναντι δείγματος καλλιέργειας.

Από την τιμή της απορρόφησης και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων στα δείγματα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

2.10.3 Προσδιορισμός του αποχρωματισμού της καλλιέργειας

Αρχή της μεθόδου

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.

Εφαρμογή της μεθόδου

Στα δείγματα των καλλιιεργειών των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε κατσίγαρο, πραγματοποιείται φωτομέτρηση του εξωκυτταρικού υγρού σε μήκος κύματος 525 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS Cam Spec M302. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH=6, ώστε να συγκριθούν τα δείγματα για τον προσδιορισμό του ποσοστού του αποχρωματισμού τους. Σε δείγματα που θεωρείται απαραίτητη αραιώση, χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών.

2.10.4 Προσδιορισμός γλυκανών

Ο προσδιορισμός των περιεχόμενων γλυκανών στη βιομάζα που προέκυψε από τις βυθισμένες καλλιιεργείες των στελεχών των μελετούμενων βασιδιομυκήτων, καθώς και στους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS) που απομονώθηκαν από τις υγρές καλλιιεργείες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα (Kit): Mushroom and Yeast beta-glucan K-YBGL 09/2013 της Megazyme. Συνήθως τα τυπικά σφάλματα που προκύπτουν κατά τη χρήση αυτής της μεθόδου είναι μικρότερα του 5%.

Υλικά της μεθόδου

Στο kit περιέχονται τα παρακάτω διαλύματα:

- Φιαλίδιο 1: Διάλυμα έξω-1,3-γλουκανάσης (100 U/mL) και β-γλυκοζιδάσης (20 U/mL)
- Φιαλίδιο 2: Διάλυμα αμυλογλυκοσιδάσης (1630 U/mL) και ιμπερτάσης (500 U/mL) σε 50% v/v γλυκερόλη
- Φιαλίδιο 3: Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκόζης PH=7,4
- Φιαλίδιο 4: Ένζυμα προσδιορισμού της γλυκόζης (οξειδάση της γλυκόζης, υπεροξειδάση και 4- αμινοαντιπυρίνη)
- Φιαλίδιο 5: Πρότυπο διάλυμα D-γλυκόζης (1.00mg/mL) σε 0.2% w/v βενζοϊκό οξύ
- Φιαλίδιο 6: Διάλυμα control β-γλυκάνης από ζύμη

Παρασκευάστηκαν, επίσης, τα εξής διαλύματα,

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 200 mM με pH=5 (Διάλυμα A)
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 200mM με pH=3.8 (Διάλυμα B)
- Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου KOH 2M (Διάλυμα C)

ώστε να παρασκευαστούν τα παρακάτω διαλύματα (D, E, F)

- Προστέθηκαν 8mL διαλύματος A στο φιαλίδιο 1 ώστε ο τελικός όγκος να γίνει 10 mL (Διάλυμα D).

- Αραιώθηκε το διάλυμα του φιαλιδίου 3 με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1L (Διάλυμα E)
- Διαλυτοποιήθηκε το φιαλίδιο 4 στο Διάλυμα E και προέκυψε το διάλυμα GOPOD (Διάλυμα F)

Εφαρμογή της μεθόδου

2.10.4.1 Προσδιορισμός των ολικών γλυκανών (α - και β -γλυκάνες) και της D-γλυκόζης στους ολιγοσακχαρίτες, στη σουκρόζη και της ελεύθερης D-γλυκόζης

Σύμφωνα με τη μέθοδο, αρχικά γίνεται η διαλυτοποίηση και των 1,3:1,6- β -D-γλυκανών, 1,3- β -D-γλυκανών και α -γλυκανών, της D-γλυκόζης που περιέχεται στους ολιγοσακχαρίτες, στη σακχαρόζη, και της ελεύθερης D-γλυκόζης και ύστερα η μερική υδρόλυσή τους σε D-γλυκόζη. Τα παρακάτω βήματα αποτελούν τη χημική κατεργασία του δείγματος:

- Λαμβάνεται δείγμα 10 mg και λειοτριβείται, έως ότου αποκτήσει κατάλληλα μικρή κοκκομετρία
- Τοποθετείται σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL
- Προστίθενται 150 μ L πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl), 37% v/v, και το διάλυμα αναδεύεται έντονα στη συσκευή Vortex.
- Το διάλυμα εισάγεται στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C για 45 min και κάθε 15 min αναδεύεται στο Vortex. Σε αυτό το σημείο, διαλυτοποιούνται οι 1,3:1,6- β -D-γλυκάνες, 1,3- β -D-γλυκάνες και οι α -γλυκάνες. Η ανάδευση εξασφαλίζει καλύτερη μεταφορά μάζας του πυκνού οξέος για τη διαλυτοποίησή τους.
- Ακολουθεί η προσθήκη 1 mL απιονισμένου νερού στο σωληνάκι Eppendorf και καλή ανάδευση
- Στη συνέχεια, το σωληνάκι τοποθετείται σε βραστό νερό (100 °C) έχοντας χαλαρό το καπάκι για 5 min και στη συνέχεια, αφήνεται για 2 h στο υδατόλουτρο σε καλά κλεισμένο καπάκι. Στο στάδιο αυτό υδρολύονται μερικώς οι 1,3:1,6- β -D-γλυκάνες, 1,3- β -D-γλυκάνες και οι α -γλυκάνες. Η μερική όξινη υδρόλυση αποσκοπεί στην «απομάκρυνση» των ιδιοτήτων ζελατινοποίησης και των ομοιοπολικών δεσμών με άλλους πολυσακχαρίτες (π.χ. χιτίνη) ή πρωτεΐνες.
- Στο τέλος των 2 ωρών, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει στους 25 °C και μεταφέρεται σε σωληνάρια falcon 15 mL, ώστε να προστεθεί 1 mL KOH 2M (Διάλυμα C). Η προσθήκη βασικού διαλύματος εξουδετερώνει το όξινο HCl.
- Ακολουθεί ποσοτική μεταφορά σε 10 mL ογκομετρική φιάλη, η οποία πληρώνεται με το διάλυμα A μέχρι τη χαραγή. Η μεταφορά είναι ιδιαίτερα προσεκτική, ώστε να μην χαθεί δείγμα, γι' αυτό γίνεται με τη βοήθεια πιπέτας.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στα 3000 rpm

Η υδρόλυση των ενδιαφερόμενων α- και β- γλυκανών σε D- γλυκόζη ολοκληρώνεται με την επώαση του δείγματος σε ένα μείγμα υψηλής καθαρότητας έξω-1,3-β-γλουκανάσης και β-γλυκοζιδάσης. Η μέτρηση των ολικών γλυκανών, της D-γλυκόζης που περιέχεται στην σακχαρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης γίνεται μέσω ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ένζυμα προσδιορισμού της γλυκόζης. Τα παρακάτω βήματα, επομένως, αφορούν την ενζυμική κατεργασία του δείγματος, που ακολουθεί της χημικής.

- Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, μεταφέρονται κλάσματα όγκου 100μL σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, εις διπλούν για κάθε δείγμα.
- Προστίθενται 100μL του διαλύματος D και ακολουθεί ανάδευση
- Στη συνέχεια, τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 1h
- Στο τέλος της μιας ώρας, προστίθενται 3mL διαλύματος GOPOD (Διάλυμα F) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
- Τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 20 min
- Μετράται η απορρόφηση των διαλυμάτων στα 510nm έναντι διαλύματος τυφλού. Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 200μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου με pH=5 (Διάλυμα A) και 3mL διαλύματος GOPOD, το οποίο επωάζεται μαζί με τα δείγματα κατά το παραπάνω βήμα (στους 40 °C για 20 min)
- Παράλληλα, στην τελευταία επώαση μαζί με το τυφλό, εισάγεται και δείγμα (control) με πρότυπο διάλυμα D- γλυκόζης (φιαλίδιο 5) με την εξής σύσταση: 100 μL πρότυπου διαλύματος D- γλυκόζης, 100 μL διαλύματος A και 3mL διαλύματος GOPOD

2.10.4.2 Προσδιορισμός των α- γλυκανών (φυτογλυκογόνο και άμυλο), της D-γλυκόζης στη σουκρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης

Τα βήματα για τον προσδιορισμό των α- γλυκανών μπορούν να χωριστούν, και εδώ, σε χημική και ενζυμική κατεργασία. Στη χημική κατεργασία καλύπτεται η διαλυτοποίηση των α- γλυκανών, ενώ δεν είναι απαραίτητη η όξινη υδρόλυση, όπως στην περίπτωση των ολικών γλυκανών. Αυτό συμβαίνει διότι, ενώ μερικές β-γλυκάνες διαλύονται εύκολα σε ζεστό νερό ή ζεστό KOH, αυτοί οι διαλύτες δεν είναι αποτελεσματικοί για τη διαλυτοποίηση των β-γλυκανών που προέρχονται από ζύμες ή μανιτάρια. τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Λαμβάνεται δείγμα 10 mg και λειοτριβείται
- Τοποθετείται σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL
- Προστίθενται 200 μL KOH 2M (Διάλυμα C)
- Τα διαλύματα τοποθετούνται σε λουτρό πάγου για 20 min υπό ανάδευση για τη διαλυτοποίηση των α-γλυκανών

Η ενζυμική κατεργασία που ακολουθεί στοχεύει στην υδρόλυση των α-γλυκανών με διαλύματα ενζύμων αμυλογλυκοσιδάσης και ιμπερτάσης και στη μέτρηση των α-γλυκανών (φυτογλυκογόνο και άμυλο), της D- γλυκόζης στη σουκρόζη και της ελεύθερης D- γλυκόζης με ένζυμα προσδιορισμού της γλυκόζης.

- Μετά την επώαση στο λουτρό πάγου, προστίθενται 800 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου με $\text{pH}=3.8$ (Διάλυμα Β) και ακολουθεί ανάδευση
- Προστίθενται αμέσως μετά την ανάδευση, 200 μL διαλύματος αμυλογλυκοζιδάσης (1630 U/mL) και ιμπερτάσης (500 U/mL) (φιαλίδιο 2) και το διάλυμα αναδεύεται ξανά
- Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 30 min με ανάδευση ανά 5 min. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται υδρόλυση των α- γλυκανών
- Μετά την επώαση, τα διαλύματα φυγοκεντρώνται στη μικροφυγόκεντρο πάγκου Eppendorf 3200 για 1-2 min
- Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, μεταφέρονται κλάσματα όγκου 100 μL σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, εις διπλούν για κάθε δείγμα.
- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 100 μL διαλύματος Α και 3mL διαλύματος GOPOD
- Στη συνέχεια, τα διαλύματα επωάζονται στους 40 °C για 20min
- Μετράται η απορρόφησή τους στα 510nm έναντι τυφλού δείγματος, Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε 200 μL διαλύματος Α και 3mL διαλύματος GOPOD. Το διάλυμα αυτό επωάζεται μαζί με τα δείγματα, σύμφωνα με το παραπάνω βήμα (στους 40 °C για 20 min).

2.10.5 Απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS)

Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες αποτελούν ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και παράγονται σε διάφορα μεταβολικά στάδια των μυκήτων. Συμβάλουν στη συσσωμάτωση, στη καθίζηση και στο σχηματισμό βιοκροκίδων και βιομεμβρανών κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης των υγρών αποβλήτων (Lin et al. 2014).

Εφαρμογή της μεθόδου

Ύστερα από τη συμπύκνωση των υγρών καλλιέργειας, όπως εξηγήθηκε στο υποκεφάλαιο 2.9.1.2, προστίθεται τετραπλός όγκος EtOH 99,9% v/v σύμφωνα με τη μέθοδο των Kim et al. (2002). Το δείγμα αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα για 10 min σε ένα ποτήρι ζέσεως, αφού προστεθεί πλαστική μεμβράνη στην κορυφή του ποτηριού (για αποφυγή εξάτμισης της αιθανόλης). Στη συνέχεια, αφήνεται σε ηρεμία για 24h στους 4°C, ώστε να καταβυθιστούν οι πολυσακχαρίτες. Η απομόνωσή τους γίνεται με απόχυση της αιθανόλης, αφού βεβαιωθεί με φυγοκεντρίσεις του υγρού (στα 3000 rpm) ότι δεν υπάρχει στερεή φάση σ' αυτή. Το ίζημα που απομονώνεται ξηραίνεται για 1 h στους 60 °C, ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη και οδηγείται στους -80 °C. Ακολουθεί η λυοφιλίωση του στη συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (για 18

h) και η ζύγιση του ξηρού, πλέον, δείγματος. Στην περίπτωση που η μάζα του δείγματος είναι μεγάλη και δεν έχει ξηραθεί με μία λυοφιλίωση, τότε η διαδικασία της ξήρανσης επαναλαμβάνεται μέχρι το δείγμα να είναι απόλυτα ξηρό και να μετρηθούν οι ολικές και οι α-γλυκάνες, όπως έχει αναλυθεί στο υποκεφάλαιο 2.10.4.

2.10.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας

Η απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας ακολουθεί την παραλαβή της από τους βιοαντιδραστήρες και την ξήρανσή της, όπως αναφέρει το υποκεφάλαιο 2.9.2. Δοκιμάστηκαν δύο μεθοδολογίες στα δείγματα των βιοαντιδραστήρων, των Song et al. (2008) και Synytsya et al. (2009). Συγκεκριμένα στη μέθοδο των Synytsya et al. (2009), κλάσματα υδατο- και αλκαλι- διαλυτών, και αδιάλυτων πολυσακχαριτών απομονώθηκαν από τα στελέχη των μελετούμενων μακρομηκτών εφαρμόζοντας την μέθοδο των Freimund et al. (2003).

2.10.6.1 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας με τη μέθοδο των Song et al. (2008)

Αρχικά, η βιομάζα του μακρομύκητα ομογενοποιείται σε διπλάσιο όγκο απιονισμένου νερού σε ένα μπλέντερ για 2 min. Στη συνέχεια επωάζεται για 4-5 ημέρες στους 90-100 °C. Έπειτα, η στερεή φάση (**Ίζημα 1 – I1**) διαχωρίζεται με φυγοκέντριση από την υγρή στα 3000 rpm για 15 min. Στο υπερκείμενο, όπου αναμένονται οι πολυσακχαρίτες, προστίθεται τριπλάσιος όγκος EtOH 99,9% v/v και αφήνεται σε ηρεμία για 24h στους 4°C. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα, φυγοκεντρείται στα 3000 rpm για 15 min και συλλέγεται η στερεή φάση. Επαναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού (μέχρι 5 mL) και συμπληρώνεται με EtOH 70% v/v (μέχρι 50 mL). Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 3000 rpm για 15 min και συλλογή του ιζήματος (**Ίζημα 2 – I2**), το οποίο ξηραίνεται για 1 h στους 60 °C, προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη. Τόσο το Ίζημα 1 όσο και το Ίζημα 2 αποθηκεύονται στους -80 °C, ώστε, τελικά, να λυοφιλωθούν και να μετρηθούν οι ολικές γλυκάνες, σύμφωνα με το υποκεφάλαιο 2.10.4.



Εικόνα 2.10.1: Διάταξη μεθοδολογίας Song et al.

2.10.6.2 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας με τη μέθοδο των Synytsya et al. (2009)

Η συλλεγμένη ξηρή βιομάζα των βιοαντιδραστήρων λειοτριβείται και προστίθεται σε EtOH 80% v/v (μέχρι 70 mL) και το διάλυμα αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 5-10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται και συλλέγεται η στερεή φάση, η οποία πλένεται εκ νέου με απιονισμένο νερό και φυγοκεντρείται στα 3000 rpm για 10 min. Στο ίζημα που παραλαμβάνεται προστίθενται 100 mL υπερκάθαρο νερό και το διάλυμα επωάζεται στους 100 °C για 6 h, ώστε να εκχυλιστούν στο νερό οι πολυσακχαρίτες. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 3000 rpm για 15 min και χωρίζεται στην υγρή και τη στερεή φάση.

- Υπερκείμενο (Υγρή φάση - Υ)

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 7 χρησιμοποιώντας τα διαλύματα HCl 1 M και NaOH 1 M. Στην συνέχεια, προστίθενται 5 mg του ενζύμου α- αμυλάσης που έχει απομονωθεί από τον *Bacillus subtilis* και το διάλυμα επωάζεται στους 25 °C για 30 min υπό ήπια ανάδευση. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται οι α-γλυκάνες. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών στο διάλυμα, ακολουθεί κατεργασία με το αντιδραστήριο SEVAG (chloroform/1-butanol, 4:1 v/v) σε αναλογία 1:5 του όγκου του διαλύματος. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 20 min στους 25 °C και φυγοκεντρείται στα 3000 rpm για 15 min. Έστερα από τον διαχωρισμό των

φάσεων, το ίζημα απορρίπτεται, ενώ στο υπερκείμενο ακολουθείται η ίδια διαδικασία (προσθήκη SEVAG στο 1:5 του όγκου, ανάδευση και φυγοκέντριση). Η κατεργασία με το αντιδραστήριο SEVAG επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειάζεται, ώστε στο ίζημα που απορρίπτεται να μην υπάρχει η αδιάλυτη φάση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, επαναλήφθηκε 5 φορές. Για την καθίζηση των πολυσακχαριτών, προστίθεται τετραπλός όγκος EtOH 99,9% v/v στο υπερκείμενο και αφήνεται σε ηρεμία για 24h στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντριση και συλλογή του ιζήματος, πλύση του με EtOH 70% v/v και ξανά φυγοκέντριση στα 3000 rpm για 15 min για τη συλλογή του τελικού ιζήματος. Προκειμένου να εξατμιστεί η EtOH, το ίζημα οδηγείται στους 60 °C για 1h και αποθηκεύεται στους -80 °C για να λυοφιλιωθεί.

- Στερεή φάση

Το ίζημα που παραλαμβάνεται εκχυλίζεται με 50 mL NaOH 1M, 0,05% NaBH₄ και επωάζεται στους 4 °C για 4 h υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντριση του διαλύματος στα 3000 rpm για 15 min και ο διαχωρισμός του σε δύο φάσεις, την υγρή και την στερεή (Σ). Στη συνέχεια, διορθώνεται το pH στην υγρή φάση και καθιζάνει ίζημα (**Αλκαλιδιαλυτό 1 – A1**), το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντριση από το υπερκείμενο (**Αλκαλιδιαλυτό 2 – A2**). Το A1 λυοφιλιώνεται, προκειμένου να ξηραθεί, ενώ στο A2 ακολουθείται η ίδια διαδικασία με το κλάσμα Y (επώαση με α-αμυλάση κ.ο.κ.).

Σο ίζημα Σ προστίθεται λίγο νερό και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 7 με τα διαλύματα HCl 1 M και NaOH 1 M. Στη συνέχεια, προστίθεται ποσότητα απιονισμένου νερού ώστε ο όγκος να φτάσει τα 50 mL και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα για 10 min. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 min στα 3000 rpm και το ίζημα συλλέγεται και επαναδιαλύεται σε 50 mL EtOH 99,9% v/v. Ύστερα από ανάδευση 10 min, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 min στα 3000 rpm και το ίζημα αφήνεται στους 60 °C για 1h (ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη) και αποθηκεύεται στους -80 °C για να λυοφιλιωθεί.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 *Ganoderma lucidum* 9720

3.1.1 Υγρές προκαλλιέργειες

Η ανάπτυξη του *G. lucidum* στις υγρές προκαλλιέργειες διακόπηκε την 33^η ημέρα, όπου ο μακρομύκητας είχε ικανοποιητική ανάπτυξη, κατάλληλη για τον εμβολιασμό στον κάθε βιοαντιδραστήρα διαφορετικού θρεπτικού υποστρώματος. Το βάρος του εμβολίου προσδιορίστηκε από τις υπόλοιπες φιάλες της προκαλλιέργειας, οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν και η βιομάζα που διαχωρίστηκε λυοφιλιώθηκε και ζυγίστηκε. Συγκεκριμένα, το εμβόλιο περιείχε **3,8 g** ξηρής βιομάζας ή **2,2 g/L** ξηρής βιομάζας και στους δύο βιοαντιδραστήρες.

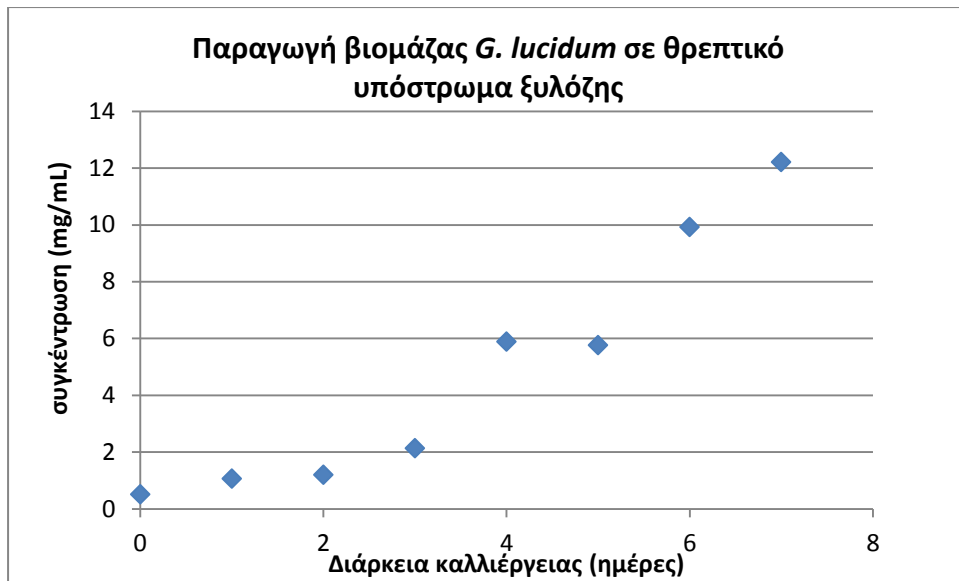
3.1.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

3.1.2.1 Διάρκεια και Απόδοση βιοαντιδραστήρα

Η καλλιέργεια του *G. lucidum* στο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη διήρκησε 7 ημέρες. Στο τέλος της καλλιέργειας είχαν παραχθεί συνολικά **3,13 g** ξηρής βιομάζας, ενώ ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού ογκομετρήθηκε και ήταν ίσος με **1180 mL**.

3.1.2.2 Παραγωγή βιομάζας

Η καθημερινή λήψη δειγμάτων από τον βιοαντιδραστήρα επέτρεψε την παρακολούθηση της αναπτυσσόμενης βιομάζας του *G. lucidum*. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η μεταβολή της ανάπτυξης της μυκηλιακής βιομάζας:

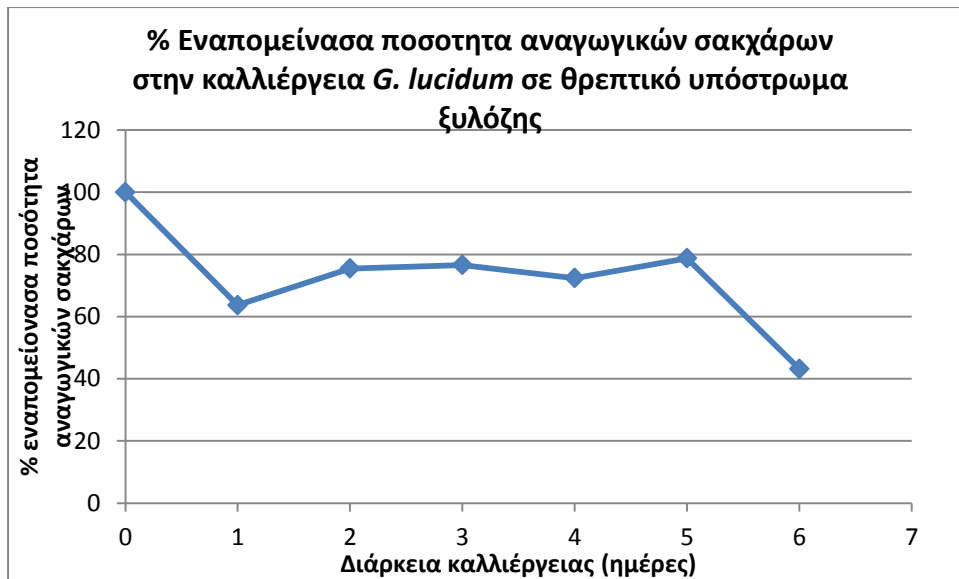


Διάγραμμα 3.1.1: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Παρατηρείται ανοδική τάση στην παραγωγή βιομάζας του *G. lucidum*, ιδιαίτερα από την 3^η ημέρα και μετά.

3.1.2.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Η κατανάλωση των αναγωγικών σακχάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DNS, όπως έχει αναπτυχθεί στο υποκεφάλαιο 2.10.1. Ακολουθεί το διάγραμμα που υποδεικνύει τη μεταβολή των % εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Θεωρείται ότι για $t=0$ η ποσότητα των αναγωγικών σακχάρων είναι 100%. Η εναπομείνασα ποσότητα αναγωγικών σακχάρων σε όλες τις καλλιέργειες των στελεχών υπολογίστηκε με βάση τη συμπύκνωση που υπέστη το υγρό καλλιέργειας από τη βιομάζα. Καθώς αυξάνεται η βιομάζα δηλαδή, κατακρατείται μεγαλύτερη ποσότητα υγρού καλλιέργειας στο αυξανόμενο μυκήλιο, συνεπώς ο όγκος του υγρού μειώνεται και η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται (εφόσον συμπυκνώνονται).



Διάγραμμα 3.1.2: Μεταβολή % εναπομείοντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *G. lucidum* σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Στο διάγραμμα 3.1.2 φαίνεται η μείωση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων γενικότερα. Ωστόσο, κατά τις ημέρες 3-5 παρουσιάζεται μικρή αύξηση των εναπομείοντων αναγωγικών σακχάρων, η οποία ίσως μπορεί να δικαιολογηθεί λαμβάνοντας υπόψη τα προϊόντα μεταβολισμού του *G. lucidum*. Το διάγραμμα αυτό, μάλιστα, συμφωνεί με το 3.1.1, καθώς από την 5^η ημέρα και μετά παρατηρείται μεγάλη μείωση των αναγωγικών σακχάρων με ταυτόχρονη αύξηση της βιομάζας του μακρομύκητα.

3.1.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

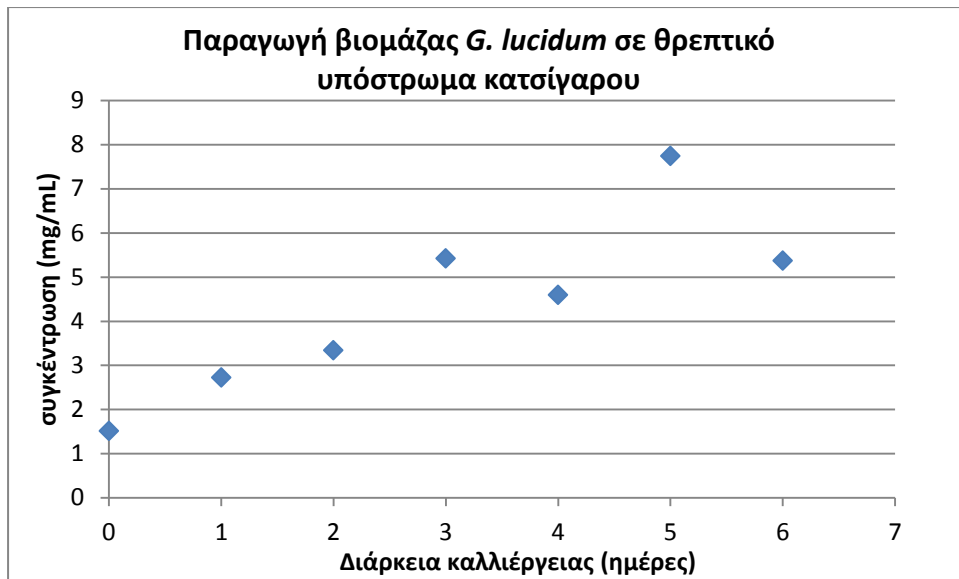
3.1.3.1 Διάρκεια και Απόδοση βιοαντιδραστήρα

Η καλλιέργεια του *G. lucidum* στο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου διήρκησε 6 ημέρες. Παράχθηκαν συνολικά **4,386 g** ξηρής βιομάζας, ενώ ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού που ογκομετρήθηκε στο τέλος της καλλιέργειας ήταν ίσος με **1240 mL**. Η απόδοση της καλλιέργειας, σύμφωνα με τα 3,8 g ξηρής βιομάζας που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο είναι ίση με **15,4%**.

3.1.3.2 Παραγωγή βιομάζας

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης της μυκηλιακής βιομάζας του *G. lucidum* έγινε δυνατή λόγω των καθημερινών δειγμάτων από τον βιοαντιδραστήρα.

Στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης της βιομάζας στο διάστημα της καλλιέργειας:

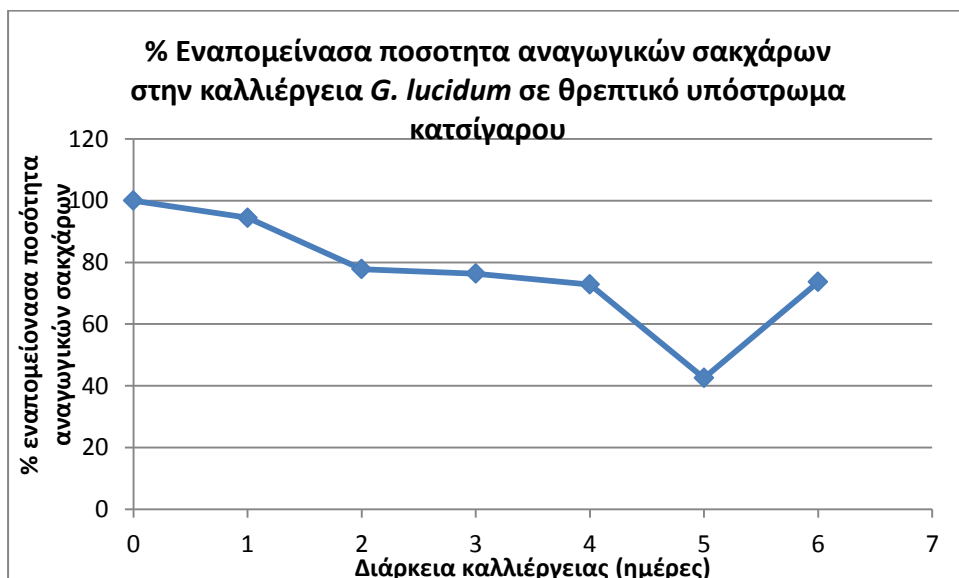


Διάγραμμα 3.1.3: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

Η βιομάζα του *G. lucidum* παρουσιάζει μεγαλύτερες διακυμάνσεις από ότι στην περίπτωση της ανάπτυξής του σε ξυλόζη. Επίσης, στο τέλος της καλλιέργειας η μυκηλιακή βιομάζα αρχίζει να μειώνεται, πιθανώς έχοντας φτάσει στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης.

3.1.3.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Το παρακάτω διάγραμμα υποδεικνύει τη μεταβολή των % εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας:



Διάγραμμα 3.1.4: Μεταβολή % εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *G. lucidum* σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

Μέχρι την 5^η ημέρα της καλλιέργειας παρατηρείται μείωση των εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων. Η αύξηση που παρουσιάζεται την έκτη ημέρα οφείλεται πιθανόν στην παρουσία προϊόντων μεταβολισμού του μακρομύκητα.

3.1.3.4 Κατανάλωση φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin Ciocalteu, όπως έχει εξηγηθεί στο υποκεφάλαιο 2.10.2. Θεωρείται ότι στη στιγμή $t=0$ δεν έχει υπάρξει διάσπαση των φαινολικών ενώσεων, άρα το ποσοστό μείωσης είναι μηδενικό.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται το ποσοστό μείωσης των φαινολικών ενώσεων στην καλλιέργεια *G. lucidum* σε θρεπτικό υπόστρωμα κασιίγαρου:

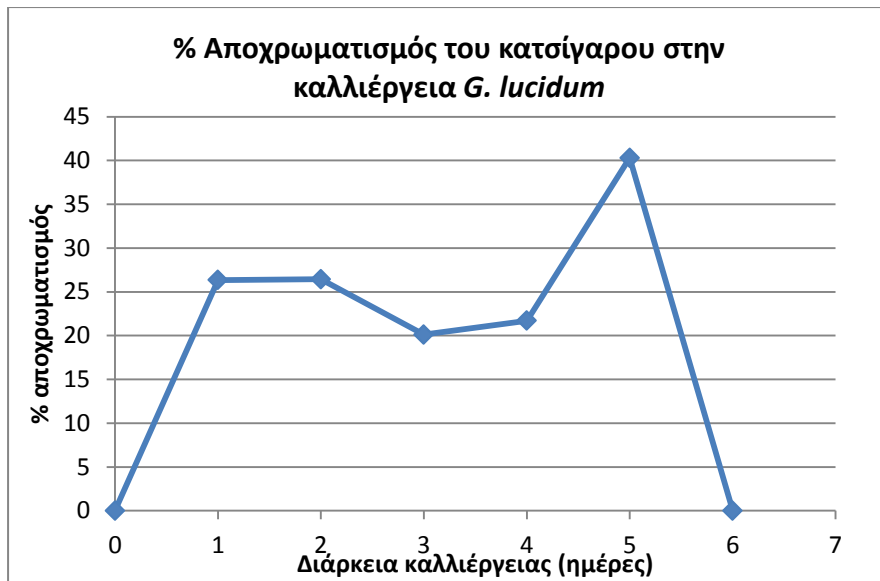


Διάγραμμα 3.1.5: Ποσοστό μείωσης φαινολικών ενώσεων στην καλλιέργεια *G. lucidum* σε θρεπτικό υπόστρωμα κασιίγαρου

Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται μείωση των φαινολικών ενώσεων και ειδικότερα την 5^η ημέρα, όπου το ποσοστό φτάνει το 30%. Αντίθετα, την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας, η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων φαίνεται να αυξάνει, γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από τον *G. lucidum*. Συγκεκριμένα, η παραγωγή μελανίνης, η οποία αντιδρά με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu, οδηγεί στην αύξηση των ολικών φαινολών. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη.

3.1.3.5 Αποχρωματισμός αποβλήτου

Ο αποχρωματισμός του αποβλήτου μετράται σύμφωνα με τη μέθοδο που εξηγείται στο υποκεφάλαιο 2.10.3. Το διάγραμμα που προκύπτει από τις φωτομετρήσεις των δειγμάτων, έχοντας πάρει την $t=0$ ως τη στιγμή του μηδενικού αποχρωματισμού, φαίνεται παρακάτω:



Διάγραμμα 3.1.6: % Αποχρωματισμός του κατσίγαρου στην καλλιέργεια *G. lucidum*

Το στέλεχος του *G. lucidum* πέτυχε τον αποχρωματισμό του αποβλήτου, μέχρι και 40% την 5^η ημέρα. Την τελευταία ημέρα, ωστόσο, είναι πιθανό να συνέβαλαν στη φωτομέτρηση του αποχρωματισμού (μέθοδος 2.10.3) και άλλα προϊόντα που παρήχθησαν, τα οποία συντέλεσαν στην αύξηση του χρώματος. Μάλιστα, θεωρείται ότι τα προϊόντα ήταν φαινολικές ενώσεις, σύμφωνα με το διάγραμμα 3.1.5.

3.1.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS)

Την συμπύκνωση των εξωκυτταρικών υγρών ακολούθησε η απομόνωση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Η παραγόμενη ποσότητα EPS που ζυγίστηκε μετά τη διαδικασία που αναλύεται στο υποκεφάλαιο 2.10.5, δίνονται στον επόμενο πίνακα. Επίσης, προσδιορίζεται και η συγκέντρωση των EPS στα εξωκυτταρικά υγρά, σύμφωνα με τον αρχικό όγκο τους (πριν τη συμπύκνωση)

Πίνακας 3.1.1: Παραγόμενη ποσότητα EPS στην καλλιέργεια του *G. lucidum*

Ποσότητα EPS <i>G. lucidum</i>	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο
Ξηρό βάρος (g)	53,88	26,07
Συγκέντρωση (mg/mL)	45,65	21,02

Διαπιστώνεται αύξηση στην παραγωγή EPS κατά 53,9% στην περίπτωση της καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, σε σχέση με τον κατσίγαρο. Μάλιστα, η παραγόμενη ποσότητα είναι ιδιαίτερα υψηλή στο θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, γεγονός που αναμενόταν για το στέλεχος *G. lucidum*.

3.1.5 Προσδιορισμός γλυκανών

Τα ποσοστά των ολικών, των α- και των β- γλυκανών προσδιορίστηκαν (μέσω της μεθοδολογίας που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 2.10.4) στην παραγόμενη βιομάζα και στους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες της κάθε καλλιέργειας.

Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τις ποσότητες των γλυκανών και στα δύο είδη καλλιέργειας του *G. lucidum*.

Πίνακας 3.1.2: Περιεκτικότητες ολικών, α- και β- γλυκανών (% w/w) από την ανάπτυξη του *G. lucidum*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Βιομάζα			EPS		
	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)
ξυλόζη	5,35	0,17	5,18	3,18	0,23	2,95
κατσίγαρο	4,83	0,12	4,71	1,98	0,42	1,56

Διαπιστώνεται μεγαλύτερο ποσοστό ολικών γλυκανών στην καλλιέργεια του *G. lucidum* σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου, τόσο στη βιομάζα όσο και στους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Επίσης, οι β- γλυκάνες είναι κατά 96,7% και 97,5% περισσότερες από τις α- γλυκάνες στη βιομάζα που έχει αναπτυχθεί σε ξυλόζη και κατσίγαρο, αντίστοιχα. Το ποσοστό μειώνεται σχετικά για τα EPS, αφού οι β- γλυκάνες είναι περισσότερες κατά 73% από τις α-γλυκάνες στο θρεπτικό του κατσίγαρου.

3.1.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας

Ο καθαρισμός της βιομάζας από ανεπιθύμητες ουσίες και η απομόνωση των πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Synytsya et al. (2009), όπως έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 2.10.6.2. οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό, καθώς και τα προϊόντα της μεθοδολογίας απομόνωσης των γλυκανών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1.3: Καθαρισμός βιομάζας *Ganoderma lucidum* – αρχικές ποσότητες και προϊόντα

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Αρχική ποσότητα (g)	Προϊόντα			
		Υδατοδιαλυτό - (Y) (mg)	Αλκαλιδιαλυτό - (A1) (mg)	Αλκαλιδιαλυτό - (A2) (mg)	Στερεό - (Σ) (mg)
ξυλόζη	2.621	2.3	120	28.7	67.3
κατσίγαρο	1.582	3.2	123	18.3	87.4

Τα ιζήματα Υ και Α2 που συλλέχθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία έχουν πολύ μικρό βάρος, που δεν επέτρεψε τη μέτρηση των ολικών και α-γλυκανών. Ωστόσο, στα προϊόντα Σ και Α1 μετρήθηκαν οι περιεχόμενες γλυκάνες, όπως αναφέρεται στο επόμενο υποκεφάλαιο.

3.1.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωση τους από τη βιομάζα

Τα προϊόντα της μεθοδολογίας απομόνωσης των γλυκανών της βιομάζας του *G. lucidum* που είχαν επαρκή ποσότητα προκειμένου να μετρηθούν οι γλυκάνες, ήταν το στερεό κλάσμα (Σ) και το Αλκαλιδιαλυτό Α1. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα ποσοστά (% w/w) των ολικών, των α- και β- γλυκανών των δειγμάτων που εξετάστηκαν:

Πίνακας 3.1.4: Περιεκτικότητες ολικών, α- και β- γλυκανών (% w/w) γλυκανών μετά από την απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας του *G. lucidum*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Στερεό (Σ)			Αλκαλιδιαλυτό 1 (Α1)		
	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)
ξυλόζη	16,36	0,02	16,34	5,58	0,08	5,50
κατσίγαρο	12,61	0,11	12,50	4,68	0,06	4,62

Παρατηρείται μεγάλη ποσότητα γλυκανών (% w/w) στο στερεό προϊόν, που δεν αναμενόταν μετά από την απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας. Ουσιαστικά, η μέτρηση των γλυκανών στο κλάσμα αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να διαπιστωθεί η απόδοση της μεθοδολογίας των Synytsya et al.. Επομένως σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτό και τις χαμηλές τιμές γλυκανών στο ίζημα από pH, διαπιστώνεται πως η μέθοδος δεν έχει πετύχει σε ικανοποιητικό βαθμό την απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας.

Πίνακας 3.1.3: Ποσοστό ανάκτησης ολικών, α- και β- γλυκανών μετά από την απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας του *G. lucidum*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Στερεό (Σ)			Αλκαλιδιαλυτό 1 (Α1)		
	Ολικές γλυκάνες	α- γλυκάνες	β- γλυκάνες	Ολικές γλυκάνες	α- γλυκάνες	β- γλυκάνες
ξυλόζη	7,85%	0,30%	8,10%	4,78%	2,15%	4,86%
κατσίγαρο	14,4%	5,06%	14,7%	7,53%	3,89%	7,63%

Από τον πίνακα 3.1.5 είναι φανερό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των γλυκανών έχει περάσει στο προϊόν Σ, κάτι που ήταν ανεπιθύμητο. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του κατσίγαρου, οι β- γλυκάνες ανακτώνται κατά 14,7% στο προϊόν Σ και κατά

7,63% στο A1, ενώ και στην ξυλόζη επικρατεί παρόμοια εικόνα, με το Σ να έχει ποσοστό ανάκτησης ολικών γλυκανών 7,85% και το A1 να έχει μόλις 4,78%.

3.2 *Pleurotus ostreatus* 1123

3.2.1 Υγρές προκαλλιέργειες

Η ανάπτυξη του *P. ostreatus* διήρκησε 14 ημέρες. Εν συνεχεία, οι προκαλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό των βιοαντιδραστήρων. Το βάρος του εμβολίου προσδιορίστηκε από τις υπόλοιπες φιάλες (6) της προκαλλιέργειας, οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν και η βιομάζα που διαχωρίστηκε, λυοφιλιώθηκε και ζυγίστηκε. Συγκεκριμένα, το εμβόλιο περιείχε **0,924 g** ξηρής βιομάζας ή **0,54 g/L** ξηρής βιομάζας και στους δύο βιοαντιδραστήρες.

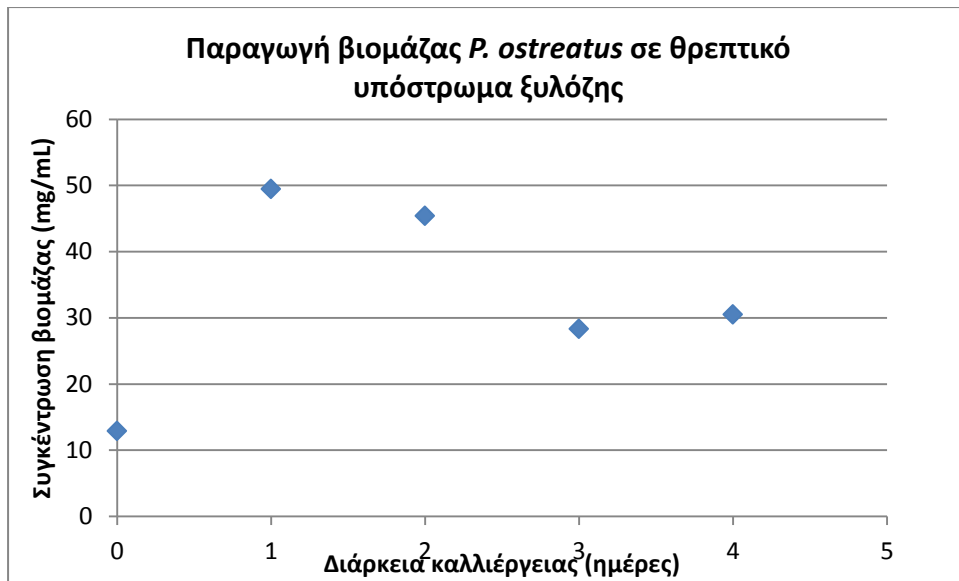
3.2.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

3.2.2.1 Διάρκεια και απόδοση βιοαντιδραστήρα

Η καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη διήρκησε 4 ημέρες. Παράχθηκαν συνολικά **8,792 g** ξηρής βιομάζας, ενώ ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού που ογκομετρήθηκε στο τέλος της καλλιέργειας ήταν ίσος με **1345 mL**. Η απόδοση της καλλιέργειας, σύμφωνα με τα 0,924 g ξηρής βιομάζας που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο, είναι ίση με **852%**.

3.2.2.2 Παραγωγή βιομάζας

Ύστερα από τη καθημερινή δειγματοληψία και τη λυοφιλίωση της βιομάζας του *P. ostreatus*, προέκυψε το παρακάτω γράφημα της μεταβολής της συγκέντρωσης της βιομάζας του μακρομύκητα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μεγάλη αύξηση της βιομάζας κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας έκανε αδύνατη τη μέτρηση της κυτταρικής συγκέντρωσης με ακρίβεια, καθώς λόγω του μεγάλου μεγέθους των μυκηλιακών σωματιδίων, η δειγματοληψία ήταν δύσκολη και το δείγμα μη αντιπροσωπευτικό. Το κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε ήταν η παρουσία της βιομάζας στα τοιχώματα του βιοαντιδραστήρα και το σφαιρικό σχήμα τους, το οποίο δεν επέτρεπε την ανεμπόδιστη έξοδό του από τον δειγματολήπτη.

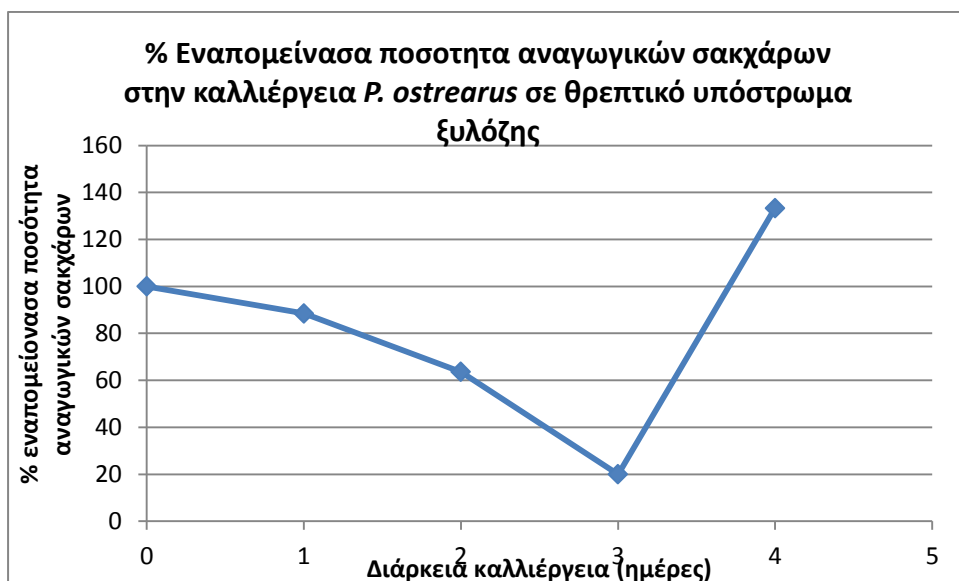


Διάγραμμα 3.2.1: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Φαίνεται ότι η ανάπτυξη της βιομάζας του *P. ostreatus* ξεκινάει από την εκθετική φάση, επομένως η λανθάνουσα φάση ήταν πολύ μικρή και δεν εντοπίστηκε ανάμεσα στα δείγματα της στιγμής του εμβολιασμού ($t=0$) και της 1^{ης} ημέρας. Επίσης, από την 3^η ημέρα αρχίζει η στάσιμη φάση της ανάπτυξης, όπου η συγκέντρωση του μακρομύκητα μένει σχετικά σταθερή.

3.2.2.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Ακολουθεί το διάγραμμα που υποδεικνύει τη μεταβολή των % εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων κατά τη διάρκεια των 4 ημερών της καλλιέργειας:



Διάγραμμα 3.2.2: Μεταβολή % εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *P. ostreatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Οι μετρήσεις παρουσιάζουν σταδιακή μείωση στη συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων, η οποία μεγιστοποιείται την τρίτη ημέρα (έως 80%). Την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας, ωστόσο, η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό, το οποίο πιθανόν εξηγείται από τις αδυναμίες της μεθόδου. Γενικά, η μέθοδος DNS επηρεάζεται από την ύπαρξη φαινολών και αμινοξέων στο δείγμα, δύο παράγοντες που οδηγούν στην υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων. Επομένως, στο τέλος της καλλιέργειας πιθανόν υπάρχουν τα παραπάνω προϊόντα μεταβολισμού, τα οποία επηρεάζουν τις μετρήσεις της μεθόδου.

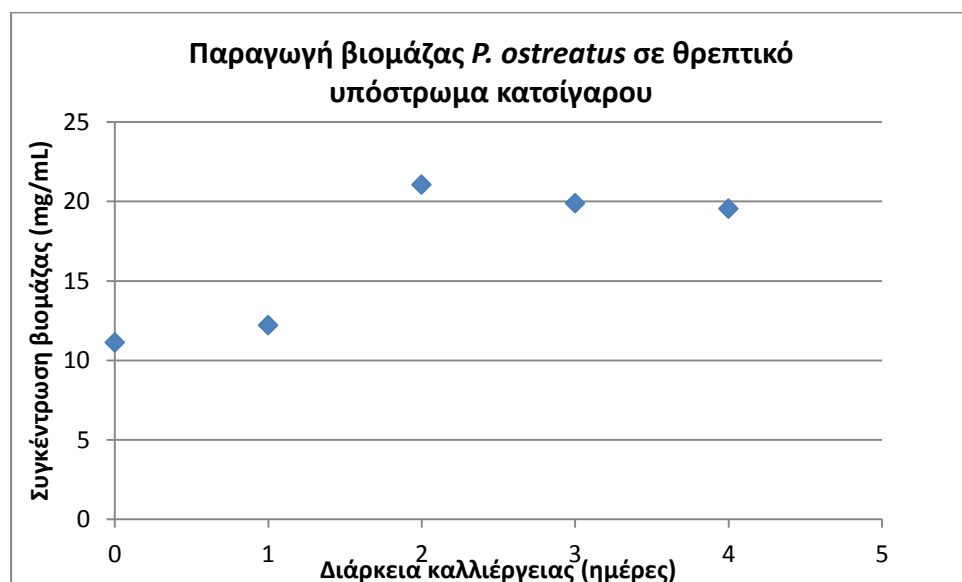
3.2.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

3.2.3.1 Διάρκεια και απόδοση βιοαντιδραστήρα

Η καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου διήρκεσε 4 ημέρες. Η συνολική παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας ήταν **11,754 g** ξηρής βιομάζας και ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού που ήταν ίσος με **1260 mL**. Η απόδοση της καλλιέργειας (αρχικό εμβόλιο: 0,924 g ξηρής βιομάζας) είναι ίση με **1172%**.

3.2.3.2 Παραγωγή βιομάζας

Με την ίδια διαδικασία που έχει παρουσιαστεί παραπάνω, προκύπτει η ακόλουθη διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής της ανάπτυξης του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας:

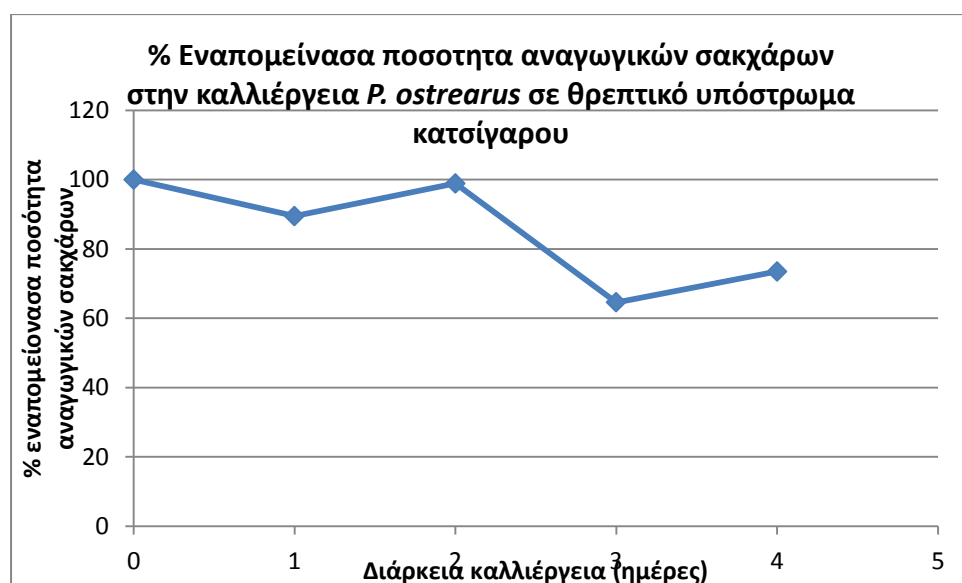


Διάγραμμα 3.2.3: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

Στην καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου, φαίνεται πως υπάρχει μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση, σε αντίθεση με το υπόστρωμα ξυλόζης, που βασίζεται στη διαφορά υποστρώματος μεταξύ της προκαλλιέργειας και του βιοαντιδραστήρα του στελέχους. Επίσης, διαπιστώνεται ότι την 3^η ημέρα αρχίζει η στάσιμη φάση της ανάπτυξης του *P. ostreatus*.

3.2.3.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Η μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων κατά τη διάρκεια των 4 ημερών του βιοαντιδραστήρα όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DNS, φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 3.2.4: Μεταβολή% εναπομείοντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *P. ostreatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

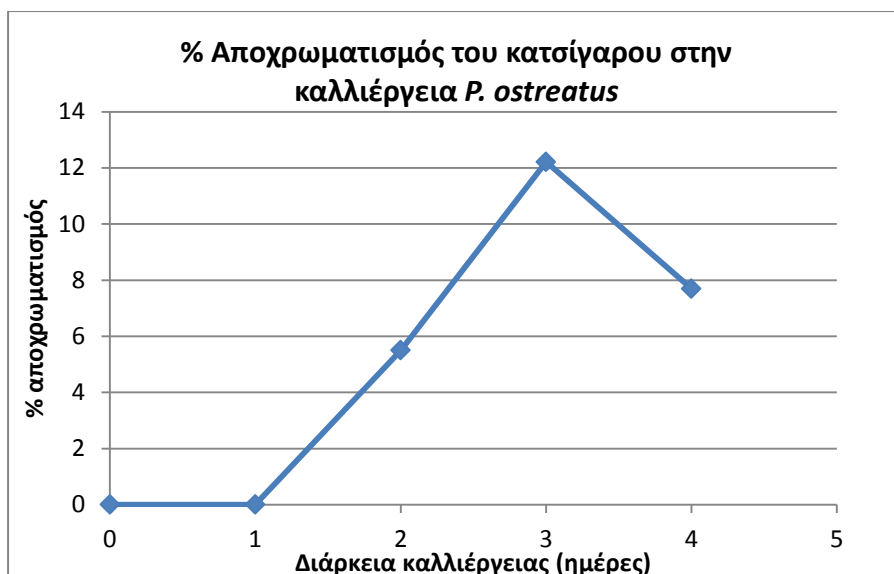
Η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις, ωστόσο έχει καθοδική πορεία, υποδεικνύοντας την κατανάλωσή τους από τη μυκηλιακή βιομάζα.

3.2.3.4 Κατανάλωση φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου στην καλλιέργεια *P. ostreatus* μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Διαπιστώθηκε ωστόσο ελάχιστη μείωση των φαινολών, γεγονός αναμενόμενο για το στέλεχος *P. ostreatus*.

3.1.3.5 Αποχρωματισμός αποβλήτου

Το διάγραμμα του ποσοστού αποχρωματισμού που προκύπτει από τις φωτομετρήσεις των δειγμάτων, φαίνεται παρακάτω:



Διάγραμμα 3.2.5: % Αποχρωματισμός του κατσίγαρου στην καλλιέργεια *P. ostreatus*

Το μέγιστο ποσοστό αποχρωματισμού (περίπου 12%) επετεύχθη την 3^η ημέρα της καλλιέργειας, ενώ τις πρώτες μέρες δεν είχε εμφανιστεί αλλαγή στο απόβλητο.

3.2.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS)

Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που απομονώθηκαν κατά την καλλιέργεια *P. ostreatus* στα θρεπτικά υποστρώματα ξυλόζης και κατσίγαρου, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 3.2.1: Παραγόμενη ποσότητα EPS στην καλλιέργεια του *P. ostreatus*

Ποσότητα EPS <i>P. ostreatus</i>	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο
Ξηρό βάρος (g)	68,80	39,22
Συγκέντρωση (mg/mL)	51,15	31,12

Παρατηρείται και στην καλλιέργεια του μακρομύκητα *P. ostreatus*, αύξηση της παραγωγής EPS κατά 39,2% στο θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, σε σχέση με αυτό του κατσίγαρου.

3.2.5 Προσδιορισμός γλυκανών

Το περιεχόμενο των ολικών, των α- και β- γλυκανών σε % w/w προσδιορίστηκε στη παραγόμενη βιομάζα του *P. ostreatus* στις καλλιέργειες του βιοαντιδραστήρα με

θρεπτικό υπόστρωμα την ξυλόζη και τον κατσίγαρο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2.2: Περιεκτικότητες ολικών, α- και β- γλυκανών (% w/w) από την ανάπτυξη του *P. ostreatus*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Βιομάζα			EPS		
	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)
ξυλόζη	2,59	1,64	0,95	2,89	0,72	2,17
κατσίγαρο	4,65	0,78	3,87	1,81	0,34	1,47

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, στην καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης, οι α- γλυκάνες είναι περισσότερες από τις β-γλυκάνες (κατά 42% περίπου) στη βιομάζα, κάτι που δεν παρατηρήθηκε σε κάποιο άλλο από τα μελετούμενα στελέχη. Είναι πιθανό, λοιπόν, η φυσικοχημική σύσταση των γλυκανών να εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος. Είναι, επίσης, αξιοσημείωτη η μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών γλυκανών (κατά 44,3%) στη βιομάζα που αναπτύχθηκε στον κατσίγαρο σε σχέση με την ξυλόζη, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα στελέχη.

3.2.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας

Η απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Song et al. (2008), όπως έχει περιγραφεί στο υποκεφάλαιο 2.10.6.1. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό, καθώς και τα προϊόντα καθαρισμού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2.3: Απομόνωση γλυκανών βιομάζας του *P. ostreatus* – αρχικές ποσότητες και προϊόντα

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Αρχική ποσότητα (g)	Προϊόντα	
		Ίζημα 1- (I1) (g)	Ίζημα 2 - (I2) (g)
ξυλόζη	8,450	2,730	0,0673
κατσίγαρο	11,562	5,284	0,3257

Υπενθυμίζεται ότι το ίζημα 1 (I1) προκύπτει από την φυγοκέντριση του μείγματος βιομάζα-απιονισμένο νερό που αφήνεται να βράσει για 4-5 ημέρες, ενώ το ίζημα 2 (I2) από την καθίζηση ύστερα από την προσθήκη της EtOH στο διάλυμα όπου έχουν εκχυλιστεί οι πολυσακχαρίτες. Οι επιθυμητοί πολυσακχαρίτες, λοιπόν, αναμένεται να βρίσκονται στο I2.



Εικόνα 3.2.1: Προϊόντα μεθοδολογίας Song et al. του *P. ostreatus* σε υπόστρωμα ξυλόζης (αριστερά το Ίζημα 1, δεξιά το Ίζημα 2)

3.2.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωσή τους από τη βιομάζα

Η μεθοδολογία προσδιορισμού των γλυκανών εφαρμόστηκε στα προϊόντα που προέκυψαν από τη μέθοδο απομόνωσής τους (Song et al.) από τη βιομάζα του *P. ostreatus*. Οι μετρήσεις δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2.4: Περιεκτικότητες ολικών, α- και β- γλυκανών (% w/w) από την απομόνωση των γλυκανών της βιομάζας του *P. ostreatus*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Ίζημα 1 (I1)			Ίζημα 2 (I2)		
	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)
ξυλόζη	4,34	1,52	2,82	42,87	9,77	33,10
κατσίγαρο	3,92	0,21	3,71	20,83	2,37	18,46

Όπως αναμενόταν, στο I2 υπάρχει πολύ μεγάλο ποσοστό ολικών γλυκανών, που φτάνει το 42,87% w/w στην περίπτωση του υποστρώματος της ξυλόζης. Επίσης, οι β-γλυκάνες είναι περισσότερες κατά 70% και 87% από τις α- γλυκάνες στα θρεπτικά υποστρώματα ξυλόζης και κατσίγαρου, αντίστοιχα. Αντίθετα, στο κλάσμα I1, που λειτουργεί ως δείκτης της απόδοσης της μεθοδολογίας απομόνωσης των γλυκανών, η περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες είναι σε χαμηλά επίπεδα.

3.3 *Pleurotus citrinopileatus* 28684

3.3.1 Υγρές προκαλλιέργειες

Το *P. citrinopileatus* αναπτύχθηκε έως την 10^η ημέρα στις υγρές προκαλλιέργειες. Τότε η βιομάζα είχε την κατάλληλη ανάπτυξη για τον εμβολιασμό στον κάθε βιοαντιδραστήρα διαφορετικού θρεπτικού υποστρώματος. Το βάρος του εμβολίου προσδιορίστηκε από τις υπόλοιπες φιάλες της προκαλλιέργειας, ύστερα από φυγοκέντριση των δειγμάτων και λυοφιλίωση της στερεής βιομάζας, με ακόλουθη ζύγισή της. Συγκεκριμένα, το εμβόλιο περιείχε **1,6 g** ξηρής βιομάζας ή **0,94 g/L** ξηρής βιομάζας και στους δύο βιοαντιδραστήρες.

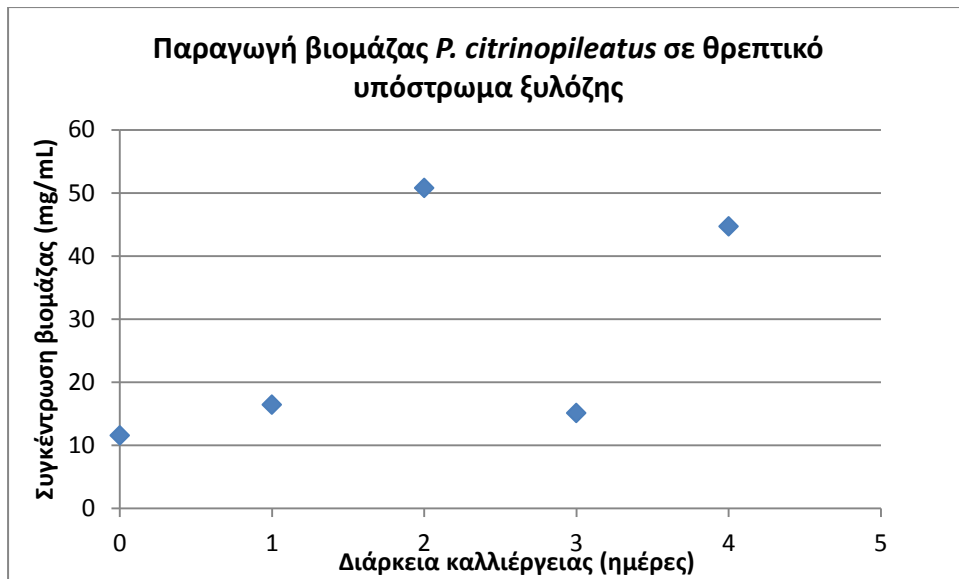
3.3.2 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

3.3.2.1 Διάρκεια και Απόδοση βιοαντιδραστήρα

Η καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* στο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη διήρκησε 4 ημέρες. Στο τέλος της καλλιέργειας είχαν παραχθεί συνολικά **8,472 g** ξηρής βιομάζας, ενώ ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού μετρήθηκε ίσος με **1420 mL**. Η απόδοση της καλλιέργειας, σύμφωνα με το αρχικό εμβόλιο και την παραγωγή βιομάζας είναι ίση με **429,5%**.

3.3.2.2 Παραγωγή βιομάζας

Η μεταβολή της μυκηλιακής παραγωγής του *P. citrinopileatus* κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας που μετρήθηκε με τη βοήθεια του ξηρού βάρους των δειγμάτων του βιοαντιδραστήρα είναι η ακόλουθη:

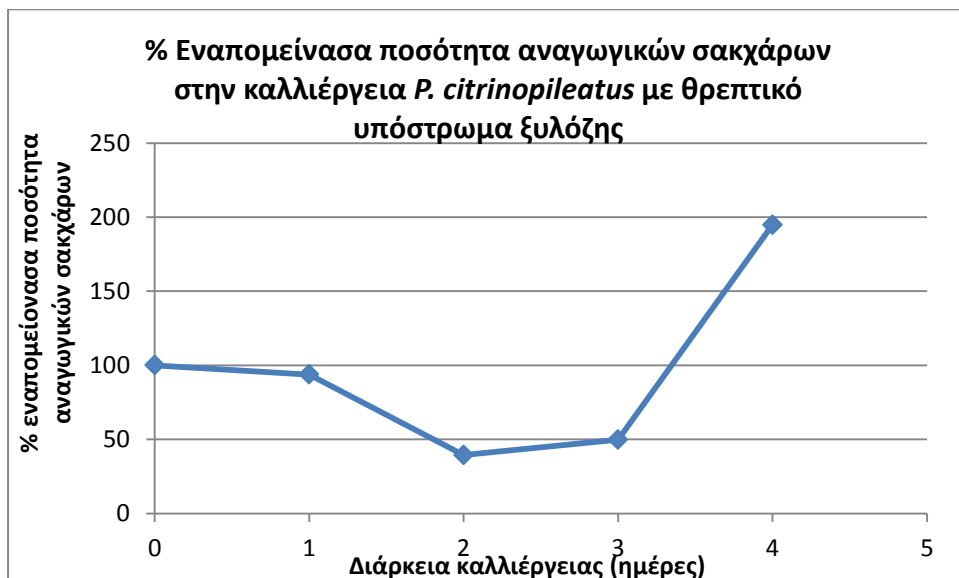


Διάγραμμα 3.3.1: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *P. citrinopileatus* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Παρουσιάζεται μανθάνουσα φάση 2 ημερών στην αρχή της καλλιέργειας και, ύστερα, μεγάλη διακύμανση της μυκηλιακής βιομάζας. Συγκεκριμένα, την τρίτη ημέρα ήταν απαραίτητη η διόρθωση του pH στη βέλτιστη τιμή (6) με χρήση HCl 2M, καθώς είχε πλησιάσει την τιμή 7. Το βασικότερο αυτό περιβάλλον φαίνεται να επηρέασε την παραγωγή βιομάζας, γεγονός που διαπιστώνεται και από το διάγραμμα.

3.3.2.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρουσιάζεται το ποσοστό μεταβολής της εναπομείναντα ποσότητας αναγωγικών σακχάρων στο υπόστρωμα ξυλόζης κατά τις 4 ημέρες της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα:



Διάγραμμα 3.3.2: Μεταβολή % εναπομείοντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *P. citrinopileatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης

Την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας παρουσιάζεται αύξηση των εναπομείναντων αναγωγικών σακχάρων, που ίσως μεταφράζεται σε παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από τον μακρομύκητα, τα οποία επηρεάζουν τις μετρήσεις της μεθόδου DNS, όπως έχει εξηγηθεί.

3.3.3 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

3.3.3.1 Διάρκεια και απόδοση βιοαντιδραστήρα

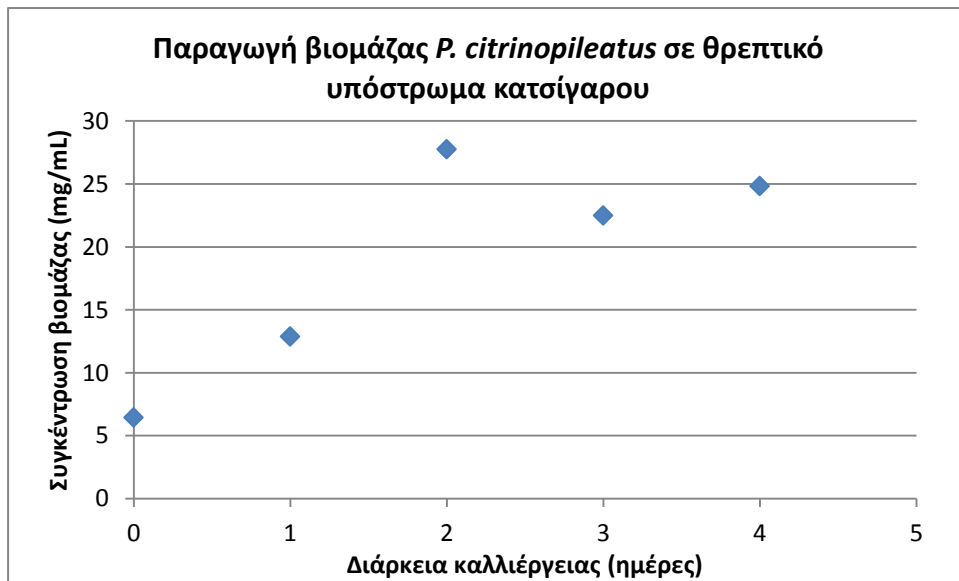
Η καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* στο βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου, επίσης, διήρκτησε 4 ημέρες. Παρήχθησαν συνολικά **8,227 g** ξηρής βιομάζας, ενώ ο όγκος του εξωκυτταρικού υγρού ογκομετρήθηκε και ήταν ίσος με **1330 mL**. Η απόδοση της καλλιέργειας, σύμφωνα με το αρχικό εμβόλιο και την παραγωγή βιομάζας είναι ίση με **414,2%**.



Εικόνα 3.3.1: Παραγωγή βιομάζας *P. citrinopileatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου

3.3.3.2 Παραγωγή βιομάζας

Η μεταβολή της παραγωγής βιομάζας του *P. citrinopileatus* κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρου παρουσιάζεται παρακάτω:



Διάγραμμα 3.3.2: Μεταβολή μυκηλιακής βιομάζας του *P. citrinopileatus* σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό υπόστρωμα κασίγαρου

Το *P. citrinopileatus*, φαίνεται να έχει προσαρμοστεί από την 1^η ημέρα στον βιοαντιδραστήρα με τον κασίγαρο ως θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσιάζοντας μέγιστη ανάπτυξη την 2^η ημέρα και αρχή της στάσιμης φάσης την 3^η.

3.3.3.3 Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων

Το παρακάτω διάγραμμα υποδεικνύει τη μεταβολή των αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα κασίγαρου:



Διάγραμμα 3.3.4: Μεταβολή % εναπομείοντων αναγωγικών σακχάρων στην καλλιέργεια *P. citrinopileatus* σε θρεπτικό υπόστρωμα κασίγαρου

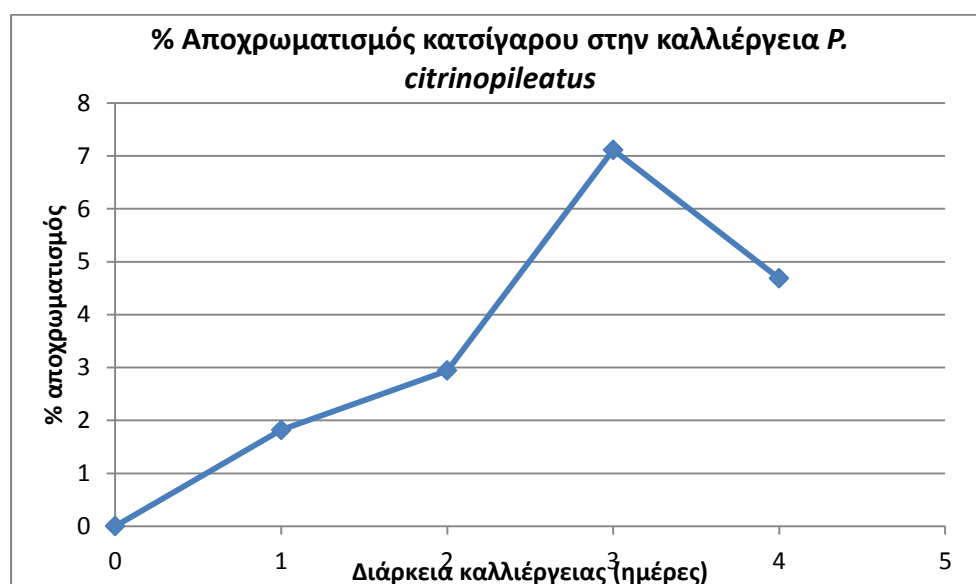
Διαπιστώνεται και στο διάγραμμα αυτό, ότι η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων αυξάνεται, γεγονός που πιθανόν εξηγείται από την ύπαρξη μεταβολικών προϊόντων.

3.3.3.4 Κατανάλωση φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Από τις ληφθείσες τιμές, δεν διαπιστώθηκε καμία μείωση των φαινολικών ενώσεων του κατσίγαρου στην καλλιέργεια *P. citrinopileatus*.

3.3.3.5 Αποχρωματισμός αποβλήτου

Το διάγραμμα % αποχρωματισμού του κατσίγαρου από την καλλιέργεια του *P.citrinopileatus* στον βιοαντιδραστήρα φαίνεται παρακάτω.



Διάγραμμα 3.3.5: % Αποχρωματισμός του κατσίγαρου στην καλλιέργεια *P. citrinopileatus*

Σύμφωνα με το διάγραμμα 3.3.5, επετεύχθη αποχρωματισμός του κατσίγαρου κατά 7% περίπου, σχετικά χαμηλό ποσοστό σε σχέση με τα υπόλοιπα μελετούμενα στελέχη μακρομυκήτων. Στην τελευταία μέρα της καλλιέργειας παρατηρείται μείωση του ποσοστού αποχρωματισμού, δηλαδή εμφάνιση σκουρότερου χρώματος σε σχέση με την προηγούμενη μέρα. Αυτή η αύξηση του χρώματος εμφανίστηκε σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη μακρομυκήτων και πιθανόν οφείλεται στη λύση των κυττάρων ή στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που προκαλούν τη μείωση του αποχρωματισμού, όπως η μελανίνη.

3.3.4 Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS)

Η παραγωγή των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών στην καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* στα δύο μελετώμενα θρεπτικά υποστρώματα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3.1: Παραγόμενη ποσότητα EPS στην καλλιέργεια του *P. citrinopileatus*

Ποσότητα EPS <i>P. citrinopileatus</i>	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη	Βιοαντιδραστήρας με θρεπτικό υπόστρωμα κατσίγαρο
Ξηρό βάρος (g)	63.26	26.22
Συγκέντρωση (mg/mL)	44.55	19.71

Στο τρίτο εξεταζόμενο στέλεχος μακρομύκητα, παρατηρείται, επίσης, μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενων EPS στην περίπτωση του υποστρώματος της ξυλόζης. Συγκεκριμένα, στην καλλιέργεια του *P. citrinopileatus*, η ποσότητα EPS είναι μεγαλύτερη κατά 55,76% με υπόστρωμα την ξυλόζη σε σχέση με τον κατσίγαρο.

3.3.5 Προσδιορισμός γλυκανών

Το περιεχόμενο των γλυκανών σε % w/w προσδιορίστηκε στη βιομάζα του *P. citrinopileatus* που παράχθηκε από τις καλλιέργειες του βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα την ξυλόζη και τον κατσίγαρο. Οι τιμές που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3.2: Περιεκτικότητες ολικών, α- και β- γλυκανών (% w/w) από την ανάπτυξη του *P. citrinopileatus*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Βιομάζα			EPS		
	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)	Ολικές γλυκάνες (% w/w)	α- γλυκάνες (% w/w)	β- γλυκάνες (% w/w)
ξυλόζη	5,03	1,73	3,30	1,99	0,14	1,85
κατσίγαρο	4,47	1,25	3,22	2,40	0,53	1,87

Τα επίπεδα των ολικών γλυκανών στα EPS είναι σχετικά χαμηλά (μέχρι 2,4%), τόσο στην καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζη όσο και στον κατσίγαρο σε σχέση με τη βιομάζα, κάτι που παρατηρήθηκε και στα προηγούμενα στελέχη. Αξίζει να σημειωθεί ότι επιτεύχθηκε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκανών στον κατσίγαρο σε

σχέση με την ξυλόζη στους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες του *P. citrinopileatus*, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με κανένα άλλο στέλεχος μακρομύκητα.

3.3.6 Απομόνωση γλυκανών βιομάζας

Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση γλυκανών της βιομάζας του *P. citrinopileatus* που αναπτύχθηκε στο βιοαντιδραστήρα με θρεπτικό υπόστρωμα τη ξυλόζη, σύμφωνα με τις μεθόδους Synytsya et al. και Song et al.

Synytsya et al. (2009)

Πίνακας 3.3.3: Απομόνωση γλυκανών βιομάζας του *P. citrinopileatus* - αρχικές ποσότητες και προϊόντα (μέθοδος Synytsya et al., 2009)

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Αρχική ποσότητα (g)	Προϊόντα		
		Υδατοδιαλυτό - (Y) (mg)	Αλκαλιδιαλυτό - (A2) (mg)	Στερεό - (Σ) (mg)
ξυλόζη	4,08	21,0	12,4	98,6

Στην απομόνωση των γλυκανών από τη βιομάζα του *P. citrinopileatus* δεν προέκυψε το κλάσμα Αλκαλιδιαλυτό 1 από τη διόρθωση του pH.

Song et al. (2008)

Πίνακας 3.3.4: Απομόνωση γλυκανών βιομάζας του *P. citrinopileatus* - αρχικές ποσότητες και προϊόντα (μέθοδος Song et al., 2008)

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Αρχική ποσότητα (g)	Προϊόντα	
		Ίζημα 1- (I1) (g)	Ίζημα 2 - (I2) (g)
ξυλόζη	4,03	1,155	0,0019

3.3.7 Προσδιορισμός γλυκανών μετά την απομόνωση τους από τη βιομάζα

Synytsya et al. (2009)

Η μη επαρκής ποσότητα των προϊόντων της μεθόδου αυτής δεν επέτρεψε τη μέτρηση των ολικών, των α- και β- γλυκανών στα Y και A2. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο στερεό κλάσμα Σ, ώστε να διαπιστωθούν τυχόν απώλειες των γλυκανών στο στερεό προϊόν.

Πίνακας 3.3.5: Περιεκτικότητες και ποσοστά ανάκτησης ολικών, α- και β- γλυκανών από την απομόνωση γλυκανών της βιομάζας του *P. citrinopileatus*

Καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα	Στερεό (Σ)		
	Ολικές γλυκάνες	α- γλυκάνες	β-γλυκάνες
ξυλόζη	Περιεκτικότητες (% w/w)		
	6.33	0.83	5.50
	Ποσοστό ανάκτησης		
	3,04%	1,16%	4,02%

Υπάρχει ένα μικρό ποσοστό ανάκτησης στο Στερεό (Σ) προϊόν της μεθόδου Synytsya et al., το οποίο όμως δεν μπορεί να αξιολογηθεί, καθώς δεν προέκυψε άλλο μετρήσιμο κλάσμα.

Song et al. (2008)

Η πολύ μικρή ποσότητα του I2 (μόλις 1,9 mg) δεν επέτρεψε τη μέτρηση των γλυκανών στο δείγμα, επομένως δεν υπάρχουν αποτελέσματα από τη μέθοδο αυτή.

3.4 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων από τις καλλιέργειες των τριών μελετούμενων μακρομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα, των μετέπειτα καθαρισμών της βιομάζας και των μετρήσεων της περιεκτικότητας σε ολικές, α- και β- γλυκάνες.

Πίνακας 3.4.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για τις καλλιέργειες των μελετούμενων μακρομυκήτων

Καλλιέργεια με πηγή άνθρακα:	Στελέχη Βασιδιομυκήτων					
	<i>Ganoderma lucidum</i> 9720		<i>Pleurotus ostreatus</i> 1123		<i>Pleurotus citrinopileatus</i> 28684	
Παραγωγή βιομάζας σε βιοαντιδραστήρα (mg/mL)						
ξυλόζη	2,65		6,54		5,97	
κασιίγαρο	3,53		9,33		6,19	
Κατανάλωση αναγωγικών σακχάρων						
ξυλόζη	56,8 %		80 %		60,6 %	
κασιίγαρο	57,5 %		35,4%		12%	
Μείωση φαινολικών ενώσεων						
κασιίγαρο	28,9 %		-		-	
Αποχρωματισμός						
κασιίγαρο	40,3 %		12,2 %		7,1 %	
Παραγωγή EPS (mg/mL)						
ξυλόζη	45.65		51.15		44.55	
κασιίγαρο	21.02		31.12		19.71	
Περιεκτικότητες γλυκανών πριν την απομόνωσή τους (% w/w)						
ξυλόζη	Βιομάζα	EPS	Βιομάζα	EPS	Βιομάζα	EPS
ολικές	5,35	3,18	2,59	2,89	5,03	1,99
α-	0,17	0,23	1,64	0,72	1,73	0,14
β-	5,18	2,95	0,95	2,17	3,30	1,85
κασιίγαρο						
ολικές	4,83	1,98	4,65	1,81	4,47	2,40
α-	0,12	0,42	0,78	0,34	1,25	0,53
β-	4,71	1,56	3,87	1,47	3,22	1,87
Περιεκτικότητες γλυκανών μετά την απομόνωσή τους (% w/w)						
ξυλόζη	Στερεό Σ	Αλκαλιδι αλυτό A1	Ίζημα 1 I1	Ίζημα 2 I2	Στερεό Σ	
ολικές	16,36	5,58	4,34	42,87	6,33	
α-	0,02	0,08	1,52	9,77	0,83	
β-	16,34	5,50	2,82	33,10	5,50	
κασιίγαρο						
ολικές	12,61	4,68	3,92	20,83	-	
α-	0,11	0,06	0,21	2,37	-	
β-	12,50	4,62	3,71	18,46	-	

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τρία στελέχη Βασιδιομυκήτων, τα *Ganoderma lucidum* 9720, *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Pleurotus citrinopileatus* 28684. Τα υπό μελέτη στελέχη αναπτύχθηκαν σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικά υποστρώματα ξυλόζης και υγρού αποβλήτου ελαιουργείου, τον κατσίγαρο, με σκοπό την παραγωγή πολυσακχαριστών και ιδιαίτερα των β-γλυκανών. Το περιεχόμενο της βιομάζας σε γλυκάνες μετρήθηκε πριν και μετά τον καθαρισμό της βιομάζας, ο οποίος μελετήθηκε με δύο μεθοδολογίες, των Synytsya et al. (2009) και Song et al. (2008).

4.1 *Ganoderma lucidum*

Σύμφωνα με τους Boh et al. (2007), η καλλιέργεια του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρες θεωρείται ως μια γρήγορη και αποδοτική εναλλακτική λύση για την αποτελεσματική παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικών οξέων. Ωστόσο, η καλλιέργεια των μυκηλίων χαρακτηρίζεται από την αύξηση του ιξώδους του εξωκυτταρικού υγρού με το χρόνο, η οποία είναι συνέπεια της αυξημένης κυτταρικής συγκέντρωσης και τη συσσώρευση των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών που μεταβάλλουν δραματικά τις ρεολογικά χαρακτηριστικά της ζύμωσης. Με αυτό τον τρόπο, δημιουργείται μια σειρά προβλημάτων που πρέπει να επιλυθούν, ιδιαίτερα στην παροχή οξυγόνου. Το οξυγόνο επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη, την κυτταρική μορφολογία, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και τη βιοσύνθεση των μεταβολιτών που παράγονται.

Η παραγωγή βιομάζας του *G. lucidum* στο βιοαντιδραστήρα διατηρήθηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, καθώς ήταν μικρότερη από αυτή των *P. ostreatus* και *P. citrinopileatus* κατά 59% και 55%, αντίστοιχα στο θρεπτικό της ξυλόζης και κατά 62% και 43%, αντίστοιχα στο υπόστρωμα του κατσίγαρο. Διαπιστώθηκε, επίσης, μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας στο βιοαντιδραστήρα με το θρεπτικό υπόστρωμα του κατσίγαρου σε σχέση με το θρεπτικό της ξυλόζης, κατά 25%.

Παρά τη μικρή, σχετικά με τα υπόλοιπα στελέχη, ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας που παράχθηκε, σε αυτή την περίπτωση σημειώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού του κατσίγαρου, σε σχέση με τους άλλους μακρομύκητες. Συγκεκριμένα, το επίπεδο του αποχρωματισμού έφτασε μέχρι το 40,3%, ενώ στα *P. ostreatus* και *P. citrinopileatus* μέχρι το 12,2% και 7,1%, αντίστοιχα. Παρόμοια συμπεριφορά φάνηκε και στη μείωση των φαινολικών ενώσεων, όπου επιτεύχθηκε μείωση μέχρι και 28,9%, έναντι του *P. ostreatus* που έφτασε το 12,1%. Αντίθετα, υπενθυμίζεται ότι η καλλιέργεια του *P. citrinopileatus* δε συντέλεσε στη μείωση των

φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Πράγματι, σύμφωνα με τους Ntougias et al. (2012), σημειώνεται γρηγορότερη μείωση των φαινολικών ενώσεων στην καλλιέργεια του *Ganoderma* spp., συγκεκριμένα, μέχρι και 40,8% στις 10 ημέρες, ενώ στο *Pleurotus* spp. παρατηρείται σημαντική μείωση σε περισσότερες από 20 ημέρες καλλιέργειας. Η μελέτη που αναφέρεται έχει γίνει με 25% v/v κατσίγαρο στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Γενικά, τα αποτελέσματα του αποχρωματισμού και της μείωσης των φαινολικών ενώσεων στο υπόστρωμα του κατσίγαρου που παρουσιάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία στην καλλιέργεια του *G. lucidum*, συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό. Τις ημέρες της καλλιέργειας, δηλαδή, που παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού, μετρήθηκε μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Η παρατήρηση αυτή έχει γίνει και στην μελέτη των Ntougias et al. (2012).

Η βιομάζα του *G. lucidum* που προέκυψε από την καλλιέργεια της ξυλόζης είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών (5,35% w/w) και β- γλυκάνων (5,18 % w/w) σε σχέση με τα δύο υπόλοιπα στελέχη, η διαφορά μάλιστα στις β- γλυκάνες, έφτασε το 82% με το *P. ostreatus* και το 36% με το *P. citrinopileatus*. Η περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες είναι ικανοποιητική, καθώς έχει αναφερθεί παραγωγή 7,43% w/w ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L (Fang & Zhong 2002).

Ο καθαρισμός της βιομάζας που αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα ξυλόζης και κατσίγαρου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Synytsya et al. (2009). Τα αποτελέσματα ήταν, ωστόσο, σχετικά αποτρεπτικά για τη χρήση της μεθόδου αυτής, καθώς διαπιστώθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης στο προϊόν του καθαρισμού Σ, σε σχέση με το προϊόν Α1. Συγκεκριμένα, οι γλυκάνες της ακατέργαστης βιομάζας του υποστρώματος της ξυλόζης που ανακτήθηκαν στο προϊόν Σ ήταν το 7,85% των γλυκανών της αρχικής βιομάζας, ενώ στο προϊόν Α1 ήταν μόλις το 4,78%. Αντίστοιχα, στο θρεπτικό του κατσίγαρου, το κλάσμα Σ έχει ποσοστό ανάκτησης 14,4% και το Α1 7,53%.

Οι χαμηλές τιμές των ολικών, των α- και β- γλυκανών που μετρήθηκαν στο προϊόν Α1 δεν συνάδουν με τη μελέτη των Synytsya et al. (2009). Στην αντίστοιχη μελέτη, που είχε γίνει σε στελέχη των *P. ostreatus* και *P. eryngii*, τα προϊόντα του καθαρισμού είχαν μη-αμυλούχες γλυκάνες (non-starch glycan) σε περιεκτικότητες μεταξύ 44,2-90,1% και 33,6-66,4%, αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η μελέτη αυτή έγινε στα καρποσώματα των παραπάνω στελεχών, τα οποία έχουν εξ αρχής περισσότερη ποσότητα γλυκανών. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και το γεγονός ότι ο καθαρισμός Synytsya et al. είναι χρονοβόρος και δαπανηρός λόγω χρήσης πολλών αντιδραστηρίων και ενζύμων, αυτή η μέθοδος καθαρισμού δεν συστήνεται.

4.2 *Pleurotus ostreatus*

Σε πολλές προηγούμενες μελέτες, έχει χρησιμοποιηθεί η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα για τη μέγιστη παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας για το *Pleurotus* spp. (Elisashvilli et al. 2009, Gem 2008), ωστόσο η ξυλόζη έχει οδηγήσει σε παραπλήσια υψηλή απόδοση (Παπασπυρίδη 2011).

Το *P. ostreatus* αναπτύχθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υπόλοιπα στελέχη, τόσο στο θρεπτικό της ξυλόζης όσο και στου κατσίγαρου, φτάνοντας μάλιστα απόδοση 852% και 1172%, αντίστοιχα. Είναι, επίσης, αξιοσημείωτη η μεγαλύτερη παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας, κατά 29,9%, στο θρεπτικό του κατσίγαρου σε σχέση με την ξυλόζη, κάτι που διαπιστώθηκε και στην περίπτωση του *G. lucidum*.

Επίσης, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη μείωση των φαινολικών ενώσεων ή αποχρωματισμός του αποβλήτου, καθώς και οι δύο εξεταζόμενες παράμετροι παρέμειναν στο 12% περίπου. Οι Ntougias et al. 2012 αναφέρουν ότι δεν σημειώνεται ιδιαίτερος αποχρωματισμός του αποβλήτου στις καλλιέργειες του *Pleurotus* spp. για λιγότερες από 10 ημέρες καλλιέργειας.

Η παραγόμενη ποσότητα EPS είναι η μεγαλύτερη σε σχέση με τα δύο άλλα στελέχη μακρομυκήτων και στα δύο υποστρώματα. Συγκεκριμένα, στο θρεπτικό υπόστρωμα της ξυλόζης, η παραγωγή των EPS είναι μεγαλύτερη κατά 12,9% σε σχέση με το *P. citrinopileatus* και κατά 10,7% σε σχέση με το *G. lucidum*. Στο υπόστρωμα του κατσίγαρου οι διαφορές είναι μεγαλύτερες, καθώς το *P. ostreatus* πέτυχε με διαφορά τη μεγαλύτερη παραγωγή EPS. Παράχθηκαν, λοιπόν, 36,6% και 32,4% περισσότερα EPS από τα *P. citrinopileatus* και *G. lucidum*, αντίστοιχα.

Τα μεγέθη αυτά είναι, ωστόσο, πολύ υψηλά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Οι Smiderle et al. (2011) ανέπτυξαν σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια *Pleurotus pulmonarius* με θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης 30 g/L, yeast extract 4 g/L, K_2HPO_4 1 g/L και $MgSO_4(H_2O)_7$ 0.6 g/L. Η παραγόμενη ποσότητα EPS, μετά από καταβύθιση με καθαρή EtOH 3:1 (v/v) είναι 0,33 mg/mL, ενώ στην περίπτωση του *P. ostreatus* της παρούσας διπλωματικής εργασίας βρέθηκε ίση με 51,15 mg/mL. Η μεγάλη αυτή διαφορά πιθανόν οφείλεται στη συγκέντρωση ξυλόζης που χρησιμοποιήθηκε, καθώς οι Fang & Zhong (2002) αναφέρουν ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων παράγονται περισσότεροι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες.

Πριν τον καθαρισμό της βιομάζας, το *P. ostreatus* έμεινε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα στην παραγωγή γλυκανών στη βιομάζα του θρεπτικού ξυλόζης και στα EPS καλλιέργειών με ξυλόζη/κατσίγαρο. Είναι ενδιαφέρον, όμως, το γεγονός ότι οι ολικές γλυκάνες (4,65 % w/w) στη βιομάζα σε υπόστρωμα κατσίγαρου ήταν πολύ περισσότερες (κατά 75% περίπου) σε σχέση με τη βιομάζα σε υπόστρωμα ξυλόζης. Σύμφωνα με τους Liu et al. (2010), το ποσοστό των IPS που αναμένεται στην ακατέργαστη βιομάζα του *Pleurotus* spp. είναι 3,6-5,4 % w/w, σε θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης.

Προκειμένου να υπάρξει άμεση σύγκριση των δύο μεθοδολογιών καθαρισμού που εξετάστηκαν, στο *P. ostreatus* πραγματοποιήθηκε καθαρισμός σύμφωνα με τους Song et al. Εύκολα διακρίνεται η διαφορά των αποτελεσμάτων του καθαρισμού, καθώς η περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες που βρέθηκε στο Ίζημα 1 είναι, αναμενόμενα, πολύ χαμηλή σε σχέση με την περιεκτικότητα του Ίζηματος 2 (4,34 % w/w και 42,87% w/w, αντίστοιχα στο θρεπτικό της ξυλόζης). Αξίζει να δοθεί προσοχή στην αρχική περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες (της ακατέργαστης βιομάζας) στο θρεπτικό της ξυλόζης, που μετρήθηκε ίση με 2,59 % w/w, άρα και στην μεγάλη αύξηση του ποσοστού, κατά 94%. Στο υπόστρωμα του κατσίγαρου μετρήθηκαν αντίστοιχα καλά αποτελέσματα, με αύξηση της περιεκτικότητας των ολικών γλυκανών από 3,92% w/w σε 20,83 % w/w.

Από την μελέτη των Song et al. (2008) έχουν προκύψει τελικές περιεκτικότητες σε ενδοπολυσακχαρίτες στο εύρος 91,5-98,0 % w/w στα καρποσώματα 5 ειδών Βασιδιομυκήτων (συμπεριλαμβανομένου του *G. lucidum*). Συνολικά λοιπόν, η μεθοδολογία Song et al. κρίνεται προτιμότερη για τον καθαρισμό της βιομάζας, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, των καλύτερων αποτελεσμάτων που έχει δείξει η μελέτη σε σχέση με τη Synytsya et al. (2009) και του γεγονότος ότι πρόκειται για μία ευκολότερη και λιγότερο δαπανηρή μέθοδο.

4.3 *Pleurotus citrinopileatus*

Το *P. citrinopileatus* έχει τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, χωρίς να εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλότερη τελική συγκέντρωση βιομάζας στην καλλιέργεια του κατσίγαρου, όπως τα άλλα στελέχη (μεγαλύτερη μόνο κατά 3,5%). Επίσης, δεν φάνηκε σημαντική κατανάλωση των αναγωγικών σακχάρων, ούτε επιτεύχθηκε μείωση των φαινολικών ενώσεων ή ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο αποχρωματισμού (μόλις 7,1%) σε υπόστρωμα κατσίγαρου. Το μικρό ποσοστό αποχρωματισμού που επιτεύχθηκε μπορεί να οφείλεται στην οξείδωση και την πολυσυμπύκνωση των φαινολών σε ενώσεις πιο σκούρου χρώματος (Jaouani et al. 2006).

Όσον αφορά τη μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης στις τελευταίες μέρες της καλλιέργειας και στα δύο υποστρώματα σε όλα τα στελέχη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε ιδιαίτερα στο *P. citrinopileatus*. Από έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έχει βρεθεί ότι η μέθοδος DNS επηρεάζεται από την ύπαρξη φαινολών και αμινοξέων στο δείγμα, με αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων (Breuil & Saddler 1985, Vedralová et al. 1987)

Το *P. citrinopileatus* παρουσίασε τη μεγαλύτερη διαφορά στην παραγωγή των EPS στο θρεπτικό υπόστρωμα της ξυλόζης και του κατσίγαρου (44,55 mg/mL και 19,71 mg/mL, αντίστοιχα), που ανήλθε στο 55,76% έναντι του 39,2% και 53,9% των *P.*

ostreatus και *G. lucidum*, αντίστοιχα. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι το *P. citrinopileatus* δεν αναπτύχθηκε το ίδιο καλά με τα υπόλοιπα στελέχη στην καλλιέργεια του αποβλήτου, ούτε συνέβαλε ιδιαίτερα στην αποτοξικοποίησή του.

Ακόμα, βρέθηκε ότι το *P. citrinopileatus* έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών, α- και β- γλυκανών στα EPS που παραλήφθηκαν από την καλλιέργεια στον κατσίγαρο, σε σχέση με τα άλλα στελέχη. Συγκεκριμένα, η ποσότητα σε β- γλυκάνες μετρήθηκε ίση με 1,87 % w/w, ενώ στο *G. lucidum* και στο *P. ostreatus* προσδιορίστηκε ίση με 1,56 % w/w και 1,47% w/w, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα των ολικών γλυκανών, ξεπέρασε ακόμα και την αντίστοιχη που προσδιορίστηκε στην καλλιέργεια της ξυλόζης του ίδιου στελέχους, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα μελετούμενα στελέχη.

Τα ποσοστά των ολικών γλυκανών που προσδιορίστηκαν πριν τον καθαρισμό της βιομάζας, βρέθηκαν 5,03% w/w και 4.47% w/w για τα θρεπτικά υποστρώματα της ξυλόζης και του κατσίγαρου, αντίστοιχα και βρίσκονται μέσα στα όρια που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Liu et al. 2010). Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι το υπόστρωμα του κατσίγαρου δεν παρεμποδίζει την παραγωγή πολυσακχαριτών σε σχέση με την ξυλόζη, αλλά, αντίθετα στην περίπτωση του *P. ostreatus*, την ευνοεί.

Στο στέλεχος *P. citrinopileatus* πραγματοποιήθηκαν και οι δύο μεθοδολογίες καθαρισμού, στη βιομάζα που προέκυψε από το υπόστρωμα της ξυλόζης. Ωστόσο, το μικρό βάρος των ανακτώμενων κλασμάτων, δεν επέτρεψε τη σύγκριση μεταξύ των καθαρισμών, καθώς μετρήθηκε τελικά μόνο το Στερεό Σ της μεθοδολογίας Synytsya et al. Η περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες μετρήθηκε ίση με 6,33% w/w, ένα στοιχείο που δεν είναι δυνατό να αξιολογηθεί ελλείψει άλλων μετρήσεων.

4.4 Μελλοντικοί στόχοι

Η καλλιέργεια Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρες είναι μια αποδοτική και ελεγχόμενη διαδικασία που στοχεύει στην ανάπτυξη βιομάζας και στην παραγωγή πολυσακχαριτών. Η παρακολούθηση παραμέτρων της καλλιέργειας όπως το pH, η θερμοκρασία, το οξυγόνο κ.α., κάνουν πολύ ελκυστική αυτή τη μέθοδο παραγωγής σε αντίθεση με τη ζύμωση σε στερεά κατάσταση. Παράλληλα, είναι μία γρήγορη εναλλακτική λύση των υγρών καλλιεργειών σε αναδεδυόμενες φιάλες, οι οποίες μπορούν να φέρουν παρόμοια αποτελέσματα σε πολύ μεγαλύτερο χρόνο. Συνεπώς, η ζύμωση υγρής κατάστασης αξίζει να μελετηθεί παραπάνω, σε περισσότερα στελέχη Βασιδιομυκήτων, ώστε να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη τους και να γίνει ακόμα πιο αποδοτική.

Βασισμένοι στα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας, είναι ασφαλές να προταθεί η περαιτέρω μελέτη της ικανότητας του *G. lucidum* στην αποτοξικοποίηση του υγρού απόβλητου ελαιουργείου, του κατσίγαρου. Φαίνεται, μάλιστα, ότι η

καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα με το υπόστρωμα αυτό δεν επηρεάζει την ανάπτυξή του, ούτε την παραγωγή πολυσακχαριτών, συνεπώς μπορεί να επιτευχθεί παράλληλα και η παραγωγή φαρμακευτικών μεταβολιτών.

Αξίζει, τέλος, να δοθεί προτεραιότητα στη μεθοδολογία καθαρισμού των Song et al (2008), καθώς πρόκειται για μία ευκολότερη και οικονομικότερη μέθοδο, στην οποία επιτυγχάνονται υψηλότερες τελικές συγκεντρώσεις γλυκανών στα καθαρά δείγματα, σε σχέση με τη μέθοδο των Synytsya et al. (2009).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

AACC Report, The definition of dietary fiber, *Cereal Foods World* 46 (2000) 112–129.

Al-Malah K., Azzam M. O. J. and Abu-Lail N.I. (2000). Olive mills effluent (OME) wastewater post-treatment using activated clay. *Separ. Purif. Technol*, 20 (2), 225-234

Alonso, M. V., Aparico, R., Calvente, J. J., & Morales M. T. (1994). Good control practices underlined by an on-line fuzzy control database. *Grasas Aceites*, 45, 75-81

Backhouse D., Willetts H.J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*, *Can. J. Microbiol.*, 30, 171–178.

Barros, L., Baptista, P., Correira, D. M., Casa, S., Oliveira, B., & Ferreira, I. C. F. R. (2007a). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140–145.

Belcarz, A., Ginalska, G., Pycka, T., Zima, A., Slosarczyk, A., Polkowska, I., et al. (2013). Application of b-1,3-glucan in production of ceramics-based elastic composite for bone repair. *Central European Journal of Biology*, 8, 534-548.

Berovic M., Habijanac J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103, 77-86

Blaschek, W., Kasbauer, J., Kraus, J. & Franz, G. (1992). *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1-3) (1-6)-fi-D-glucans. *Carbohydr. Res.*, 231, 293-307.

Boari G., Brunetti A., Passino R. and Rozzi A. (1984). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Agric. Wastes*, 10 (3), 161-175

Boari G. and Mancini I. M. (1990) Combined treatments of urban and olive mill effluents in Apulia, Italy. *Proc. IAWPRC Symp. On Wate Management Problems in Agro-Industries*: Istanbul, Turkey, Sep. 25-27, 1989. *Water Sci TechnoL*, 22 (9), 235-240

Boh B., Berovic M., Zhang J., Xhi-Bin L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, Elsevier B.V.

Bonh A. John & BeMiller N. James. (1996). (1-3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28, 3-14

Borja-Padilla R., Alba-Mendoza J., Garrido-Hoyos S. E., Martinez L., Garcia-Pareja M. P., Incerti C. and Ramos –Cormenzana A. (1995). Comparative study of anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMW) and OMW previously fermented with *Aspergillus terreus*. *Bioprocess Eng.*, 13 (6), 317-322

- Breuil C., Saddler J.N. (1985). Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 7, Issue 7, 327-332
- Brown GD, Gordon S, (2005). Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology* 7: 471–479.
- Carlisle, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001). The Fungi. *Academic Press*, London, UK.
- Cegarra, J., Peredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Garcìa, D., Aragon, P., (1996). Use of olive mill waste water compost for crop production. *Int. Biodeter. Biodegr.* 38, 193–203.
- Chang Shu-Ting, Miles Philip G. (1997). Mushroom Biology - Concise Basics and Current Developments. *World Scientific Publishing Company*
- Chang Shu-Ting, Miles Philip G. (2004). Mushrooms - Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. *CRC Press LLC*
- Chen J., Seviour R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1/3), (1/6)-glucans. *Mycological research*, 111, 635-652
- Chen, S. N. (2014). Composite glucan and method for preparing the same. US patent 20140031542 A1.
- Cheung P.C.K., Lee M.Y. (2000) Fractionation and characterization of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) as potential nutraceuticals from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3148–3151.
- Cheung P.C.K. (2008). Nutritional value and health benefits of mushrooms, in: *P.C.K. Cheung (Ed.), Mushrooms as Functional Foods*, Wiley, Hoboken, pp. 71–110.
- Cheung P.C.K.. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber. *Food Science and Human Wellness* 2, 162–166
- Crognale, S., Bruno, M., Fidaleo, M., Moresi, M., & Petruccioli, M. (2007). Production of β -glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 860-871.
- D. Dubourdieu, P. Ribèreau-Gayon, B. Fournet. (1981). Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*, *Carbohydr. Res.* 93, 294–299.
- Elisashvilli, V.I., Kachlishvilli, E.T., Wasser, S.P. (2009). Carbon and Nitrogen Effects on Basidiomycetes Exopolysaccharide Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45 (5), 531-535.
- Fabre, I., Bruneteau, M., Ricci, P. & Michel, G. (1984). Isolation and structural study on *Phytophthora parasitica* glucans. *Eur. J. Biochem.*, 142, 99-103.

- 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 Qing-Hua, Zhong Jian-Jiang. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10, 61–65
- Fazenda M. L., Seviour R., McNeil B., Harvey L. M. (2008). Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, Volume 63, Elsevier Inc.
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1981). Anaerobic fermentation of wastewater with high organic load. *Ingenieria Quimica* 47, 85-91
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1986). Vegetation water used as fertilizer. Proc. International Symposium on Olive By-Products Valorization, FAO, UNDP, Sevilla, Spain pp 321-330
- Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1992). Use and treatment of olivemill wastewater: current situation and prospects in Spain. *Grasas Aceites*, 43, 101-106
- Flouri, F., Sotirchos, D., Ioannidou, S., Balis, C., 1996. Decolorization of olive oil mill liquid wastes by chemical and biological means. *Int. Biodeter. Biodegr.* 38, 189–192.
- Freimund S., Sauter M., Käpelli O., Dutler H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1,3- β -glucan of high purity from baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polym* 54, 159-171
- Georgacakis D. and Dalis D. (1993) Controlled anaerobic digestion of settled olive oil wastewater. *Bioresource Technol. Biomass Bioenergy Biowastes Convers. Technol. Biotransform. Prod. Technol.* 46 (3), 221-226
- 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. *Bioresour. Technol.* 99 (1), 76-82.
- Gharsallah N. (1994) Influence of dilution and phase separation on the anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Bioprocess Eng.*, 10 (1), 29-34
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20(1), 17–48.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Citchelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(7), 36-42.
- Gu YH, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa T, Suzuki I, Oshima M, Tawaraya H, Niwano Y, (2005). Enhancement of radioprotection and anti-tumor immunity by yeast-derived β -glucan in mice. *Journal of Medical Food* 8, 154–158.

- Hamdi M. (1991a) Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive oil mill wastewater *Bioresource Technol.*, 36 (2), 173-178
- Hamdi M. (2000). Traitement biotechnologique des margines. Un exemple de coopération CITET-ESIAT. Centre International des Technologies de l-Environnement de Tunis ATELIER SUR : *La gestion et les Procédés de Traitement des Margines*
- Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. (2002). IFN-gamma induction by SCG, 1,3-b-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22, 1227–1239.
- Hölker, U., Höfer M., Lenz J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 175–186
- Hsieh, C., and Yang, F. C. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Technol.* 91, 105–109.
- Hwang, H. J., Kim, S. W., Xu, C. P., Choi, J. W., and Yun, J. W. (2004). Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1296–1305.
- Iamarino G. Rao M.A., Gianfreda L. (2009). Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* 74, 216–223
- Jaouani, A., Tabka, M.G., Penninckx, M.J., (2006). Lignin modifying enzymes of *Coriopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolorisation. *Chemosphere* 62, 1421–1430.
- Jong, S.C. and Jung, H. K., Hong, J. H., Park, S. C., Park, B. K., Nam, D. H., & Kim, S. D. (2007). Production and physicochemical characterization of b-glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 713-719.
- Kalac, P., & Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69, 273–281
- Kalac Pavel (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113, 9–16
- Kalac Pavel (2010). Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009. *Food Chemistry* 122, 2–15
- Kim, D.H., Yang, B.K., Jeong, S.C., Park, J.B., Cho, S.P., Das, S., Yun, J.W., Song, C.H. (2002). Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* 23, 513–517
- Kim, H. M., Paik, S. Y., Ra, K. S., Koo, K. B., Yun, J. W., and Choi, J. W. (2006). Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *J. Microbiol.* 44(2), 233–242.

Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., and Tsunoo, H. (1989). Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from *Ganoderma lucidum*, *J. Biol. Chem.*, 264, 472–478

Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology* 39, 1–8.

Kohlmunzer, S., Wegiel, J., Sitarz, J. (1989). Polysaccharides in mycelial culture of *Ganoderma applanatum* (Pers.). *Pat. Herba. Hung.* 28, 87-94.

Kojima, T., Tabata, K., Itoh, W. & Yanaki, T. (1986). Molecular weight dependence of the antitumor activity of schizophyllan. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 231-232.

Kubota, T., Asawa, Y., Miura, I., and Mori, H. (1982) Structures of ganodermeric acid A and B, two new Lanostane Type Bitter Triterpenes from *Ganoderma lucidum*, *Helvetica Chimica Acta* 65, 611-619

Lee, S.S., Wei, Y.H., Chen, C.F., Wang, S.Y., and Chen, K.Y. (1995). Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*., *J. Chin. Med.*, 6, 1–12,

Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., and Yun, J. W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola fondosa*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 35(5), 369–376.

Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., and Park, S. Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 40(2), 249–254.

Lin H., Zhang M., Wang F., Meng F., Liao Bao-Qiang, Hong H., Chen J., Gao, W. (2014). A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies. *Journal of Membrane Science*, 460, 110-125

Liu X., Zhou B., Lin R., Deng P., Fan K., Wang G., Wang Li, Zhang J. (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 116–119

McCleary Barry V. & McGeoug Paraic, (2015). A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4-β-Xylanase. *Appl Biochem Biotechnol.* 177, 1152–1163

Mellouli H.J., Hartmann Roger (2000). Epanchage des margines: Utilisation et contraintes. Modification des Caracteristiques Hydro-physiques du sol par les margines : incidences environnementales. Centre International des Technologies de l-Environnement de Tunis

Miller, G. L. (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428

- Mitchell, D. A., and Lonsane, B. K. (1992). Definition, characteristics and potential. In “Solid Substrate Cultivation” (H. W. Doelle, D. A. Mitchell, and C. E. Rolz, eds.), pp. 1–10. Elsevier, London.
- Mitrakas M., Papageorgiou G., Docoslis A. and Sakellaropoulos G. (1996) Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill waste-waters. *Eur. Water Pollut.Control.*, 6 (6), 10-16
- Mizuno, T., Wang, G.Y., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., and Li, J.X., Reishi, . (1995). *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects, *Food Rev. Int.*, 11, 151–166
- Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2003). Lektin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci.* 73, 3363–3374.
- Nie S., Zhang Hui, Li W., Xien M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1, 10–20
- Ntougias S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautova V., Zervakis G.I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88, 620–626
- Pedneault, K., Angers, P., Avis, T. J., Gosselin, A., & Tweddel, R. J. (2007): Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures. *Mycological Research*, 111, 1128–1234.
- Petrakis, C. (2006). Olive oil Extraction. In D. Boskou (Ed.), *Olive oil: Chemistry and Technology, Second Edition* (pp. 191-223). Champaign, Illinois: AOCS Publishing
- Petre (2016), Mushroom Biotechnology-Developments and Applications, Elsevier Inc. pg 1-18
- Ramos – Cormenzana, A. (1986). Physical, Chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. *Proc. International Symposium on Olive By-Products Valorization*, FAO, UNDP, Sevilla, Spain pp 19-40
- S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K.K. Tan. (2001). Higher basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (review), *Int. J. Med. Mushr.* 3, 361–394.
- 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., Mlcek J., Jurikova T. (2009). Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, Vol 67 (11): 624-631

- Rozzi A. and Malpei F. (1996) Treatment and disposal of olive mill effluents, *Proc. Olive oil Processes and By-Products Recycling*, Granada, Spain, Sep 10-13, 1995. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 38 (3-4), 135-144
- Salvador, M. D., Aranda, F., Freagapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality- A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73(1), 45-53.
- Schmid F, Stone BA, McDougall BM, Bacic A, Martin KL, Brownlee RT, Chai Falch BH, Espevik T, Ryan L, Stokke BT. (2000). The cytokine stimulating activity of (1/3)-b-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*, 329, 587–596.
- Seviour RJ. (2001). Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1/3;1/6)-b-glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. *Carbohydrate Research* 331, 163–171.
- Sharafbafi, H., Tosh, S. M., Alexander, M., & Corredig, M. (2014). Phase behaviour, rheological properties, and microstructure of oat b-glucan-milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 41, 274-280.
- Sierra J., E. Marti, G. Montserrat, R. Cruafhas and M. A. Garau (2001). Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, *The Science of The Total Environment*, Vol. 279 (1-3), 207-214,
- Smiderle R. F., Morales D., Gil-Ramirez A. et al. (2016). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain beta-D-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers*
- Song W., Johannes P. F., & Van Griensven Leo J. L. D. (2008). Phenolic Compounds Present in Medicinal Mushroom Extracts Generate Reactive Oxygen Species in Human Cells *In Vitro*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(1), 1–13
- Svoboda, L., Zimmermannová, K., & Kalac, P. (2000). Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Science of the Total Environment*, 246, 61–67.
- Svoboda, L., & Kalac, P. (2003). Contamination of two edible *Agaricus* spp. Mushrooms growing in a town with cadmium, lead, and mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 123–130.
- Synytsya A., Mickova K., Synytsya A., Jablonsky I., Spevacek J., Erban V., Kovarikova E., Copikova J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76, 548–556
- Tang Ya-Jie, Zhu Li-Wen, Li Hong-Mei, Li Dong-Sheng. (2007). Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors – Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (3), 221–229

- Thomas L. Larroche C., Pandey A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146– 161
- Tomati U. and Galli E. (1992). The fertilizing value of wastewater from olive processing industry. Humus, its structure and role in agriculture and environment J. Kubat Elsevier Science Publishers BV
- Triratana, S., Thaithatgoon, S., Gawgla, M., (1991). Science and cultivation of edible fungi. In: Maher, M.J. (Ed.), *Proceedings of the 13th International Congress on the Science Cultivation of Edible Fungi*, A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 567-572.
- Vedralová E, Borovanský J, Duchon J. (1987). Protein determination in materials containing melanin. *J Biochem Biophys Methods*. Sep 14(6), 343-8
- Velioglu S. G., Curi K. and Camillar S. R. (1987) Laboratory experiments on the physical treatment of olive oil wastewater. *Int. J. Dev. Technol.*, 5 (1), 49-57
- Vetter, J., & Rimóczi, I. (1993). Crude, digestible and indigestible protein in fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 197, 427–428
- Vetvicka V, Yvin JC, 2004. Effects of marine b-1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* 4, 721–730.
- S.P. Wasser, K.K. Tam, V.I. Elisashvilli, (2002) Hypoglycemic, interferonogenesis, and immunomodulatory activity of Tremellastin from the submerged culture of *Tremella mesenterica*, *Int. J. Med. Mushr.*, 4, 215–227.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 258-274.
- Waterhouse, A. L. (2001). Determination of Total Phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, *John Wiley & Sons, Inc.*
- Weete, J.D. and Weber, D.J. (1980), Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms, *Plenum Press*, New York
- K.H. Wong, P.C.K. Cheung, (2005) Dietary fiber from mushroom sclerotia. 1. Preparation, physico-chemical and functional properties, *J. Agric. Food Chem.* 53, 9395–9400.
- S.M. Wong, K.K. Wong, L.C.M. Chiu, et al. (2007), Non-starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium* inhibited the growth of human acute promyelotic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction, *Carbohydr. Polym.*, 68, 206–217.
- K.H. Wong, P.C.K. Cheung, (2008). Sclerotium of culinary-medicinal King Tuber Oyster mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer (Agaricomycetidea): cultivation, biochemical composition, and biopharmaceutical effects (review), *Int. J. Med. Mushr.*, 10 303–313.
- Yan J, Allendorf DJ, Brandley B. (2005). Yeast whole glucan particle (WGP) b-glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opinion in Biological Therapy* 5, 691–702.

M. Zhang, S.W. Cui, P.C.K. Cheung, et al., (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends Food Sci. Technol.* 18, 4–19.

Zhu F., Du B., Xu B. (2016). A critical review on production and industrial applications of beta- glucans. *Food Hydrocolloids* 52, 275-288

Ελληνική Βιβλιογραφία

Βλυσίδης Α., Γρηγοροπούλου Ε., Λυμπεράτος Γ. (2014), Περιβαλλοντική Μηχανική, Αθήνα

Κυριτσάκης, Α. (2007). Ελαιόλαδο Συμβατικό και Βιολογικό, Βρώσιμη Ελιά – Πάστα Ελιάς

Κώτσιου Κ. (2015). Μεταβολές των συστατικών του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση και το μαγείρεμα, Ιωάννινα

Λοϊζίδης Μ. (2009). Επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων με τη μέθοδο της συγχουμοποίησης τους σε πυρηνόξυλο, Αθήνα

Μουτσοπούλου Μ. (2006). Επίδραση της εφαρμογής ΥΑΕ στο σύστημα έδαφος-ελαιόδεντρο, Αθήνα

Μπαλατσαούρας, Γ. (1986). Ελαιόλαδο-Σπορέλαια-Λίπη. Αθήνα: Καραμπελόπουλος Α.Ε.

Μπαλατσαούρας, Γ. (1997). Σύγχρονη ελαιοκομία: Ελαιόλαδο Αθήνα: Ιδιωτική έκδοση

Παπασπυρίδη Α.Μ. (2011). Παραγωγή μικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών και βιοτεχνολογική αξιολόγηση τους σαν φυσικά φάρμακα, Αθήνα