



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΟΙΚΙΑΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΩΣΙΜΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ»

“Έλεγχος της πρεβιοτικής δράσης εδώδιμων μανιταριών που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας”

Διπλωματική Εργασία

Φοιτήτρια: Μαριάννα Πατσού
Α.Μ. 210210

Τριμελής επιτροπή
Επιβλέπων: Αδαμαντίνη Κυριακού
Κωνσταντίνος Αμπελιώτης
Γεώργιος Ζερβάκης

Αθήνα, 2013

Περίληψη

Στην Ελλάδα η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί ένα σημαντικό μέρος του πρωτογενή τομέα παραγωγής. Παρότι συμβάλλει σημαντικά στην ενίσχυση της οικονομίας της χώρας τα παραπροϊόντα και τα απόβλητά της είναι δύσκολο να διαχειριστούν λόγω της ποικιλότητας και της εποχικότητάς τους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή αξιοποίηση των υπολειμμάτων ελαιουργίας στη καλλιέργεια των βασιδιομυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*, και αξιολογήθηκε η απόδοση της παραγωγής βιομάζας. Ακόμη, εκτιμήθηκε η αποτοξικοποίηση των αποβλήτων με τα προαναφερθέντα είδη αλλά και η ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονται σε αυτήν. Ως τελικός στόχος τέθηκε η διερεύνηση της διατροφικής αξίας και της πιθανής πρεβιοτικής δράσης των ειδών αυτών προκειμένου να παραχθούν προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

Μέσω των πειραματικών διαδικασιών παρατηρήθηκε ότι όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν κατόρθωσαν να μειώσουν κατά το ήμισυ περίπου της αρχικής συγκέντρωσής τους το ολικό φαινολικό φορτίο και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, καθώς και να παράγουν υψηλότερη βιομάζα όταν καλλιεργήθηκαν σε 50% υγρά απόβλητα τριφασικού ελαιοτριβείου (YAE). Αντίστοιχη μείωση χρώματος και φυτοτοξικότητας παρατηρήθηκε σε μέσο καλλιέργειας με 12,5% YAE σε όλα τα στελέχη. Επίσης, διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά στην παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων διαπιστώθηκε από το *P. ostreatus* και το *G. lucidum* VK-7400 σε σχέση με το *G. lucidum* LGAM 9720 για την αποτοξικοποίηση του υγρού αποβλήτου. Στα πρώτα παρατηρήθηκε κυρίως ενεργότητα λακκάσης, ενώ στο άλλο της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης.

Η χρήση του διφασικού αποβλήτου και κλαδεμάτων ελιάς σε συγκέντρωση έως και 50% σε μείγμα με άχυρο σίτου στη καλλιέργεια σε στερεά υποστρώματα δεν επηρέασε τη μυκηλιακή ανάπτυξη και τη βιολογική αποδοτικότητα του *P. ostreatus* IK 1123. Αντίθετα με το *G. lucidum* LGAM 9720, το οποίο εμφάνισε σημαντικές διαφορές σε οποιαδήποτε τροποποίηση του υποστρώματος του, το *G. lucidum* VK-7400 δεν εμφάνισε διαφορές στη μυκηλιακή ανάπτυξη και στη παραγωγή καρποφοριών σε συγκεντρώσεις μέχρι και 75% διφασικό απόβλητο και κλαδέματα ελιάς με πριονίδι οξιάς. Ακόμη, αποδείχθηκε ότι το στερεό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκαν τα δύο στελέχη *Ganoderma lucidum* επηρέασε τη σύσταση των καρποφοριών τους, με αποτέλεσμα οι καρποφορίες του *G. lucidum* VK-7400 που αναπτύχθηκαν σε 50% διφασικό απόβλητο να παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα σε τέφρα και ολικές ινώδεις ουσίες, ενώ το *G. lucidum* LGAM 9720

παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά τέφρας και ολικών ινωδών ουσιών σε αυτά που προήλθαν από 75% και 25% περιεκτικότητα σε κλαδέματα ελιάς αντίστοιχα.

Τέλος, εντοπίστηκε μία πιθανή πρεβιοτική δράση των επιλεγμένων μυκηλίων και καρποφοριών βασιδιομυκήτων διότι με τη χρήση τους στο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο συνέβαλλαν στην υψηλή ανάπτυξη των προβιοτικών μικροοργανισμών *Lactobacillus acidophilus* και του *L. gasseri*. Αντίθετα, παρατηρήθηκε πως τα μπιφιδοβακτήρια δεν ανταπεξήλθαν ικανοποιητικά σε τέτοιου είδους υποστρώματα και παρουσίασαν χαμηλή ανάπτυξη. Επιπλέον, οι καρποφορίες που είχαν αναπτυχθεί σε εμπλουτισμένα υποστρώματα με κλαδέματα ελιάς ευνόησαν την αύξηση των *L. acidophilus* και *B. longum*.

Abstract

The olive cultivation in Greece, is an important part of the primary production sector. Although it contributes significantly to the country's economy, its by-products and wastes are difficult to manage because of their variety, composition and seasonality.

In this study, the potential for exploiting residues of olive oil production as substrates for the cultivation of the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* was examined. Furthermore, the detoxification of olive mill wastewater (OMWW) through the use of these species was evaluated and the activity of involved enzymes was estimated. The ultimate goal was to investigate the nutritional value and the potential prebiotic activity of mycelia and basidiomata of these species growing on different substrates in order to produce value added products.

All strains were able to reduce the total phenolic content and the organic load (COD) approximately at the half of their initial concentration and to produce increased biomass when cultivated in media containing 50% OMWW (v/v in water). Reduction in phytotoxicity and decolorization was observed when the culture medium was enriched with 12,5% OMWW for all strains tested. In addition, *P. ostreatus* and *G. lucidum* VK-7400 demonstrated different enzymes activity in respect to *G. lucidum* LGAM 9720 when grown in OMWW. Laccase activity was mainly observed in *P.ostreatus* and *G.lucidum* VK-7400, while the manganese dependent peroxidase was measured in *G. lucidum* LGAM 9720.

The use of two phase olive mill waste (TPOMW) and olive prunings to a concentration of up to 50% in a mixture with wheat straw when the three species were cultivated on solid substrates, has not affected the mycelial growth and the biological efficiency of *P. ostreatus* IK 1123. Unlike *G.lucidum* LGAM 9720, which showed significant variation in cultivation-related parameters in any modification of the substrate used, the *G. lucidum* VK-7400 showed no differences in mycelial growth and mushroom production at concentrations of up to 75% TPOMW and olive prunings with beech sawdust. Moreover, it turned out that the type of solid substrate on which the two strains of *G. lucidum* were growing affected the composition of the mushrooms. As a result, mushrooms of *G. lucidum* VK-7400 grown in 50% TPOMW substrates showed increased ash and crude fibers content. On the other hand, *G. lucidum* LGAM 9720 showed increased contents of total ash and crude fibers in substrates composed of olive prunings (75% and 25% respectively).

Finally, after screening o selected basidiomycetes (mycelia from 17 spp. and mushrooms from 6 spp.) used as a sole carbon source for the growth of probiotic strains, it

was observed that *L. acidophilus* could grow in all mycelia-based substrates, and for five of them it could grow better than in the control culture (MRS). The same probiotic strain could also use the mushroom-based substrate from the six basidiomycetes as the sole carbon source.

In some cases, mushrooms (*G.lucidum* and *P.ostreatus*) originating from enriched substrates with 50% TPOMW or 50% OLPR could promote the growth of lactobacilli (*Lactobacillus acidophilus* and *L. gasseri*) . On the contrary, it was noticed that the mushrooms grown in the same substrates did not favour the growth of *B.bifidum*. *B.longum* could also use as a sole carbon source mushrooms (*G.lucidum* and *P.ostreatus*) from these enriched substrates and in some cases (*G.lucidum* in BS+50% OLPR) their growth was enhanced.

Πρόλογος

Στα πλαίσια των υποχρεώσεων του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε η ερευνητική εργασία με τίτλο "Έλεγχος της πρεβιοτικής δράσης εδώδιμων μανιταριών που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας". Η ρύπανση από τα Υγρά Αποβλήτα της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου, καθώς και η μη γνώση της ορθής διαχείρισης των υπολοίπων παραπροϊόντων αποτελεί μείζον θέμα στην Ελλάδα αλλά και σε όλη την λεκάνη της Μεσογείου.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να διερευνηθούν οι καλλιεργητικές τεχνικές και η απόδοση στην παραγωγή βιομάζας μυκήτων των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* που αναπτύσσονταν σε διάφορα παραπροϊόντα-απόβλητα ελαιοκομίας. Επίσης, να διερευνηθεί η πιθανή πρεβιοτική δράση και διατροφική αξία τόσο των μυκηλίων από τα δύο προαναφερθέντα είδη βασιδιομυκήτων όσο και των καρποφοριών τους που αναπτύχθηκαν σε συμβατικά και σε υποστρώματα που περιείχαν υπολείμματα ελαιουργίας. Τέλος, εξετάστηκε η αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιοτριβείου από τα δύο είδη και η ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονταν στη διαδικασία.

Η πειραματική διαδικασία της καλλιέργειας των μανιταριών και της αποτοξικοποίησης των υγρών αποβλήτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με τη χρήση της υλικοτεχνικής υποδομής του Εργαστηρίου Διατροφής Αγροτικών Ζώων του Γ.Π.Α πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της σύστασης των μανιταριών. Τέλος, η διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής. Ιδιαίτερα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Κυριακού Αδαμαντίνη, για την αμέριστη συμπαράσταση της, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς επίσης και για την προσεκτική διόρθωση του κειμένου της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζερβάκη Γεώργιο, του οποίου η εργαστηριακή και βιβλιογραφική στήριξη ήταν ουσιώδης. Κατά την διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της εργασίας μου, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο σημαντική ήταν η συμβολή και καθοδήγηση που μου παρείχε, ο υποψήφιος διδάκτορας Κουτρώτσιος Γεώργιος, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια

διδάκτορα Μήτσου Ευδοκία και την Δρ. Κώτσου Μαρία για τη συνεχή τους καθοδήγηση και στήριξη στο εργαστηριακό μέρος που έλαβε χώρα στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τέλος, είμαι ευγνώμων σε όλους όσους συνέβαλαν με τον οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας μου. Ιδιαίτερα στους φίλους μου, Γιάννη, Ευγενία και Βασιλική, και στους γονείς μου, οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν ψυχή και σώματι όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	2
Abstract	4
Πρόλογος	6
Πίνακας περιεχομένων.....	8
Εισαγωγή	11
1. Καλλιέργεια Ελιάς	11
1.1 Ιστορικό και προέλευση.....	11
1.2 Βοτανική ταξινόμηση	12
1.3 Οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας στην Ελλάδα και στην Ευρώπη	12
1.4 Εξαγωγή ελαιολάδου	14
1.5 Τελικά παραπροϊόντα	19
1.5.1 Αέρια απόβλητα	19
1.5.2 Στερεά παραπροϊόντα	19
1.5.3 Υγρά απόβλητα	21
1.6 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις της λειτουργίας των ελαιοτριβείων.....	21
1.7 Διαχείριση αποβλήτων.....	22
1.7.1 Διαχείριση διαφασικού αποβλήτου.....	22
1.7.1.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι	23
1.7.1.2 Απευθείας διάθεση στο έδαφος	23
1.7.1.3 Βιοτεχνολογικές μετατροπές των ΑΔΕ	24
1.7.1.4 Ανάκτηση προϊόντων προστιθέμενης αξίας	25
1.7.1.5 Άλλες προοπτικές	26
1.7.2 Διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου	26
1.7.2.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας.....	26
1.7.2.2 Εξάτμιση	27
1.7.2.3 Απευθείας διάθεση στο έδαφος	27
1.7.2.4 Βιολογικοί μέθοδοι επεξεργασίας.....	28
1.7.2.5 Άλλες μέθοδοι.....	30
2. Μύκητες.....	31
2.1 Μορφολογία και βιολογία μυκήτων	32
2.2 Βασιδιομύκητες	33
2.2.1 Βιολογία.....	33
2.2.2 Οικοφυσιολογία	34
2.2.3 Βιοχημεία	34
2.3 Ένζυμα αποικοδόμησης λιγνίνης.....	36
2.3.1 Λιγνινάσες.....	36
2.3.2 Υπεροξειδάσες Μαγγανίου.....	36
2.3.3 Λακάσες.....	36
2.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές επιλεγμένων βασιδιομυκήτων.....	37
2.4.1 Αποτοξικοποίηση αποβλήτων γεωργικών βιομηχανιών.....	37
2.4.2 Αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών.....	38
2.5 <i>Pleurotus</i> spp.	40
2.5.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	41
2.5.2 Διατροφική αξία- Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	41
2.6 <i>Ganoderma</i> spp.	42
2.6.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	43
2.6.2 Διατροφική αξία- Φαρμακευτικές ιδιότητες.....	44
2.7 Πρεβιοτική δράση.....	44

2.7.1 Ινουλίνη	46
2.7.2 β-γλυκάνες	46
2.8 Προβιοτικά.....	49
2.8.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	51
2.8.2 <i>Bifidobacterium</i> spp.	52
3. Σκοπός της εργασίας.....	53
Υλικά και μέθοδοι.....	54
4. Καλλιέργεια σε υγρά υποστρώματα	54
4.1 Παραγωγή μυκηλίου	54
4.2 Προσδιορισμός βιομάζας, τελικού pH, αποχρωματισμού και ηλεκτρικής αγωγιμότητας	56
4.3 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου.....	56
4.4 Προσδιορισμός φυτοτοξικότητας	57
4.5 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)	57
4.6 Προσδιορισμός ενεργότητας λακκάσης.....	59
4.7 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των υπεροξειδασών (εξαρτώμενης και μη εξαρτώμενης του μαγγανίου).....	60
4.7.1. Προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των υπεροξειδασών (εξαρτημένων και μη του μαγγανίου)	60
4.7.2. Προσδιορισμός της δράσης της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του μαγγανίου)....	61
4.7.3 Προσδιορισμός της δράσης της υπεροξειδάσης του μαγγανίου	62
4.8 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης.....	62
4.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης.....	63
5. Καλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα.....	63
5.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα.....	63
5.2 Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού "σπόρου" για καλλιέργεια μανιταριών	65
5.3 Καλλιέργεια μανιταριών	66
5.4 Ανάλυση σύστασης παραχθέντων μανιταριών	68
5.4.1. Προσδιορισμός της τέφρας	68
5.4.2. Προσδιορισμός λιπαρών ουσιών	69
5.4.3 Προσδιορισμός ινωδών ουσιών	69
5.4.4 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών	70
6. Πρεβιοτική δράση	71
6.1 Καλλιέργεια <i>Lactobacillus acidophilus</i> και <i>L. gasseri</i>	72
6.2 Καλλιέργεια <i>Bifidobacterium bifidum</i> και <i>B. longum</i>	75
7. Στατιστική ανάλυση.....	78
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	79
8. Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα	79
8.1 Προσδιορισμός pH, ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ξηρής βιομάζας και αποχρωματισμού	79
8.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου	84
8.3 Προσδιορισμός φυτοτοξικότητας	84
8.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)	85
8.5 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων	86
9. Καλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα.....	91
9.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα.....	91
9.2 Αποτελέσματα της καλλιέργειας μανιταριών	93
9.3 Ανάλυση σύστασης μανιταριών	99
9.3.1. Προσδιορισμός της τέφρας.....	99
9.3.2. Προσδιορισμός ινωδών ουσιών	101

9.3.3 Προσδιορισμός των ολικών λιπαρών	102
9.3.4 Προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών	103
10. Έλεγχος πρεβιοτικών ιδιοτήτων	104
10.1 Ανάπτυξη <i>Lactobacillus acidophilus</i>	104
10.1.1 Ανάπτυξη του <i>L. acidophilus</i> σε υλικό εμπλουτισμένο με σκόνη μυκηλίου βασιδιομυκήτων.....	105
10.1.1.1 Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. acidophilus</i> σε μυκήλια 14 ειδών βασιδιομυκήτων..	105
10.1.1.2. Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. acidophilus</i> σε μυκήλια των <i>Ganoderma lucidum</i> VK- 7400, <i>G. lucidum</i> 9720 και <i>Pleurotus ostreatus</i>	108
10.1.2 Ανάπτυξη του <i>L. acidophilus</i> σε υλικό εμπλουτισμένο με σκόνη από καρποφορίες βασιδιομυκήτων.....	110
10.1.2.1 Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. acidophilus</i> σε καρποφορίες των <i>G. lucidum</i> 7400, <i>G.</i> <i>lucidum</i> 9720, <i>P. ostreatus</i> 1123, <i>P. ostreatus</i> , <i>A. cylindracea</i> , <i>H. erinaceus</i> 4514.....	110
10.1.2.2 Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. acidophilus</i> σε καρποφορίες των <i>G. lucidum</i> 9720 και <i>P. ostreatus</i> 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα.....	112
10.2 Ανάπτυξη <i>Lactobacillus gasseri</i>	116
10.2.1. Έλεγχος ανάπτυξης του <i>L. gasseri</i> σε καρποφορίες των <i>G. lucidum</i> 9720 και <i>P.</i> <i>ostreatus</i> 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα	116
10.3 Ανάπτυξη <i>Bifidobacterium bifidum</i>	118
10.3.1. Έλεγχος ανάπτυξης του <i>Bifidobacterium bifidum</i> σε καρποφορίες των <i>G. lucidum</i> 9720 και <i>P. ostreatus</i> 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα.....	118
10.4 Ανάπτυξη <i>Bifidobacterium longum</i>	121
10.4.1. Έλεγχος ανάπτυξης του <i>Bifidobacterium longum</i> σε καρποφορίες των <i>G. lucidum</i> 9720 και <i>P. ostreatus</i> 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα	121
10.5 Συζήτηση.....	124
Συμπεράσματα	128
Βιβλιογραφία	Error! Bookmark not defined.
Παράρτημα.....	141

Εισαγωγή

1. Καλλιέργεια Ελιάς

1.1 Ιστορικό και προέλευση

Η ελαιουργία αποτελεί μία από τις παραδοσιακές καλλιέργειες που ασκούνται στη περιοχή της Μεσογείου, παράλληλα με την αμπελουργία και τη καλλιέργεια των δημητριακών (Loumou and Giourga, 2003). Η Ελλάδα, καθότι χώρα της Λεκάνης της Μεσογείου, ήταν πρωτοπόρα στη καλλιέργεια της ελιάς λόγω των πολυάριθμων προϊόντων της, τα οποία είχαν στο παρελθόν διάφορες χρήσεις όπως λιπαντικό, αντισηπτικό κ.α, ενώ αποτελούσαν και βασικό στοιχείο της ελληνικής διατροφής κατά την αρχαιότητα (Θερίος, 2005). Το ελαιόλαδο ήταν ένα από τα βασικά συστατικά των φυσικών καλλυντικών του παρελθόντος (Κυδώνη, 1999) και διέθετε ποικίλους συμβολισμούς κατά τη διάρκεια των χρόνων, όπως στην αρχαία Ελλάδα όπου θεωρούνταν σύμβολο ειρήνης, σοφίας και νίκης αλλά και στο Ισραήλ όπου χρησιμοποιούνταν κατά τη στέψη των βασιλέων τους (Θερίος, 2005). Μέχρι σήμερα όμως δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως το πότε ξεκίνησε η ευρεία εκμετάλλευση του δένδρου και ο τύπος προέλευσης του είδους.

Η καταγωγή του ελαιόδενδρου (*Olea europaea* L.) είναι ακόμα υπό διερεύνηση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καθότι καμία από τις καταγωγές που έχουν αποδοθεί κατά καιρούς από τους ερευνητές δεν είναι ευρέως αποδεκτή. Κάποιοι υποστηρίζουν ότι προέρχεται από τη Μικρά Ασία, άλλοι από την Αβησσυνία ή την Αίγυπτο αλλά και τη Συρία (Θερίος, 2005, Μπαλατσούρας, 1997, Fooks, 1995). Η καλλιέργεια της σε χώρες της Μεσογείου τοποθετείται κατά την αρχαιότητα, ενώ για τον Ελλαδικό χώρο πιο συγκεκριμένα η πρώτη αναφορά πραγματοποιείται στην ελληνική μυθολογία, όπου ο Δίας θεωρούνταν ο προστάτης του ιερού δένδρου της ελιάς (Loumou and Giourga, 2003). Πολυάριθμες απεικονίσεις της ανευρίσκονται σε βάζα και δαχτυλίδια στο παλάτι της Κνωσού από τα Μυκηναϊκά και Μινωικά χρόνια (Fooks, 1995, Θερίος, 2005, Ποντίκης, 2000). Ακόμη, παλαιοντολογικά ευρήματα αναφέρονται στην Ιταλία, στη Γαλλία και στην Ελλάδα, όπου εκεί συνδέονται με τη περιοχή της Κύμης Ευβοίας (Θερίος, 2005). Σύμφωνα με αναφορές στην Κύπρο η καλλιέργεια και η κατανάλωση των προϊόντων της ελιάς υπήρχε κατά τη Νεολιθική περίοδο (Gregoriou, 2001). Τελικώς η καλλιέργεια επεκτείνεται τον 16^ο Αιώνα στην Αμερική όπου φτάνει μέσω των αποίκων της από την Ιβηρική Χερσόνησο, ενώ σήμερα αυτή έχει εξαπλωθεί μέχρι τη Ν. Αφρική, την Αυστραλία και την Ιαπωνία (Ποντίκης, 2000, Θερίος, 2005).

Πλέον, η ελιά καλλιεργείται σε όλες σχεδόν τις ηπείρους, με τις παραμεσόγειες χώρες να έχουν την υψηλότερη παραγωγή. Συγκεκριμένα, η Ευρώπη παράγει τα $\frac{3}{4}$ της παγκόσμιας παραγωγής και ηγούνται αυτής η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα. Παρόλο που πλέον οι ζώνες καλλιέργειας έχουν επεκταθεί έως τη Νότιο Αφρική, την Ιαπωνία, την Αργεντινή, τη Χιλή μέχρι και σε ορισμένες περιοχές του Πακιστάν και της Κίνας.

1.2 Βοτανική ταξινόμηση

Η ελιά είναι αείφυλλο, αιωνόβιο καρποφόρο δέντρο της οικογένειας *Oleaceae* η οποία περιλαμβάνει 30 γένη και 180 είδη όπως *Olea*, *Ligustrum*, *Fraxinus*, *Syringa* και φέρει καρπούς σαρκώδεις ή ξηρούς. Φυτό δικότυλο, αγγειόσπερμο, σπερματοφύτο, συμπέταλο και με διπλοειδείς ποικιλίες με αριθμό χρωμοσωμάτων $2x=46$ (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005). Το γένος *Olea* περιλαμβάνει 30-35 είδη εκ των οποίων το *Olea europaea* φέρει την υψηλότερη οικονομική σημασία.

Η *Olea europaea* φαίνεται να περιλαμβάνει διαφορετικές ποικιλίες, οι οποίες προήλθαν ύστερα από φυσικές προσαρμογές του είδους λόγω κλιματικών συνθηκών ή από μεταλλάξεις ή υβριδισμό (Θεριός, 2005, Fooks, 1995). Οι κυριότερες είναι η άγρια ελιά (*Olea europaea* var. *oleaster* ή *Olea europaea* var. *sylvestris*) και η ήμερη ή κοινή ελιά (*Olea europaea* var. *sativa*), η οποία εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση ελαίου στο μεσοκάρπιο και την υψηλότερη παραγωγή (Terral and Genevieve, 1996). Μέλη του γένους θεωρούνται τα τροπικά και υποτροπικά Αφροασιατικά είδη *O. chrysophilla* και *O. excels* (Θεριός, 2005).

1.3 Οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας στην Ελλάδα και στην Ευρώπη

Αρχικά πριν την πλήρη ανάλυση της οικονομικής σημασίας του ελαιολάδου και του ελαιοκάρπου στην Ελλάδα και στην Ευρώπη πρέπει να αναφερθεί η μορφολογία του πολύτιμου αυτού καρπού. Ο καρπός της ελιάς είναι σφαιρικός ή ελλειψοειδής, δρύπη και αποτελείται από το περικάρπιο, ο λεγόμενος φλοιός, το μεσοκάρπιο δηλαδή τη σάρκα και το ενδοκάρπιο τον πυρήνα της ελιάς, όπου στο εσωτερικό του βρίσκεται το σπέρμα. Το χρώμα των καρπών διαφοροποιείται κατά τα στάδια της ωρίμανσης από πράσινο σε πρασινοκίτρινο, ιώδες, μελανοιώδες και τέλος μαύρο ενώ παράλληλα ο φλοιός γίνεται στιλπνός, μειώνεται η συγκέντρωση σε σάκχαρα από 10% σε 1-2% και αυξάνεται η περιεκτικότητα σε λάδι.

Η καλλιέργεια της ελιάς καταλαμβάνει ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της ελληνικής αλλά και της παγκόσμιας δενδροκομικής καλλιέργειας, ενώ τα κύρια προϊόντα της, η επιτραπέζια ελιά και το ελαιόλαδο, λόγω των ιδιαίτερων διαιτητικών τους ιδιοτήτων συμβάλλουν σημαντικά στην οικονομία. Οι βασικότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου και είναι αυτές που καταναλώνουν το 87% της παγκόσμιας παραγόμενης ποσότητας ελαιολάδου, με ένα μεγάλο αριθμό ελαιόδενδρων στη χώρα μας (130.000.000) (Θερίος, 2005, Καρποδίνη-Δημητριάδη, 1999, Loumou and Giourga, 2003, Michelakis, 2001). Επίσης η Ελλάδα παρουσιάζει την υψηλότερη κατά κεφαλήν κατανάλωση ελαιολάδου της τάξεως των 16kg/κάτοικο ετησίως το 2007, η οποία είναι χαμηλότερη σε σχέση με το παρελθόν λόγω αντικατάστασης του ελαιολάδου από λοιπά φυτικά έλαια τα τελευταία χρόνια (Εθνική Τράπεζα, 2011).

Ένα από τα κύρια προϊόντα της καλλιέργειας της ελιάς είναι το ελαιόλαδο, το οποίο με το πέρασμα των χρόνων αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία λόγω της σημαντικής διατροφικής του αξίας και των ιδιαίτερων οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι μεσογειακές χώρες έχουν την υψηλότερη κατανάλωση και παραγωγή ελαιολάδου. Χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατανάλωσαν το 2012-2013 1857000tn ενώ έπονται οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής με μόλις 294000tn (<http://www.internationaloliveoil.org>). Στον Πίνακα 3 καταγράφεται λεπτομερώς η κατανάλωση ελαιολάδου σε μερικές χώρες της Ε.Ε. από το 2009-2013. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι την υψηλότερη κατανάλωση την παρουσιάζουν οι χώρες παραγωγοί.

Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο με καλλιεργούμενη έκταση ελιών παραγωγής ελαιολάδου να ανέρχεται σε 808300 ha (Πίνακας 1). Σε όλα τα διαμερίσματα της χώρας εντοπίζονται ελαιόδενδρα τα οποία είτε αποτελούν μέρος ενός οργανωμένου ελαιώνα είτε φύονται διάσπαρτα σε καλλιεργούμενες εκτάσεις (Ποντίκης, 2000). Οι λόγοι που οδήγησαν στην επέκταση της καλλιέργειας κατά τη διάρκεια των ετών είναι ότι αποτελεί μία από τις παραδοσιακές καλλιέργειες στην Ελλάδα, όπως και σε άλλες Μεσογειακές χώρες, αλλά και το γεγονός ότι αξιοποιούνται εκτάσεις ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, όπως επικλινή εδάφη (Ποντίκης, 2000). Ακόμη, το ελαιόλαδο είναι ένα από τα βασικά προϊόντα που συμμετέχουν στην εμπορική ανταλλαγή αγαθών μεταξύ Βορρά και Νότου με αποτέλεσμα να συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του εισοδήματος των Ελλήνων και των λοιπών Ευρωπαίων ελαιοπαραγωγών (Loumou and Giourga, 2003, Θερίος, 2005). Στον Πίνακα 2 παρατηρούμε μια σταθερότητα ως προς την

παραγωγή ελαιολάδου της Ελλάδας έως το 2013 καθώς και τη διακυμάνση της παραγωγής ανά έτος λόγω της παρεννιαυτοφορίας του δένδρου. Η πρώτη ελαιοπαραγωγός χώρα στην Ευρώπη αλλά και στον κόσμο είναι η Ισπανία, με τον υψηλότερο αριθμό δένδρων στην επικράτειά της και ακολουθούν η Ιταλία και η Ελλάδα. Η ελιά πλέον καλλιεργείται και σε άλλες χώρες εκτός από τις παραμεσόγειες, όπως στις ΗΠΑ, Χιλή, Αυστραλία, Κίνα κ.α, με αποτέλεσμα τη δημιουργία προβλήματων διάθεσης και τη μείωση της τιμής των ελαιοκομικών προϊόντων (Θεριός, 2005, Ποντίκης, 2000). Τέλος, η τιμή του ελαιολάδου λόγω της μηχανοποίησης της γεωργικής πρακτικής, της αυξανόμενης παραγωγής φθηνών και χαμηλότερης διατροφικής αξίας ελαίων και της αυξανόμενης προσφοράς ελαιολάδου από άλλες χώρες διαγράφει πτωτική πορεία τα τελευταία χρόνια, η οποία από 2,3€/kg την περίοδο 2000-2008 έγινε 1,9€/kg το 2009 (Loumou and Giourga, 2003, Εθνική τράπεζα, 2011, Ποντίκης, 2000).

1.4 Εξαγωγή ελαιολάδου

Η Ελλάδα διαθέτει περισσότερα από 130 εκατ. ελαιόδενδρα και περίπου 2100 ελαιοτριβεία δυναμικότητας κατά μέσο ορο 170tn ελαιολάδου, το 2009 (Εθνική Τράπεζα, 2011). Τα ελαιοτριβεία είναι κυρίως μονάδες μέσου οικονομικού μεγέθους, συνεταιριστικές (50%) ή ιδιωτικές (50%) ενώ λειτουργούν εποχιακά από το τέλος Οκτωβρίου μέχρι τις αρχές Μαρτίου. Σύμφωνα με τη κλαδική μελέτη της ICAP του 2007, οι περισσότερες επιχειρήσεις βρίσκονται στη Πελοπόννησο και συγκεκριμένα στους νομούς Ηλείας και Μεσσηνίας, και στη Κρήτη στο νομό Ηρακλείου (Πίνακας 4).

Κατά τη διάρκεια των ετών αναπτύχθηκαν αρκετοί τύποι ελαιοτριβείων. Αρχικά, εντοπίζεται το παραδοσιακό ελαιουργείο όπου το σπάσιμο και η άλεση του καρπού πραγματοποιούνταν με μυλόπετρες με τη βοήθεια ζώων, μετέπειτα μέσω της υδραυλικής πίεσης ενώ πλέον κυριαρχεί η χρήση φυγοκεντρικού διαχωριστή τριών ή δύο φάσεων (Οικονόμου, 1999). Στα παραδοσιακά ελαιουργεία αφού γινόταν η αποφύλλωση και το πλύσιμο του καρπού, στη συνέχεια πραγματοποιούνταν η άλεσή του με τη χρήση μυλόπετρας, από όπου προέκυπτε η ελαιοζύμη. Έπειτα για τον διαχωρισμό της στερεάς από την υγρή φάση, ένα μέρος της ελαιοζύμης απλωνόταν σε λινάτσα, τοποθετούνταν η μία πάνω στην άλλη και εφαρμοζόταν υδραυλική πίεση. Ακολούθως τα τοποθετούσαν σε δεξαμενές καθίζησης για κάποιο χρονικό διάστημα με στόχο να καθιζάνουν και τα τελευταία στερεά υπολείματα. Τέλος, με τη χρήση του διαφορετικού ειδικού βάρους του νερού από το ελαιόλαδο γινόταν ο διαχωρισμός τους (Αρέθας, 1999, Φακλάρης και

Σταματοπούλου, 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υπόσκαφα ελαιοτριβεία που έχουν εντοπιστεί σε ένα ελληνόφωνο χωριό της κάτω Ιταλίας, τα οποία βρίσκονται σε βάθος 4-5 m από την επιφάνεια του εδάφους και εγκαταλείφθηκαν περίπου το 1800-1840 (Μουζάκης, 1999).

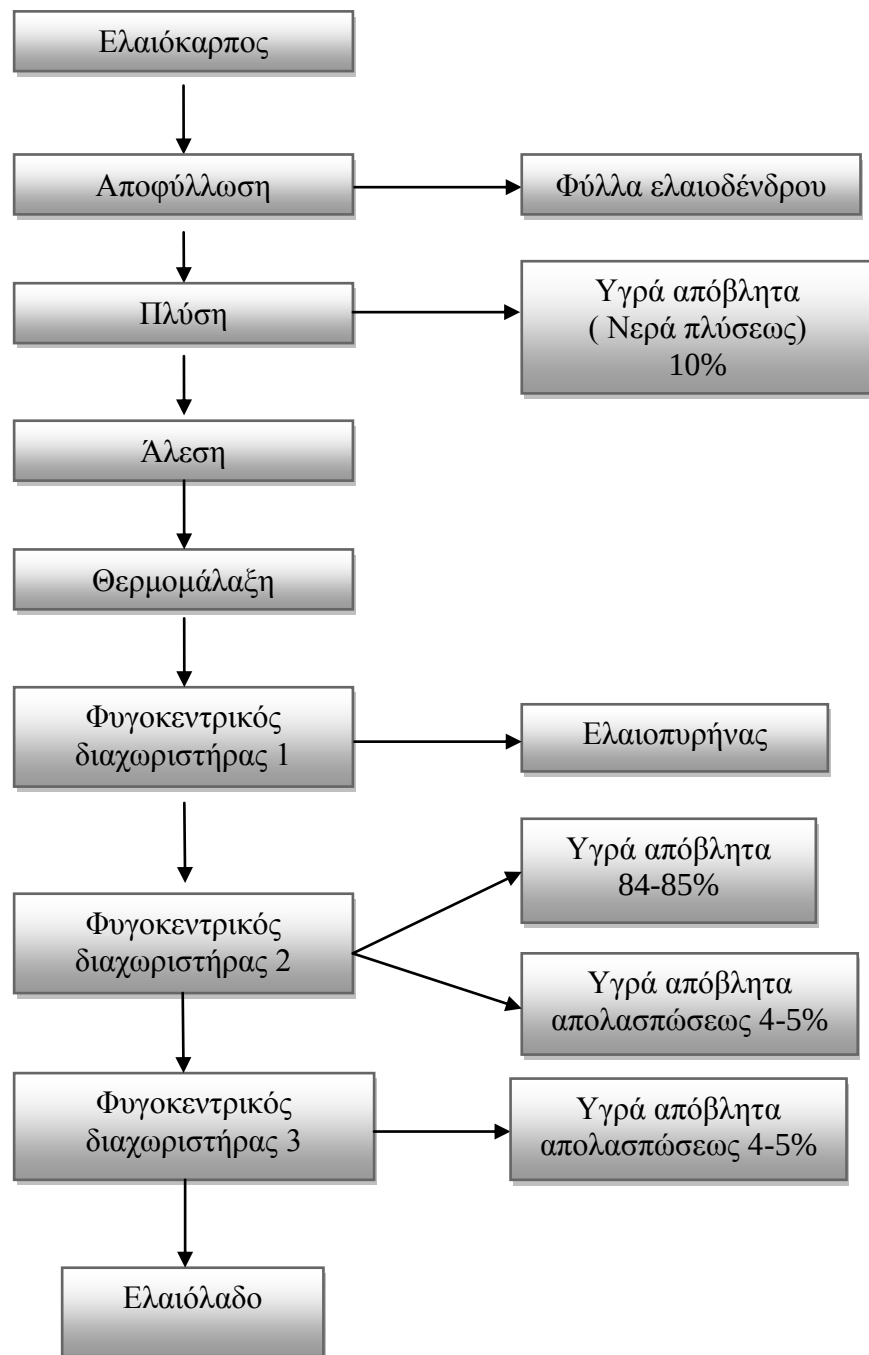
Πλέον στη χώρα μας κυριαρχούν τρεις τύποι ελαιοτριβείων, τα κλασσικού τύπου με την χρήση υδραυλικής πίεσης, όπου κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960-1980 λόγω έλλειψης εργατικών χεριών και της επιτακτικής ανάγκης αυτοματοποίησης της παραγωγής ξεκίνησε η εγκατάλειψη τους και άρχισαν να επικρατούν του φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων. Ενώ πλέον λόγω πίεσης της Ευρωπαϊκής Ένωσης για φιλικότερες προς το περιβάλλον βιομηχανίες εξαγωγής ελαιολάδου, μέσω επιδοτήσεων τα διφασικού τύπου ελαιοτριβεία αρχίζουν να κατακτούν έδαφος. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την κλαδική μελέτη της Εθνικής τράπεζας, το 2011 τα φυγοκεντρικού τύπου ελαιοτριβεία τριών φάσεων αποτελούσαν το 80% του συνόλου στη χώρα ενώ του κλασσικού μόλις το 18% και τα διφασικά ελαιοτριβεία να είναι ελάχιστα (Βέρβερη, 2004, Εθνική Τράπεζα, 2011). Αντίθετα με την Ισπανία όπου τα διφασικά ελαιοτριβεία αποτελούν το 87% του συνόλου της χώρας.

Η εξαγωγή του ελαιολάδου ακολουθεί τα παρακάτω στάδια. Αρχικά παραλαμβάνεται και αποθηκεύεται προσωρινά ο ελαιόκαρπος σε σακιά ή σε διάτρητα κασόνια ("κλούβες") μετά τη συλλογή, αλλά συνήθως επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση του χρόνου αυτού του σταδίου για να μην «ανάψει» ο καρπός. Έπειτα ακολουθεί η αποφύλλωση και η πλύση του με στόχο την απομάκρυνση φερτών υλικών και τυχών ελαιόφυλλων που έχουν συλλεχθεί εκ παραδρομής, τα οποία και επηρεάζουν τη ποιότητα του ελαιολάδου. Κατόπιν, ακολουθεί η άλεση και η θραύση του ελαιοκάρπου και έπειτα η μάλαξη της ελαιοζύμης για τριάντα λεπτά με τη συμβολή θερμού νερού, που δεν ξεπερνά τους 25⁰ C, κατά την οποία απελευθερώνεται το ελαιόλαδο από τα φυτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, με τη κατάλληλη ποσότητα νερού σε θερμοκρασία κατώτερη των 30⁰ C αραιώνεται η ελαιοζύμη στα τριών φάσεων ελαιοτριβεία. Τέλος, ανάλογα με τον τύπο του ελαιοτριβείου εξάγεται το ελαιόλαδο είτε με πίεση είτε με φυγοκέντρωση ενώ απαραίτητο είναι το τελικό στάδιο κατά το οποίο ο καθαρισμός του ελαιολάδου από το νερό και τις ξένες ύλες πραγματοποιείται με τη βοήθεια της φυγοκέντρωσης (Θερίος, 2005, Γεωργακάκης, 1994, Κυριακόπουλος, 2005).

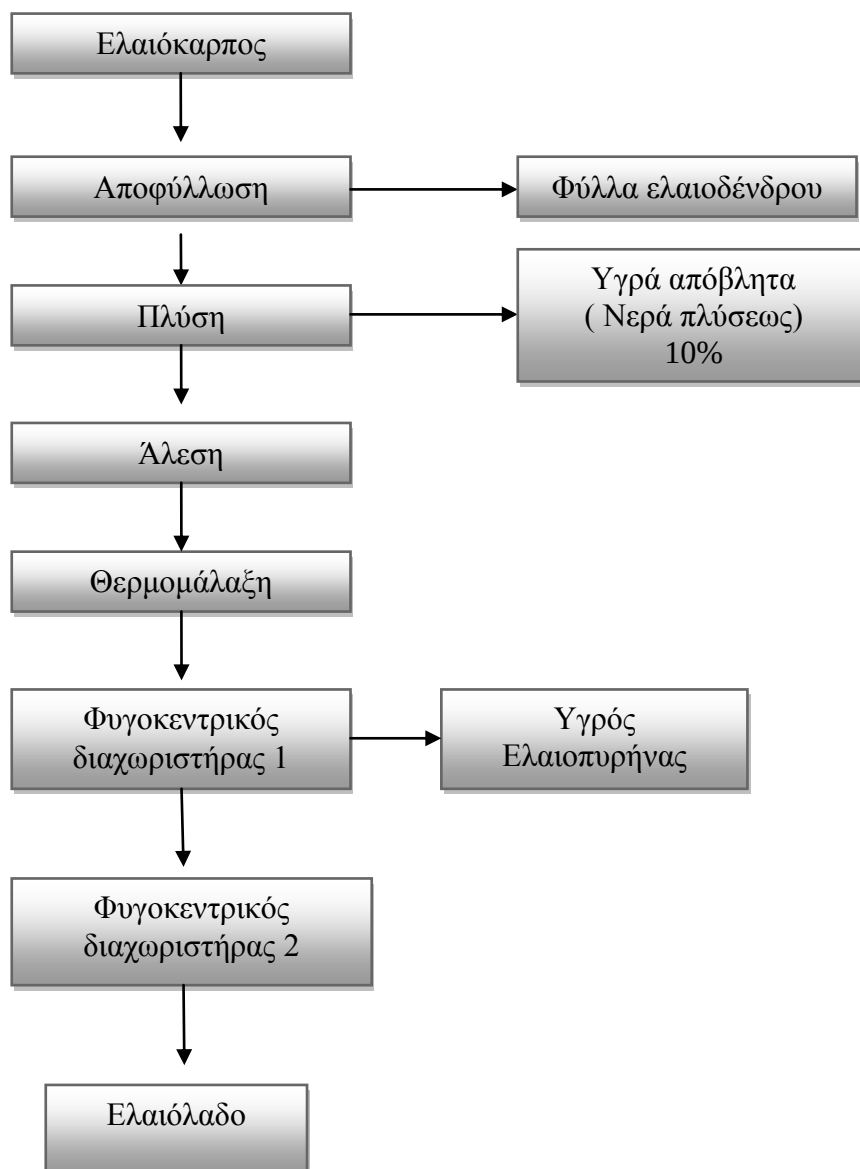
Στα ελαιοτριβεία υδραυλικής πίεσεως οι ελιές πιέζονται με στόχο τον διαχωρισμό του ελαιολάδου και του νερού από τον ελαιοπυρήνα. Έπειτα με τη βοήθεια των κάθετων

διαχωριστήρων, διαχωρίζεται το ελαιόλαδο από το νερό και τις φερτές ύλες ενώ παραλείπεται το στάδιο της αραίωσης του ελαιολάδου (Θερίος, 2005). Παλαιότερα γινόταν διπλή ζύμωση και συμπίεση αλλά λόγω της αύξησης του κόστους έχει εξαλειφθεί (Fooks, 1995).

Τα ελαιοτριβεία φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων ακολουθούν ακριβώς τα ίδια στάδια με αυτά του παραδοσιακού μέχρι την θερμομάλαξη. Ύστερα ακολουθεί αραίωση της ελαιοζύμης με νερό θερμοκρασίας μικρότερη των 30°C και οδηγείται σε φυγοκεντρικό διαχωριστήρα. Εκεί λόγω διαφορετικού ειδικού βάρους των συστατικών της ελαιοζύμης, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός της σε τρεις φάσεις: στο ελαιόλαδο, στον ελαιοπυρήνα και στα υγρά απόβλητα (*Διάγραμμα 1*). Το σύστημα δύο φάσεων αποτελεί μία παραλλαγή των τριών φάσεων κατά το οποίο δεν απαιτείται αραίωση της ελαιοζύμης ενώ η τελευταία διαχωρίζεται με τη χρήση φυγοκεντρικού διαχωριστήρα σε ελαιόλαδο και διφασική ελαιοπυρήνα (*Διάγραμμα 2*).



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα επεξεργασίας ελαιοκάρπου σε ελαιοτριβείο τριφασικού τύπου



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα επεξεργασίας ελαιοκάρπου σε ελαιοτριβείο διφασικού τύπου

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα του φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων ελαιοτριβείο είναι η υψηλότερη παραγωγή υγρών αποβλήτων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, τα οποία αποτελούνται κυρίως από το νερό κατά το στάδιο της πλύσης και κατά το στάδιο του διαχωρισμού, από τους χυμούς του ελαιοκάρπου και τα υπολείμματα της ελαιομάζας.

Ακόμη, πρέπει να επισημανθεί ότι τα ελαιοτριβεία δύο φάσεων ονομάζονται και οικολογικά λόγω της χαμηλής κατανάλωσης νερού, η οποία είναι μειωμένη έως και 80%, αλλά και της ενέργειας κατά 20%. Στην Ισπανία μέσω κρατικής χρηματοδότησης έχουν αντικατασταθεί σε πολύ υψηλό ποσοστό τα τριφασικού τύπου από διφασικά ελαιοτριβεία (Azbar *et al.*, 2004). Τέλος, το κλασσικού τύπου ελαιοτριβείο παρουσιάζουν πολύ υψηλό κόστος εργατικών και μικρή απόδοση σε ελαιόλαδο.

1.5 Τελικά παραπροϊόντα

Το μεγαλύτερο πρόβλημα της ελαιοκαλλιέργειας είναι η διάθεση, η ποικιλότητα και η εποχικότητα των παραπροϊόντων της, τα οποία διαφοροποιούνται ανάλογα με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής, τις καλλιεργητικές τεχνικές και τον τύπο του ελαιοτριβείου. Τα απόβλητα μπορούν να διαχωριστούν σε αέρια, στερεά και υγρά, όπου αποτελούν το κυριότερο πρόβλημα λόγω των ιδιαίτερων χημικών χαρακτηριστικών τους.

1.5.1 Αέρια απόβλητα

Η παραγόμενη ποσότητα των αέριων αποβλήτων, τα οποία περιλαμβάνουν καυσαέρια που παράγονται από τα μηχανήματα εσωτερικής καύσεως, θεωρείται αμελητέα ενισχυόμενη από το γεγονός ότι οι μονάδες παραγωγής ελαιολάδου χωροθετούνται εκτός των αστικών κέντρων. Αντίθετα, τα στερεά και κυρίως τα υγρά απόβλητα αποτελούν το μεγαλύτερο περιβαλλοντικό πρόβλημα στις χώρες της Μεσογείου.

1.5.2 Στερεά παραπροϊόντα

Τα στερεά απόβλητα, τα οποία περιλαμβάνουν κλαδίσκους, φύλλα ελιάς, πέτρες και τον ελαιοπυρήνα, παράγονται κατά το στάδιο της συλλογής και της αποφύλλωσης του ελαιοκάρπου καθώς και της εξαγωγής του ελαιολάδου. Σύμφωνα με τον Γεωργακάκη (1994) και τους Ei and Karakaya (2009) παράγονται 3-5 kg ελαιόφυλλα κατά τη διάρκεια της αποφύλλωσης 100 kg ελαιοκάρπου στο ελαιοτριβείο. Τα κλαδέματα ελιάς αποτελούν μία εύκολα προσβάσιμη και φτηνή λιγνινοκυτταρινούχα πηγή, και υπολογίζεται ότι ετησίως παράγονται περί τους 3 τόνους ανά εκτάριο ελαιώνα (Conde *et al.*, 2009, Martin *et al.*, 2010). Στην Ελλάδα εμφανίζει μαζί με τα υπολείμματα της καλλιέργειας καλαμποκιού, τις υψηλότερες ποσότητες γεωργικών υπολειμμάτων, υπολογίζεται δε ότι παράγονται περίπου 1.468.587 tn ελαιοκλαδεμάτων ετησίως (Skoulou and Zabaniotou, 2007).

Από την αρχαιότητα ακόμη, το ξύλο ελιάς χρησιμοποιούνταν ως καύσιμη ύλη και ως πρώτη ύλη σε ξύλινες κατασκευές λόγω της υψηλής ανθεκτικότητας του, ενώ τα φύλλα αποτελούσαν καλή ζωοτροφή (Φακλάρης και Σταματοπούλου, 1999). Σήμερα στον ελλαδικό χώρο κύρια πρακτική αποτελεί η καύση των ελαιόκλαδων στον αγρό ύστερα από το κλάδεμα, με αποτέλεσμα την ρύπανση της ατμόσφαιρας. Διάφοροι συγγραφείς θεωρούν τη διαχείριση αυτών των υπολειμμάτων εφικτή καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ζωοτροφή (Roig *et al.*, 2006). Τέλος, κάποιοι ερευνητές παρουσίασαν εναλλακτικούς τρόπους διαχείρισης των κλαδεμάτων και των φύλλων ελιάς όπως είναι η παραγωγή αιθανόλης ύστερα από υδρόλυση τους και η παραγωγή ενέργειας από βιομάζα (Martin *et al.*, 2010, Spinneli and Picchi, 2010).

Το σημαντικότερο στερεό παραπροϊόν είναι ο ελαιοπυρήνας ο οποίος παράγεται κατά το στάδιο του διαχωρισμού του πυρήνα από τη πάστα ελιάς και αποτελείται από το μείγμα καρπού και γιγάρτου της ελιάς. Η παραγόμενη ποσότητά και η σχετική του υγρασία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο του ελαιοτριβείου. Έτσι, σε ελαιοτριβεία κλασσικού τύπου από την επεξεργασία 1000 kg ελαιοκάρπου παράγονται 400 kg ελαιοπυρήνα με ποσοστό υγρασίας 30-35% ενώ σε φυγοκεντρικού τύπου τριών φάσεων παράγονται 500-600 kg ελαιοπυρήνα με ποσοστό υγρασίας 45-50% (Azbar *et al.*, 2004, Roig, 2006). Ο ελαιοπυρήνας του παραδοσιακού και του τριφασικού ελαιοτριβείου οδηγείται σε πυρηνελουργεία, στα οποία ξηραίνεται στους 60⁰ C και έπειτα από εκχύλιση με χρήση εξανίου παράγεται πυρηνέλαιο, ελαιόλαδο κατώτερης ποιότητας, και πυρηνόξυλο το οποίο αποτελεί εξαιρετική καύσιμη ύλη. Ο ελαιοπυρήνας διφασικού ελαιοτριβείου ή απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου (ΑΔΕ) αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία διότι δεν μπορεί να επεξεργαστεί από τα περισσότερα υπάρχοντα πυρηνελουργεία κυρίως λόγω της υψηλής σχετικής υγρασίας του, η οποία μπορεί να είναι πάνω από 65% λόγω των υγρών πλύσης που εμπεριέχονται από την εξαγωγή του ελαιολάδου (Χρυσοβαλάντου, 2010, Roig *et al.*, 2006). Η παραγόμενη ποσότητα αντιστοιχεί σε 800 kg ανά 1000 kg ελαιοκάρπου (Roig *et al.*, 2006). Χαρακτηρίζεται από έντονα δυσάρεστη οσμή, σκούρο χρώμα και σχετικά όξινο pH, όπως φαίνεται στο Πίνακα 5. Κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία του πριν τη διάθεση του στο περιβάλλον διότι παρουσιάζει υψηλό οργανικό φορτίο και είναι ιδιαίτερα τοξικό.

1.5.3 Υγρά απόβλητα

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων (ΥΑΕ) αποτελούν το κυριότερο περιβαλλοντικό πρόβλημα στα οικοσυστήματα των Μεσογειακών χωρών λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Παράγονται σε όλων των τύπων τα ελαιοτριβεία εκτός από του διαφασικού, κυρίως κατά το τελικό στάδιο εξαγωγής του ελαιολάδου.

Τα ελαιόζουμα ή κατσίγαρος (όπως αλλιώς ονομάζονται τα ΥΑΕ) χαρακτηρίζονται από τις τοξικές τους ιδιότητες λόγω των οργανικών τους συστατικών, όπως τα οργανικά οξέα, λιπίδια, αλκοόλες και πολυφαινόλες (Roig *et al.*, 2006). Η ποσότητα που παράγεται από 1000 kg ελαιοκαρπου αντιστοιχεί σε 1000-1200 kg κατσίγαρου σε τριφασικό ελαιοτριβείο και 600 kg σε παραδοσιακού τύπου (Azbar *et al.*, 2004). Χαρακτηρίζονται από έντονο σκούρο χρώμα, δυσάρεστη οσμή, όξινο pH και θολότητα (Πίνακας 6). Οι πολυφαινόλες και οι λιπαρές ουσίες απαντώνται μεν σε μικρό βαθμό αλλά αποτελούν το βασικότερο πρόβλημα διάθεσής τους, καθώς περιορίζουν τον αριθμό των μικροοργανισμών που μπορούν να τα αποικοδομήσουν, προσδίδουν τοξικές ιδιότητες και βιοαποικοδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό (Γεωργακάκης, 1994).

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους τα απόβλητα αυτού του τύπου δεν πρέπει να διατίθενται ανεξέλεγκτα στο περιβάλλον χωρίς προηγούμενη διαχείριση και επεξεργασία διότι μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιβαρυντικά για αυτό.

1.6 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις της λειτουργίας των ελαιοτριβείων

Ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα που εμφανίζεται στις ελαιοπαραγωγικές χώρες είναι η απόρριψη των αποβλήτων ελαιουργίας, τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερη τοξική δράση και διαθέτουν υψηλή ρυπογόνο δύναμη. Η συνήθης πρακτική στον Ελλαδικό χώρο είναι η ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στους υδάτινους αποδέκτες είτε απευθείας στο έδαφος χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, με αποτέλεσμα την ρύπανση των υπόγειων υδροφόρων οριζόντων. Σημαντικοί λόγοι που επιτείνουν το σημαντικό πρόβλημα της αποτελεσματικής επεξεργασίας τους είναι η εποχικότητα, η μεγάλη διασπορά των ελαιοτριβείων και οι οικονομικά δαπανηροί τρόποι διαχείρισης (Ouzounidou *et al.* 2010).

Οι σημαντικότερες επιπτώσεις που παρατηρούνται πέρα από τον χρωματισμό των υδάτων είναι η τοξικότητα στην πανίδα και στη χλωρίδα. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες, σε χρωστικές ουσίες, οι υψηλές τιμές του βιοχημικά (BOD₅) και του

χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) και η υψηλή συγκέντρωση των πολυφαινολών φαίνεται να είναι τα κύρια χαρακτηριστικά που αποδίδουν στα απόβλητα αυτές τις αρνητικές επιδράσεις (Ouzounidou *et al.* 2010). Ακόμη, η υψηλή συγκέντρωση φωσφόρου είναι η αιτία της έντονης ανάπτυξης των αλγών, το οποίο συνεισφέρει στο φαινόμενο του ευτροφισμού. Οι κύριοι παρεμποδιστές της οξυγόνωσης των υδάτινων αποδεκτών είναι το BOD₅, το COD και οι λιπαρές ουσίες. Το έντονο σκούρο χρώμα προκαλείται από τις χρωστικές που περιέχει τα ΥΑΕ, οι οποίες εμποδίζουν τη διέλευση της ηλιακής ακτινοβολίας και δυσχεραίνουν τη φωτοσύνθεση. Τέλος οι πολυφαινόλες προσδίδουν τις βιοτοξικές ιδιότητες (Μπαλατσούρας, 1997).

Η ανεξέλεγκτη διάθεση των ΥΑΕ γενικότερα οδηγεί σε φαινόμενα ευτροφισμού και οικολογική ανισορροπία στα υδάτινα οικοσυστήματα. Για αυτό το λόγο σύμφωνα με την οδηγία της Ε.Ε. 2000/60 για την προστασία των υδάτων έγιναν προσπάθειες για τον περιορισμό της αλόγιστης απόρριψης και την αποκατάσταση των λεκανών απορροής και των παράκτιων ζωνών.

1.7 Διαχείριση αποβλήτων

Τόσο για τα ΑΔΕ όσο και για τα ΥΑΕ έχουν προταθεί ποικίλοι τρόποι διαχείρισης και επεξεργασίας τους. Μερικοί ερευνητές προσπάθησαν να περιορίσουν την παραγωγή τους μέσω της μείωσης της χρήσης νερού (Azbar *et al.*, 2004). Τα βασικότερα προβλήματα που πρέπει αρχικά να υπολογισθούν είναι η εποχικότητα τους, η οποία δυσχεραίνει την αποθήκευση και την μεταφορά τους, η δυσκολία αποικοδόμησης των φαινολικών συστατικών και το υψηλό οργανικό φορτίο.

1.7.1 Διαχείριση διφασικού αποβλήτου

Ειδικά όσον αφορά στα ΑΔΕ, όπως προαναφέρθηκε, η επεξεργασία τους από τα υφιστάμενα πυρηνελουργεία είναι δύσκολη και απαιτείται προσαρμογή των υφιστάμενων υλικοτεχνικών υποδομών που διαθέτουν ώστε να μπορεί να καταστεί εφικτή η διαχείριση τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την επεξεργασία τους, ορισμένες από τις οποίες παραθέτονται ενδεικτικά:

1.7.1.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Ξήρανση του αποβλήτου και παραγωγή πυρηνελαίου

Η υψηλή σχετική υγρασία αυτού του τύπου αποβλήτων απαιτεί υψηλότερα ποσοστά ενέργειας, ενώ λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης σακχάρων η διαχείριση και ξήρανση του υγρού ελαιοπυρήνα καθίσταται δυσκολότερη, αυξάνοντας έτσι και την πιθανότητα ανάφλεξης τους στα πυρηνελουργεία. Για το λόγο αυτό, ο Arjona και οι συνεργάτες του (1999) προσπάθησαν να αναπτύξουν ένα κατάλληλο πρότυπο για το σχεδιασμό ενός ξηραντηρίου, προσδιορίζοντας τις ακριβείς συνθήκες θερμοκρασίας, ταχύτητας αέρα και υγρασίας. Ακόμη, οι Fadiloglu και οι συνεργάτες του (2003) μετέτρεψαν τα λιπαρά οξέα του ελαιοπολτού -με τη χρήση ενζύμων- σε τριγλυκερίδια με τελικό σκοπό τη μείωση της οξύτητας του πυρηνελαίου. Τέλος, οι Krokida και οι συνεργάτες του (2002) πρότειναν τη χρήση περιστρεφόμενου ξηραντήρα βιομηχανικού τύπου αξιολογώντας το και από οικονομική σκοπιά.

Ανάκτηση ενέργειας μέσω της καύσης του αποβλήτου

Ύστερα από τη ξήρανση των ΑΔΕ οι ερευνητές προσπάθησαν να ανακτήσουν ενέργεια μέσω της καύσης και πραγματοποίησαν μια οικονομική μελέτη για το κόστος που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η μετατροπή αυτή (Caputo *et al.*, 2003, Celma *et al.*, 2007, Roig *et al.*, 2006). Τέλος, παρήχθηκε συνθετικό αέριο, μίγμα CO και H₂ μέσω της αεριοποίησης του ελαιοπυρήνα, με τη βοήθεια του οποίου παρασκευάζονται χημικά προϊόντα όπως CH₃OH και NH₃ (Jurado *et al.*, 2003).

1.7.1.2 Απευθείας διάθεση στο έδαφος

Αρκέτες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί εξετάζοντας την απευθείας εναπόθεση των ΑΔΕ στο έδαφος ως εδαφοβελτιωτικά, καθώς είναι σχετικά πλούσια σε φώσφορο, κάλιο και σε διάφορα μικροστοιχεία, ενώ παράλληλα μπορούν να εμπλουτίσουν σε οργανική ουσία φτωχά και άγονα εδάφη. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Thompson και Nogales (1999), λόγω της υψηλής αναλογίας άνθρακα προς άζωτο υπάρχει κίνδυνος να τροποποιηθεί ο κύκλος του αζώτου στο έδαφος, ενώ υπάρχει η πιθανότητα να επέλθει ανισορροπία στα θρεπτικά συστατικά του εδάφους. Συνιστάται επίσης, η παράλληλη προσθήκη νιτρικών λιπασμάτων με στόχο την αύξηση του διαθέσιμου φωσφόρου (Roig *et al.*, 2006).

Τέλος, σε μελέτες κατά τις οποίες διατέθηκαν ΑΔΕ απευθείας στο έδαφος του ελαιώνα, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του φώσφορου, του καλίου, αζώτου και της οργανικής ύλης προκαλώντας αύξηση της παραγωγής (Lopez-Pineiro *et*

al., 2008). Παράλληλα δεν παρατηρήθηκαν τροποποιήσεις στα μικροβιολογικά και χημικά χαρακτηριστικά του εδάφους αλλά ούτε και αλλοιώσεις στη ποιότητα του ελαιολάδου που προέκυψε (Nasini *et al.*, 2013).

1.7.1.3 Βιοτεχνολογικές μετατροπές των ΑΔΕ

Επεξεργασία με χρήση μυκήτων

Τα ΑΔΕ έχουν εξεταστεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η διάσπαση της λιγνίνης και των πολυφαινολών καθώς και η αύξηση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητες για τη χρήση του αποβλήτου ως καλής ποιότητας ζωοτροφή. Έχουν δοκιμαστεί διάφορων ειδών μύκητες (και βακτήρια), όπως ο *Paecilomyces variotii* με τον οποίο προσπάθησαν να αυξήσουν το ποσοστό πρωτεΐνης καθώς και βασιδιομύκητες, όπως είδη *Pleurotus*, *Ganoderma*, το *Phanerochaete chrysosporium* κ.α. λόγω της δυνατότητάς τους να διασπούν τη λιγνίνη και άλλες συγγενείς ενώσεις (Brozzoli *et al.*, 2010, Giannoutsou *et al.*, 2012, Haddadin *et al.*, 2002, Ntougias *et al.* 2012).

Με τη βοήθεια του μύκητα λευκής σήψης *Coriolopsis rigida* επιτεύχθηκε η υψηλότερη αποδόμηση οργανικών ενώσεων, φαινολικών και μείωση της φυτοτοξικότητας διαφασικού αποβλήτου σε σύγκριση με τους *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Poria subvermispora* και *Pleurotus pulmonarius* (Sampedro *et al.*, 2007). Επίσης, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου διαφόρων μυκήτων λευκής σήψης σε διάφορα στερεά υποστρώματα (μεταξύ των οποίων και το απόβλητο διαφασικών ελαιουργείων) ώστε να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνθήκες αποικισμού τους. Οι μύκητες που εξετάστηκαν ήταν οι *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *Agrocybe aegerita* (=cylindracea), *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* and *Auricularia auricula-judae* (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2010, Zervakis *et al.*, 2001).

Δημιουργία λιπάσματος μέσω αερόβιας ζύμωσης (κομποστοποίησης)

Το σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής λιπάσματος ("κομπόστ") από ΑΔΕ οδήγησε στη διεξαγωγή εκτεταμένων ερευνών. Απαραίτητη κρίθηκε η ανάμειξη τους με άλλα αγροτικά υπολείμματα με στόχο τη δημιουργία της κατάλληλης δομής που θα επέτρεπε την κομποστοποίηση του μίγματος. Οι λόγοι που επέβαλλαν στους μελετητές να προβούν στη διαδικασία αυτή αποτελούν η υψηλή υγρασία και η ημιστερεή φύση τους (Roig *et al.*, 2006). Τα υλικά διόγκωσης-ανάμιξης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι το

άχυρο, η στρώμνη προβάτου, το πριονίδι από λεύκες, απόβλητα από βαμβάκι, στέμφυλα οиноποίησης, φύλλα ελιάς και φρέσκια κλινοστρώμνη αγελάδας (Albuquerque *et al.*, 2009, Cayuela *et al.*, 2006, Roig *et al.*, 2006, Zervakis *et al.* 2011). Το τελικό παραχθέν προϊόν εμφανίζει πολύ καλές ιδιότητες, περιέχει σημαντικές ποσότητες θρεπτικών στοιχείων, εμφανίζει υψηλό βαθμό χουμοποίησης και είναι απαλλαγμένο από τις φυτοτοξικές ιδιότητες του αποβλήτου (Cayuela *et al.*, 2006), ενώ εμφανίζει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην λίπανση κηπευτικών καλλιεργειών (Zervakis *et al.* 2011).

Αναερόβια χώνευση

Ένας ακόμη εναλλακτικός τρόπος διαχείρισης των ΑΔΕ είναι η παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοαιθανόλη, μεθάνιο, υδρογόνο) μέσω της αναερόβιας χώνευσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή περιεκτικότητα σε μεθάνιο που προσεγγίζει το 75-80% (Roig *et al.*, 2006). Παρατηρήθηκε ότι το υψηλό ποσοστό των φαινολικών ενώσεων και η βιοτοξικότητα αποτελούσαν ανασταλτικό παράγοντα στη μεσόφιλη αναερόβια χώνευση σε εργαστηριακή κλίμακα, αλλά υπήρχε σχετικά υψηλή παραγωγή μεθανίου, σύμφωνα με τους Borja *et al.* (2003). Τέλος, η χρήση λίμνης εξατμισοδιαπνοής ως φυσικός τρόπος βιοαποικοδόμησης μπορεί να αποτελέσει και προκαταρκτικό στάδιο της αναερόβιας χώνευσης (Borja *et al.*, 2006).

1.7.1.4 Ανάκτηση προϊόντων προστιθέμενης αξίας

Το ενδιαφέρον των ερευνητών κέντρισε η περίπτωση της παραγωγής προϊόντων όπως η πηκτίνη, από τα ΑΔΕ, λόγω της μείωσης του κόστους παραγωγής της σε υψηλό βαθμό. Η πηκτίνη παράγεται συνήθως από πούλπα μήλων και εσπεριδοειδών και χρήζει ιδιαίτερης σημασίας στη βιομηχανία τροφίμων. Θετικά αποτελέσματα παρέλαβαν οι ερευνητές στη προσπάθεια τους να παράγουν πηκτίνη από ΑΔΕ διότι παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου σε σύγκριση με αυτή που προέρχονταν από τα εσπεριδοειδή (Cardoso *et al.*, 2003). Τέλος, λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων τόσο στα ΑΔΕ όσο και στα υγρά απόβλητα, οι οποίες εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αντιυπερτασικές ιδιότητες, διερευνάται περαιτέρω η χρήση τους σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Obied *et al.*, 2005).

1.7.1.5 Άλλες προοπτικές

Εν κατακλείδι είναι πάρα πολλές οι προοπτικές και οι τρόποι διαχείρισης του διφασικού αποβλήτου που έχουν έως τώρα μελετηθεί. Μερικοί προτείνουν τη χρήση των αποβλήτων στο μηχανισμό βιορρόφησης για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από τα νερά (Pagnanelli *et al.*, 2003).

1.7.2 Διαχείριση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου

Τα ΥΑΕ λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου, των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και άλλων αρνητικών για το περιβάλλον χαρακτηριστικών, δεν επιτρέπεται να εφαρμοστούν απευθείας στο έδαφος ή σε υδάτινους αποδέκτες.

Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί κατά καιρούς αλλά δεν εφαρμόζονται, κυρίως λόγω του υψηλού τους κόστους. Στην Ελλάδα πραγματοποιείται πρωτίστως η προσωρινή αποθήκευση τους σε εξατμισοδεξαμενές. Μερικά κριτήρια που συνήθως λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή του είδους της διαχείρισης είναι το κόστος εφαρμογής, η αποδοτικότητα, ενώ τα τελευταία χρόνια πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ανακύκλωση του νερού που εμπεριέχεται σε αυτά. Το κυριότερο όμως όλων είναι η μείωση της φυτοτοξικότητάς τους μέσω της μείωσης του οργανικού φορτίου, το οποίο ειδικότερα αφορά στη περίπτωση εφαρμογής τους σε πολυετείς (κυρίως) καλλιέργειες.

Παρακάτω αναλύονται διάφορες φυσικοχημικές, βιοτεχνολογικές και άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί κατά το πέρας των χρόνων από διάφορους μελετητές.

1.7.2.1 Φυσικοχημικές μέθοδοι επεξεργασίας

Κατεργασία με οξείδιο ή υδροξείδιου του ασβεστίου (CaO ή $\text{Ca}(\text{OH})_2$)

Αυτή η μέθοδος αποτελεί ένα μέρος της κλασσικής μεθόδου αποθήκευσης των ΥΑΕ σε εξατμισοδεξαμενές, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην Ελλάδα. Αρχικά επιτυγχάνεται καθίζηση των αιωρούμενων στερεών μέσω της μεταφοράς των αποβλήτων σε δεξαμενές, όπου αφήνονται σε ηρεμία για 24-48 ώρες. Έπειτα, ακολουθεί η μεταφορά σε άλλες δεξαμενές όπου πραγματοποιείται προσθήκη οξειδίου ή υδροξειδίου του ασβεστίου της τάξεως των 5-10g/lit με στόχο την αύξηση του pH μέσω της εξουδετέρωσης των οξέων, ενώ παράλληλα προκαλείται κροκίδωση και σχηματισμός ιζήματος στον πυθμένα. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο μερικός αποχρωματισμός του αποβλήτου και η μείωση του ρυπαντικού φορτίου κατά 60-70% (Μπαλατσούρας, 1997).

Κατεργασία με θερμική συμύκνωση

Σε περιοχές με υψηλή ηλιοφάνεια προτάθηκε η εξάτμισή τους με τη βοήθεια πολυβάθμιων συμπυκνωτών, έχοντας σαν τελικό αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου τους έως και 75%. Επιπροσθέτως, επιτυγχάνεται η επαναχρησιμοποίηση του εξατμισμένου νερού και η επανάκτηση του ελαιολάδου που εμπεριέχεται στα απόβλητα (Μπαλατσούρας, 1997).

1.7.2.2 Εξάτμιση

Η χρήση των εξατμισοδεξαμενών και των λιμνών παράλληλα με τις δεξαμενές είναι οι κυριότεροι μέθοδοι διαχείρισης στην Ελλάδα αλλά και στη Μεσόγειο. Οι λόγοι που οδήγησαν στην ευρεία διάδοση τους είναι το χαμηλό κόστος εγκατάστασης και οι υψηλές θερμοκρασίες που κυριαρχούν στη Μεσόγειο και κρίνονται απαραίτητες για το φαινόμενο της εξάτμισης (Roig *et al.*, 2006).

Πρόκειται για στεγανές δεξαμενές όπου αποθηκεύεται το απόβλητο για μεγάλο χρονικό διάστημα και με τη συνεισφορά της ηλιακής ακτινοβολίας επιτυγχάνεται η εξάτμισή του. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι οι μεγάλες εκτάσεις που απαιτούνται για την εγκατάσταση της δεξαμενής και η δυσάρεστη οσμή που εκλύεται κατά το στάδιο της εξάτμισης (Roig *et al.*, 2006). Τελευταίες μελέτες προτείνουν την προεπεξεργασία το αποβλήτου με εφαρμογή Ca(OH)_2 ή CaO διότι διαπιστώθηκε ότι μειώνει τις δυσάρεστες μυρωδιές ενώ ταυτόχρονα επιταχύνει την διεργασία της εξάτμισης (Aktas *et al.*, 2001, Lagioudanaki *et al.*, 2003).

Επιπλέον στο πυθμένα της δεξαμενής ή λίμνης συγκεντρώνεται λάσπη, η οποία εμφανίζει έντονη δυσοσμία και αποτελείται από ένα υψηλό ποσοστό του αρχικού αποβλήτου που προστέθηκε (20%). Έχουν προταθεί ποικίλοι τρόποι εκμετάλλευσης της λάσπης, μεταξύ των οποίων είναι η κομποστοποίησή της μαζί με άχυρο σιταριού και απόβλητα βαμβακιού και η παρασκευή καυσίμων σε συνδυασμό με τον ελαιοπυρήνα. Τέλος, συζητήθηκε και η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως υλικό προσθήκης για κατασκευαστικά υλικά (Roig *et al.*, 2006).

1.7.2.3 Απευθείας διάθεση στο έδαφος

Στη περίπτωση της απευθείας διάθεσης των υγρών αποβλήτων μέσω της άρδευσης καλλιεργούμενων εκτάσεων, αξιοποιείται η υψηλή συγκέντρωσή τους σε θρεπτικά στοιχεία και κυρίως σε κάλιο και φώσφορο. Επίσης, η υψηλή περιεκτικότητα των ΥΑΕ σε

φαινολικά, σε ανόργανα άλατα και το χαμηλό pH είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά τους που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή κατά την εφαρμογή της μεθόδου (Roig *et al.*, 2006).

Η χρήση της μεθόδου αυτής σε καλλιέργεια σκληρού σιταριού χωρίς προηγούμενη επεξεργασία επέφερε προβλήματα τοξικότητας και προκάλεσε την εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα, καθιστώντας έτσι απαραίτητη την εφαρμογή της σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Rinaldi *et al.*, 2003).

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιείται πολύ στην Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία και Ελλάδα κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους εφαρμογής (Ehaliotis *et al.* 2003). Το σημαντικότερο μειονέκτημά της είναι ότι απαιτούνται μεγάλες εκτάσεις εφαρμογής και ότι την εποχή που παράγονται οι απαιτήσεις των φυτών σε νερό είναι χαμηλές (Γεωργακάκης, 1994). Επίσης, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στο καθορισμό του τύπου εδάφους και της υδατοπερατότητας αυτού ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα. Ακόμη, ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματά του είναι η αντιμικροβιακή του δράση που το καθιστά ικανό στη προληπτική του εναπόθεση στο έδαφος πριν τη σπορά για την αντιμετώπιση παθογόνων όπως ο *Rhizoctonia solani* (Kotsou *et al.*, 2004).

1.7.2.4 Βιολογικοί μέθοδοι επεξεργασίας

Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τόσο αερόβιες όσο και αναερόβιες μετατροπές. Στόχος τους αποτελεί η βιοτεχνολογική μετατροπή των υγρών αποβλήτων, με τη βοήθεια μικροοργανισμών, σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας και παράλληλα η μείωση του ρυπαντικού τους φορτίου, ώστε να καλυφθεί το κόστος της μετατροπής (Zervakis and Balis 1996a, Μπαλατσούρας, 1997).

Αερόβια επεξεργασία

Η αερόβια επεξεργασία περιλαμβάνει την αερόβια βιολογική επεξεργασία η οποία συμπεριλαμβάνει -μεταξύ άλλων- την παραγωγή βιολογικού λιπάσματος και compost, την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης και τέλος την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών.

Η παραγωγή της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης βασίζεται στη συνεχή καλλιέργεια της ζύμης *Candida utilis* και πρώτη φορά η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία το 1958. Η καλλιέργεια βασίζεται στην πλούσια περιεκτικότητα των ΥΑΕ σε αφομοιώσιμες πηγές οργανικού άνθρακα από μικροοργανισμούς (Γεωργακάκης, 1994). Η πρωτεΐνη που παράγεται είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλόκου Β, αμινοξέα και είναι κατάλληλη

για εμπλουτισμό ζωοτροφών. Το υψηλό κόστος παραγωγής και η απουσία συνεχούς ροής στην επεξεργασία αποτέλεσαν απαγορευτικούς παράγοντες για την περαιτέρω εξάπλωση της μεθόδου (Μπαλατσούρας, 1997).

Το 1977 έγιναν προσπάθειες να αποτοξικοποιηθούν τα υγρά απόβλητα μέσω οξειδωτικών μικροοργανισμών αλλά απέτυχε διότι ήταν εξαιρετικά δύσκολη έως ανέφικτη η αποδόμηση των τοξικών ενώσεων του αποβλήτου, με αποτέλεσμα να αποικοδομηθεί μόλις το 50% (Γεωργακάκης, 1994). Επίσης, το κόστος λειτουργίας και εγκατάστασης μίας τέτοιας μονάδας ήταν δυσβάσταχο για οποιαδήποτε επιχείρηση (Μπαλατσούρας, 1997).

Η παραγωγή βιολογικού λιπάσματος υγρής φάσης είχε ως στόχο τη μετατροπή του επιβαρυνμένου κλάσματος των αποβλήτων από μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια που δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (*Azotobacter vinelandii*), σε υγρό λίπασμα. Το προϊόν που τελικά παρήχθηκε είναι απαλλαγμένο από οποιαδήποτε φυτοτοξική δράση, το pH του έχει διαμορφωθεί στο 7,5-8 και μπορεί να εφαρμοστεί απ'ευθείας σε όλες τις καλλιέργειες ως έχει ή έπειτα από αραίωση με νερό (Chatzipavlidis *et al.* 1996, Ehaliotis *et al.* 1999).

Περαιτέρω, εκτεταμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή compost με χρήση ΥΑΕ, καθότι με το τρόπο αυτό εξαλείφονται οι πιθανές αρνητικές επιδράσεις που μπορεί να υπήρχαν από την απευθείας εναπόθεση τους στο έδαφος. Το υγρό απόβλητο προστίθεται στα υλικά υποστρώματα πριν ξεκινήσει η διαδικασία κομποστοποίησης και τα υλικά που έχουν έως τώρα εξεταστεί είναι αγροτικά, δασικά και ζωικά υπολείμματα (Roig *et al.*, 2006). Επιπρόσθετα, κάποιοι ερευνητές διαπίστωσαν ευεργετική δράση του compost στην παραγωγή όταν εφαρμόζεται σε καλλιέργειες (Roig *et al.*, 2006).

Ακόμη, σε πολλές εργασίες χρησιμοποιήθηκαν μύκητες λευκής σήψης, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως αποικοδομητές δύσκολων ενώσεων, για τη μείωση του ρυπαντικού τους φορτίου. Μελετήθηκε η μείωση των φαινολών, του COD και ο αποχρωματισμός των αποβλήτων μέσω της ενζυμικής τους δραστηριότητας σε καλλιέργειες τους σε υγρά ή στερεά μέσα. Ενδεικτικά, ορισμένοι από τους μύκητες που μελετήθηκαν είναι οι *Coriolus* (=Trametes) *versicolor*, *Funalia* (=Trametes) *trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* (=pulmonarius), *Lentinus tigrinus* και *Laetiporus sulphureus* (Yesilada *et al.* 1999). Οι Zervakis κ.α. (1996) εξέτασαν τα δύο είδη *Pleurotus* (*P. pulmonarius* και *P. eryngii*) αποδεικνύοντας ότι μπορούν να

αφαιρέσουν ένα μεγάλο ποσοστό των φαινολών, να αποχρωματίσουν τα απόβλητα και να τα χρησιμοποιήσουν για τη παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Τέλος, αποδείχθηκε ότι εάν διαβραχεί το κοινό υπόστρωμα καλλιέργειας των μανιταριών, δηλαδή άχυρο με πίτουρο, με αραιωμένο κατά 25% κατσίγαρο σε νερό βρύσης δεν επηρεάζεται η συνολική παραγωγή του *P. ostreatus* (Kalmis *et al.*, 2008). Αντίθετα, όταν προστεθεί 75% κατσίγαρος παρουσιάζονται τοξικά φαινόμενα ενώ στο 50% υπάρχει μία μικρή καθυστέρηση στον αποικισμό του υποστρώματος από το μυκήλιο.

Αναερόβια επεξεργασία

Στόχος της αναερόβιας επεξεργασίας είναι η παραγωγή βιοαερίου και η επαναχρησιμοποίηση των εκροών της στην άρδευση. Ύστερα από προσπάθειες παραγωγής βιοαερίου στην Ελλάδα διαπιστώθηκε ότι υπήρξε αποικοδόμηση της τάξεως του 75-80% του αρχικού ρυπαντικού φορτίου των υγρών αποβλήτων (Γεωργακάκης, 1994).

Τα κυριότερα μειονεκτήματα που εντοπίζονται σε αυτή τη μέθοδο είναι πέρα από το υψηλό κόστος εγκατάστασης, η ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό και η ανασταλτική δράση των φαινολικών ουσιών και των οργανικών οξέων έναντι των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την αναερόβια χώνευση (Roig *et al.*, 2006).

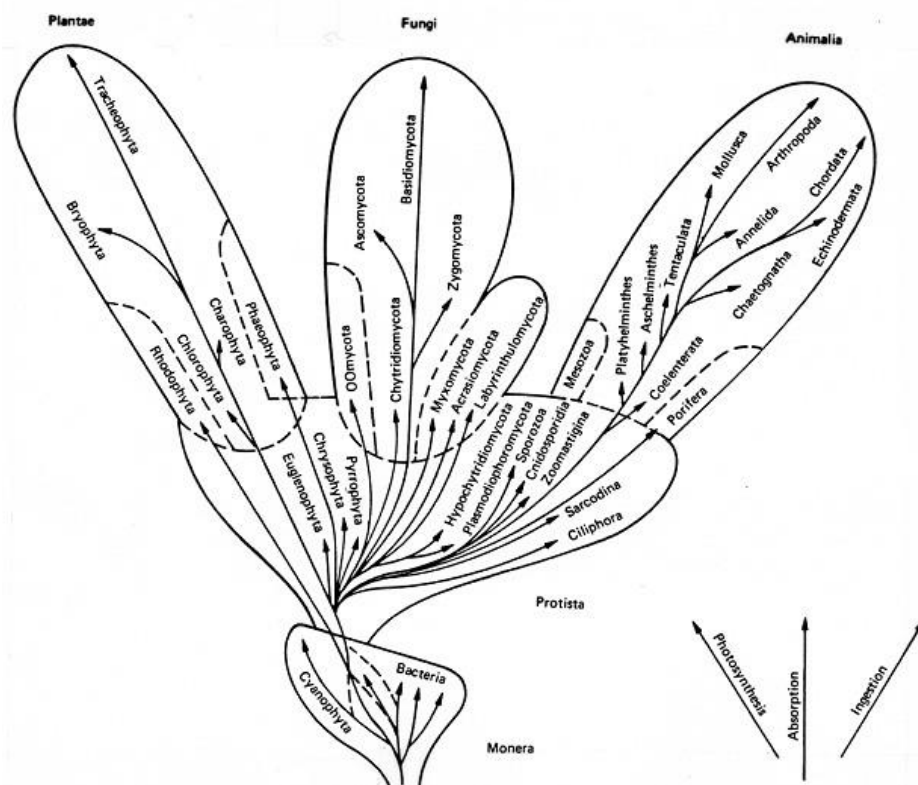
1.7.2.5 Άλλες μέθοδοι

Πολλοί ερευνητές θέλησαν να εκμεταλλευτούν τα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ιδιότητες απόβλητα και τις φαινόλες για τη παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων. Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη είναι δύο από τα αντιοξειδωτικά που ανακαλύφθηκαν στα απόβλητα και έτσι προτάθηκε ένας βιοαντιδραστήρας για τη παραγωγή εξαιρετικά καθαρών αντιοξειδωτικών για την χρήση τους στην φαρμακοβιομηχανία (Briante *et al.*, 2004).

Συμπερασματικά, οι περισσότερες από τις παραπάνω μεθόδους δεν έχουν βρει το κατάλληλο έδαφος για να αναπτυχθούν πέρα από εργαστηριακή ή πιλοτική κλίμακα, εξαιρουμένων όσων έχουν χαμηλό κόστος και ευχερή εφαρμογή.

2. Μύκητες

Σύμφωνα με τον Whittaker το 1969 οι Μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια έμβιων οργανισμών. Αποτελεί το δεύτερο σε μέγεθος πληθυσμού ομάδα οργανισμών ύστερα από αυτών των εντόμων και μόλις το 5% από το σύνολο τους είναι γνωστά στους επιστήμονες (Ζερβάκης, 2011).



Εικόνα 1. Σχήμα Whittaker ταξινόμησης των οργανισμών σε πέντε βασίλεια

Πηγή: <http://www1.umn.edu/ships/db/whittaker.htm>

Πρόκειται για ευκαρυωτικούς, ετερότροφους οργανισμούς δηλαδή δεν μπορούν να συνθέσουν οργανικές ουσίες για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών. Ανάλογα με τον τρόπο που προσλαμβάνουν την οργανική ουσία μπορεί να είναι είτε συμβιωτικοί είτε σαπροτροφικοί είτε βιοτροφικοί (παρασιτικοί). Επίσης, εμφανίζουν συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται κυρίως από β-γλυκάνες και χιτίνη ενώ οι περισσότεροι στερούνται οργανιδίων κίνησης. Τέλος, μπορούν να είναι τόσο μονοκύτταροι οργανισμοί όπως οι ζύμες και να αναπαράγονται με εκβλάστηση ή διαίρεση όσο και πολυκύτταροι και να αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς κυρίως με τη βοήθεια των σπορίων (Ζερβάκης, 2011).

2.1 Μορφολογία και βιολογία μυκήτων

Το κύριο σώμα ενός πολυκύτταρου μύκητα ονομάζεται θαλλός και αποτελείται από λεπτά σωληνοειδή νημάτια, τις υφές, οι οποίες διακλαδίζονται προς όλες τις κατευθύνσεις και σχηματίζουν μία χαρακτηριστική δομή, το μυκήλιο. Οι υφές αναπτύσσονται επάκρια, μπορεί να είναι πολυκύτταρες και να φέρουν εγκάρσια διαφράγματα ή αλλιώς σέπτα, τα οποία απαντώνται κυρίως στους Ασκομύκητες, και Βασιδιομύκητες. Αντίθετα, κοινοκυτικό ονομάζεται το μυκήλιο το οποίο δεν φέρει σέπτα ή σχηματίζεται μόνο στη βάση των αναπαραγωγικών οργάνων και συναντάται κυρίως στους Χυτριομύκητες και Ζυγομύκητες (Ζερβάκης, 2011).

Οι μύκητες χρησιμοποιούν διαφόρων ειδών πηγές άνθρακα για τη κάλυψη των αναγκών τους όπως γλυκόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη ενώ όπως αναφέρθηκε με βάση τις τροφικές τους απαιτήσεις διαχωρίζονται σε σαπροτροφικούς, παρασιτικούς και συμβιωτικούς. Σαπροτροφικοί ονομάζονται αυτοί που αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ύλη, παρασιτικοί όσοι αναπτύσσονται σε βάρος του ξενιστή τους, οι οποίοι μπορούν να επιφέρουν μέχρι και τον θάνατο του και συμβιωτικοί όσοι αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με άλλους οργανισμούς. Οι λειχήνες αποτελούν μια συμβιωτική σχέση ανάμεσα σε μύκητα και φύκη ή κυανοβακτήρια, ενώ μυκόρριζες ανάμεσα σε μύκητα και το ριζικό σύστημα φυτού (Ζερβάκης, 2011).

Οι μύκητες χαρακτηρίζονται ως αερόβιοι μικροοργανισμοί, εξαιρούνται κάποια είδη ζύμης που είναι προαιρετικά αναερόβια και είδη Χυτριομυκήτων που είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι. Οι ιδανικές θερμοκρασίες για την ανάπτυξη των περισσότερων ειδών κυμαίνεται από 25-30⁰ C ενώ προτιμούν ελαφρά όξινο pH. Εξάιρεση αποτελούν κάποια θερμόφιλα και ψυχρόφιλα είδη που απαιτούν ακραίες θερμοκρασίες. Το φως είναι συχνά απαραίτητο για το στάδιο της απελευθέρωσης των σπορίων και τον σχηματισμό εγγενών και αγενών καρποφοριών.

Οι μύκητες πολλαπλασιάζονται μέσω διαδικασιών εγγενούς ή/και αγενούς αναπαραγωγής. Η διαδικασία του εγγενούς πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει τα στάδια της πλασμογαμίας, καρυογαμίας και μείωσης, τα δε σπόρια που παράγονται φέρουν το όνομα της κατηγορίας των μυκήτων στην οποία ανήκουν, όπως βασιδιοσπόρια (για τους Βασιδιομύκητες), ασκοσπόρια (για τους Ασκομύκητες) κ.ο.κ.

2.2 Βασιδιομύκητες

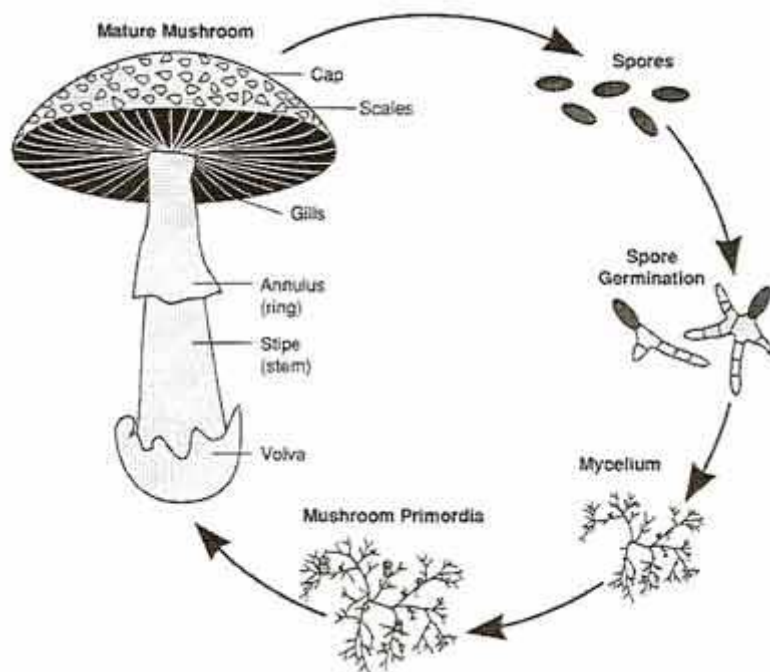
Οι βασιδιομύκητες και οι ασκομύκητες αποτελούν μεγάλο μέρος των καταγεγραμμένων μυκήτων, περίπου το 37%, και περιλαμβάνονται είδη που σχηματίζουν εδώδιμα μανιτάρια, αποτελούν παθογόνα φυτών και ζώων κ.α. (Deacon, 2006). Είδη από τις συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες αξιοποιούνται σε ένα πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών, όπως π.χ. για τη διατροφή του ανθρώπου, για την αποτοξικοποίηση αποβλήτων, τη λεύκανση χαρτιού, την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών κ.α. (Ζερβάκης, 2011). Εμφανίζουν μεγάλη ποικιλιότητα ως προς τη μορφή, τον τρόπο αναπαραγωγής και τα οικοσυστήματα όπου συνήθως απαντώνται.

2.2.1 Βιολογία

Το κύριο κοινό τους γνώρισμα είναι η αναπαραγωγική τους δομή, το βασίδιο (δηλ. το γαμετάγγειο), πάνω στο οποίο σχηματίζονται τα εγγενή τους σπόρια (βασιδιοσπόρια) σε ειδικές προεξοχές, τα στηρίγματα (Deacon, 2006). Επίσης, χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι τα δικάρυα μυκήλια που αποτελούνται από υφές με δύο πυρήνες διαφορετικού συζευκτικού τύπου (Deacon, 2006). Ακόμη, κατά το στάδιο της επάκρια αύξησης αυτού στους περισσότερους βασιδιομύκητες εμφανίζεται ένα χαρακτηριστικό εξόγκωμα των υφών, ο κρίκος (Ζερβάκης, 2011). Για την αποφυγή μετακίνησης των πυρήνων στα διάφορα μέρη των υφών, οι βασιδιομύκητες διαθέτουν δολίπορα εγκάρσια διαφράγματα. Το μυκήλιο συνήθως είναι λευκό, κίτρινο ή πορτοκαλί (Alexopoulos, 1996). Τέλος, τα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι η χιτίνη και οι γλυκάνες (Deacon, 2006).

Ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει το στάδιο της καρυογαμίας στο δικάρυο μυκήλιο, κατά το οποίο πραγματοποιείται η σύντηξη των πυρήνων, η μειωτική διαίρεση και η μεταφορά των πυρήνων στα βασιδιοσπόρια, τα οποία σχηματίζονται πάνω στο βασίδιο (Εικόνα 2). Το βασίδιο, όπως έχει αναφερθεί, αποτελεί ένα διαφοροποιημένο κύτταρο (γαμετάγγειο) που σχηματίζεται στο γόνιμο στρώμα της καρποφορίας. Τα βασιδιοσπόρια διασπείρονται με τη βοήθεια του ανέμου και όταν επικρατήσουν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες βλαστάνουν και παράγουν μονοκάρυες υφές. Κατόπιν, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της πλασμογαμίας, στο οποίο αντίθετου συζευκτικού τύπου υφές έρχονται σε επαφή, σχηματίζεται νέο μυκήλιο με δικάρυες υφές. Ο μύκητας μπορεί να αναπτύσσει ένα πολύπλοκο δίκτυο δικάρυων υφών για χρόνια έως

όπου βρεθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες και δοθεί το "σήμα" σχηματισμού των καρποφοριών (Ζερβάκης, 2011, Deacon, 2006).



Εικόνα 2. Απλουστευμένο σχήμα που απεικονίζει τον βιολογικό κύκλο βασιδιομυκήτα (κλάση Agaricomycetes) Πηγή: http://www.ont-woodlot-assoc.org/sw_mushrooms_2.html

2.2.2 Οικοφυσιολογία

Τα περισσότερα είδη βασιδιομυκήτων αποδομούν την κυτταρίνη, ημικυταρίνη και λιγνίνη και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του ξύλου. Συνήθως αναπτύσσονται πάνω σε ξυλώδη υποστρώματα, υλικά πλούσια σε οργανική ουσία και σε συστάδες φύλλων. Επίσης, αρκετά είδη αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις (μυκόρριζες) με ρίζες δασικών φυτών συνεισφέροντας σημαντικά στη μεταβίβαση θρεπτικών συστατικών σε αυτά. Τέλος, αρκετά καλλιεργούνται και σε εμπορική κλίμακα ως τρόφιμο ενώ άλλα παράγουν ισχυρές τοξίνες και είναι δηλητηριώδη (Deacon, 2006, Alexopoulos, 1996).

2.2.3 Βιοχημεία

Όπως αναφέρθηκε υπάρχουν και οι σαπροτροφικοί μύκητες ορισμένοι από τους οποίους είναι σημαντικοί αποικοδομητές του ξύλου. Διαχωρίζονται σε τρεις τύπους ανάλογα με τον τρόπο και το βιοχημικό σύστημα που αποικοδομούν το ξύλο. Πρόκειται για τους μύκητες που προκαλούν μαλακή, φαιά και λευκή σήψη. Οι μύκητες φαιάς σήψης αποσυνθέτουν κυρίως την ημικυτταρίνη και την κυτταρίνη του ξύλου και απαιτείται η

συνύπαρξή τους με μύκητες που διαθέτουν και άλλα ενζυμικά συστήματα για την πλήρη αποικοδόμηση του ξύλου. Επίσης, οι μύκητες μαλακής σήψης δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς σε αντίθεση με τους λευκής σήψης, οι οποίοι θεωρούνται πολύ καλοί αποικοδομητές της λιγνίνης και κατ'επέκταση των φαινολών λόγω παρόμοιας δομής τους (Deacon, 2006).

Οι μύκητες λευκής σήψης (White-rot fungi) πήραν την ονομασία τους από το λευκό χρώμα που παρουσιάζει το ξύλο κατά τη διαδικασία αποικοδόμησης-διάσπασης τους από τη συγκεκριμένη κατηγορία μικροοργανισμών. Απαρτίζονται κυρίως από βασιδιομύκητες και κατά δεύτερο λόγο από ασκομύκητες (ορισμένα γένη της οικογένειας *Xylariaceae*) (Deacon, 2006, Pointing, 2001). Αντίθετα, οι ασκομύκητες προκαλούν συνήθως μαλακή σήψη και μερικά μόνο είδη βασιδιομυκήτων την φαιά σήψη.

Η λιγνίνη ύστερα από τη κυτταρίνη αποτελεί την πιο διαδεδομένη ένωση στα κύτταρα του φυτού και συναντάται στα κυτταρικά του τοιχώματα. Πρόκειται για ένα άκαμπτο πολυμερές, χημικά πολύπλοκο, μη υδρολυόμενο μόριο εντός του οποίου έχει υπολογιστεί ότι δεσμεύεται το 15-20% του άνθρακα της βιόσφαιρας ετησίως. Είναι μία δύστροπη ένωση ως προς τον μεταβολισμό της και πιθανότατα αποδομείται κατά τη διάρκεια του δευτερογενούς μεταβολισμού (Deacon, 2006, Pointing, 2001).

Το ενζυμικό σύστημα που χρησιμοποιούν οι μύκητες για τη διάσπαση της λιγνίνης ονομάζεται λιγνινολυτικό και αποτελείται κυρίως από τρία εξωκυτταρικά οξειδωτικά ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση της. Τα ένζυμα που έχουν μέχρι στιγμής εντοπιστεί είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης ή λιγνινάση (LiP), η εξαρτημένη υπεροξειδάση από το μαγγάνιο (MnP) και η λακκάση (Lac), καθώς και η ανεξάρτητη του μαγγανίου υπεροξειδάση (MnIP) (Fan *et al.*, 2008, Pointing, 2001). Επίσης έχουν καταγραφεί και άλλα ένζυμα τα οποία διασπούν την λιγνίνη αλλά δεν μπορούν να την αποδομήσουν μόνα τους (Pointing, 2001). Τα λιγνινολυτικά ένζυμα δρούν κατά το στάδιο του δευτερογενούς μεταβολισμού υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου με εξαίρεση το *P. ostreatus* το οποίο αποδείχθηκε ότι η περίσσεια αζώτου ενισχύει την ενζυμική δραστηριότητα (Fan *et al.*, 2008).

Τέλος, η σημαντικότητα αυτών των μυκήτων έγκειται στη δυνατότητα τους να βιοαποδομούν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ρύπων. Τα υποστρώματα που έχουν κυρίως μελετηθεί είναι διάφορα φυτοφάρμακα, τα απόβλητα από τη διαδικασία λεύκανσης του χαρτιού και διάφορα άλλα βιομηχανικά και αγροβιομηχανικά απόβλητα. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν τα ΥΑΕ, για την αποικοδόμηση των οποίων έχουν γίνει πολλές

μελέτες που παρουσιάζουν μεταξύ άλλων τη μείωση του χρώματος, των φαινολικών και της φυτοτοξικότητας του αποβλήτου με χρήση στελέχων *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus* και *P. eryngii* (Kalmis *et al.*, 2008, Zervakis *et al.*, 1996, Tsioulpas *et al.* 2002, Ntougias *et al.* 2012).

2.3. Ένζυμα αποικοδόμησης λιγνίνης

2.3.1 Λιγνινάσες

Ο μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* ήταν από τους πρώτους που εξετάστηκαν για τη παρουσία υπεροξειδάσης της λιγνίνης (Hattaka, 1994). Η παρουσία της έχει διαπιστωθεί και σε άλλους μύκητες όπως οι *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor*, και *Bjerkandera adusta*, ενώ δεν ανιχνεύτηκε σε άλλα είδη όπως οι *Fomes lignosus* (= *Rigidoporus microporus*) και *Trametes cingulata* (Kirk and Farrell, 1987).

Οι λιγνινάσες, εκτός από τις πολυφαινόλες που θεωρούνται συνήθη υποστρώματα δράσης, μπορούν και οξειδώνουν και άλλες μη φαινολικές δομές λιγνίνης και αρωματικών αιθέρων που μοιάζουν με τη βασική μονάδα. Οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και προσλαμβάνοντας δύο ηλεκτρόνια επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση (Kirk and Farrell, 1987).

2.3.2 Υπεροξειδάσες Μαγγανίου

Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου είναι το δεύτερο ένζυμο που ανιχνεύθηκε στον μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*. Φαίνεται ότι λειτουργούν ως οξειδωτικά ένζυμα των φαινολών και παράλληλα συμμετέχουν και στη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Kirk and Farrell, 1987). Η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί και σε άλλους μύκητες όπως οι *Phlebia radiata*, *Coriolus* (= *Trametes*) *versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes gibbosa*, *Panus tigrinus* ενώ δε παρατηρήθηκαν σε άλλα είδη όπως το *Bjerkandera adusta* (Hattaka, 1994).

2.3.3 Λακκάσες

Οι λακκάσες είναι το μόνο ένζυμο που δεν ανιχνεύτηκε στο είδος *Phanerochaete chrysosporium*. Όλοι οι μύκητες λευκής σήψης παράγουν ένζυμα που οξειδώνουν φαινόλες και απαιτείται μόνο μια χρωματική δοκιμή για να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για λακκάση ή κάποια υπεροξειδάση (Kirk and Farrell, 1987). Πρόκειται για μία οξειδάση του χαλκού, η οποία οξειδώνει τις φαινόλες προς φαινοξυλικές ρίζες.

2.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές επιλεγμένων βασιδιομυκήτων

Οι βασιδιομύκητες είναι όπως αναφέρθηκε λόγω του λιγνινολυτικού τους συστήματος ικανοί να αποδομήσουν δύσκολους ρυπαντές. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί από πολλούς μελετητές για την αποδόμηση αποβλήτων από γεωργικές βιομηχανίες. Επίσης, λόγω της αυξανόμενης ζήτησης εδώδιμων μανιταριών από το καταναλωτικό κοινό και της υψηλής παραγωγής υπολειμμάτων από την γεωργία, οι μελέτες στράφηκαν προς τη καλλιέργεια των μανιταριών σε υποστρώματα με ελαιουργικά και άλλα γεωργικά υπολείμματα

2.4.1 Αποτοξικοποίηση αποβλήτων γεωργικών βιομηχανιών

Οι μύκητες λευκής σήψης είναι φυσικοί αποικοδομητές της οργανικής ύλης λόγω της έκλυσης ενζύμων για την διάσπαση πολύπλοκων μορίων (όπως είναι οι φαινόλες) σε απλούστερη μορφή. Αυτή η αξιοσημείωτη ιδιότητα τους μελετήθηκε με στόχο την αποτοξικοποίηση αποβλήτων από τις γεωργικές βιομηχανίες.

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί -μεταξύ άλλων- προς την αποτοξικοποίηση των αποβλήτων των γεωργικών βιομηχανιών όπως είναι ο πολτός και ο φλοιός του καφέ, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου και το διφασικό απόβλητο. Έξι διαφορετικά στελέχη του γένους *Pleurotus* (από τα είδη *P. djamor*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*) μελετήθηκαν σε πολτό καφέ και άχυρο σιταριού, όπου αποικοδόμησαν τους περιεχόμενους πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) στο στάδιο της καρποφορίας του. Παράλληλα συνέβαλλαν στη μείωση των φαινολικών ενώσεων τις πρώτες οχτώ ημέρες επώασης και μείωσαν τη περιεκτικότητα σε καφεΐνη (Salmones *et al.*, 2005).

Με στελέχη ειδών *Pleurotus* είχαν γίνει προσπάθειες να αποτοξικοποιήσουν και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, όπου αποδείχθηκε ότι μείωναν πάλι τις φαινολικές ενώσεις. Αρχικά ο Zervakis κ.α. (1996) μελέτησε τα δύο είδη *Pleurotus pulmonarius* και *P. eryngii* όπου εκτός ότι και τα δύο μείωσαν τα ολικά φαινολικά, αποχρωμάτισαν και το απόβλητο. Επίσης, μείωση των φαινολικών και της φυτοτοξικότητας εμφάνισαν οι μύκητες *Coriolus* (=Trametes) *versicolor*, *Funaria* (=Trametes) *trogii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* (=pulmonarius), *Lentinus tigrinus* που μελετήθηκαν από τους Yesilada κ.α. (1999) σε ελαιουργικά απόβλητα ενώ παρατηρήθηκε ακόμη υψηλή παραγωγή λακκάσης όπου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για βιοτεχνολογικές χρήσεις. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και άλλες εργασίες με χρήση ειδών *Pleurotus*, και *Ganoderma* όπου παρατηρήθηκε μείωση των φαινολικών της τάξεως

του 69-76% με παράλληλη μείωση του χρώματος και της φυτοτοξικότητας του υγρού αποβλήτου ελαιοτριβείου. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι η μείωση της φυτοτοξικότητας δεν ήταν ανάλογη της μείωσης των φαινολικών ενώσεων (Tsioulpas, 2002, Ntougias *et al.* 2012). Επίσης, με τη χρήση του μύκητα λευκής σήψης *Coriolopsis rigida* επιτεύχθηκε η υψηλότερη αποδόμηση λιγνίνης, φαινολικών και μείωση της φυτοτοξικότητας ανάμεσα στους *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Poria subvermispora* και *Pleurotus pulmonarius* (Sampedro *et al.*, 2007). Επιπλέον, ο βασιδιομυκήτας *Lentinula edodes* φάνηκε να παρουσιάζει μέγιστη μείωση κατά 75% στις φαινολικές ενώσεις και 65% στη φυτοτοξικότητα (Lakhtar, 2010). Τέλος, με στόχο την αποτοξικοποίηση του παραγόμενου ελαιοπυρήνα και την αύξηση της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη, αξιολογήθηκαν στελέχη των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *P. pulmonarius* σε συνδυασμό με διάφορες ζωοτροφές. Αποτέλεσμα αυτής ήταν η αύξηση των πρωτεϊνών και η μείωση των φαινολικών ενώσεων (Brozzoli *et al.*, 2010).

Οι παραπάνω μελέτες οδήγησαν σε περαιτέρω έρευνες για την χρήση και των υπολοίπων παραπροϊόντων της γεωργίας με στόχο τη παραγωγή είτε εδώδιμων μανιταριών είτε ζωοτροφής.

2.4.2 Αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων για την παραγωγή μανιταριών

Σε όλες τις χώρες του κόσμου και κυρίως σε αυτές όπου ο πρωτογενής τομέας αποτελεί το μεγαλύτερο άξονα της οικονομίας τους, έχουν να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της διάθεσης όλων των παραπροϊόντων της γεωργίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των υποπροϊόντων αυτών αποτελεί το άχυρο σιταριού γενικότερα αλλά σε χώρες της Μεσογείου εξίσου σημαντικό πρόβλημα αποτελούν και τα υπολείμματα της καλλιέργειας της ελιάς. Ακόμη η διάθεση των στερεών αποβλήτων από τις διάφορες βιομηχανίες επεξεργασίας γεωργικών προϊόντων λόγω των ιδιαίτερων χημικών χαρακτηριστικών τους είναι εξίσου σημαντικό πρόβλημα. Η ιδιότητα των μυκήτων λευκής σήψης να μπορούν να αποδομούν την λιγνίνη άρα και τα λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα, αξιοποιήθηκε από τους ερευνητές για τη χρήση των υπολειμμάτων αυτών στην εμπορική καλλιέργεια των μανιταριών.

Για την εμπορική καλλιέργεια των μανιταριών γίνεται χρήση μη ζυμωμένων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών. Συνήθως ως υπόστρωμα καλλιέργειας είναι το άχυρο σιταριού για το *Pleurotus spp.* και το πριονίδι για το *Ganoderma spp.* ενώ πάντα προστίθεται ένα ποσοστό γύψου για την ρύθμιση του pH και πίτουρου για την ρύθμιση του λόγου C/N (Stamets, 2000). Αρχικά, μία μελέτη πραγματοποιήθηκε με στερεά υποστρώματα που

αποτελούνταν από πολτό και φλοιό καφέ, πάνω στα οποία καλλιεργήθηκαν τα *Pleurotus ostreatus* και *P. sajor-caju* όπου μείωσαν την περιεκτικότητα σε καφεΐνη και τανίνες. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η καφεΐνη είχε προσροφηθεί από τα δύο είδη μυκήτων αντίθετα από τις ταννίνες που είχαν αποικοδομηθεί πλήρως (Fan *et al.*, 2000). Μελετήθηκε επίσης η ανάπτυξη μανιταριών από στελέχη των *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Agrocybe aegerita* (= *cyllindracea*), *Volvariella volvacea* σε απόβλητα βαμβακιού, άχυρο σιταριού και κελύφη φυσιτικών όπου αποδείχθηκε ότι τα απόβλητα βαμβακιού είναι ένα καλό μέσο ανάπτυξης για τα στελέχη ειδών *Pleurotus* (Philippoussis, 2001). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η διαβροχή αχύρου σιταριού με αραιωμένο κατά 25% κατσίγαρο με νερό βρύσης δεν επηρεάζει την συνολική παραγωγή του *P. ostreatus* ενώ των *Pleurotus sajor-caju* και *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus* είναι ικανοποιητική και στην αραιώση 50% (Kalmis and Sargin, 2004, Kalmis *et al.*, 2008). Επίσης, σύμφωνα με έρευνα το *P. sajor-caju* αναπτύσσεται καλύτερα σε υπολείμματα βαμβακιού, μίσχους μπιζελιού και άχυρο σιταριού μόνα τους ή σε συνδυασμό, σε σχέση με μύκητες που εξετάστηκαν, καθώς επίσης και ότι η προσθήκη πίτουρου ή άλλων οργανικών συμπληρωμάτων αυξάνει την απόδοση (Mane *et al.*, 2007). Η επιρροή της προσθήκης διφασικού αποβλήτου στη καλλιέργεια στελεχών των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *P. pulmonarius* απέδειξε ότι είναι δυνατή η μείωση των φαινολικών ουσιών του αποβλήτου ενώ δεν επηρεάζεται η παραγωγή όταν η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε απόβλητο είναι μέχρι 50% (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2010).

Επιπλέον, έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιοποίηση γεωργικών υπολειμμάτων με τη χρήση του φαρμακευτικού μανιταριού *Ganoderma lucidum*. Αρχικά μελέτη απέδειξε ότι η ανάπτυξη του *Ganoderma lucidum* στο σύστημα του συνθετικού κορμού απέδωσε ικανοποιητική παραγωγή με την προσθήκη κελύφων από σπόρο ηλίανθου ενώ ακόμη υψηλότερη εάν προστεθεί 5% βύνη (Gonzalez-Matute, 2002). Ο λόγος C/N φάνηκε να είναι καθοριστικός για την ανάπτυξη του μυκηλίου και της καρποφορίας του *Ganoderma lucidum* όταν αναπτύχθηκε σε υπολείμματα σόγιας. Επίσης, αποδείχθηκε ότι η περιεκτικότητα των πολυσακχαριτών, του κύριου συστατικού του που οφείλονται οι φαρμακευτικές του ιδιότητες, επηρεάζεται από το υπόστρωμα καλλιέργειας (Hsieh, 2004). Τέλος, υψηλή βιολογική απόδοση παρατηρήθηκε σε δύο στελέχη του είδους σε καλλιεργητικό υπόστρωμα με πριονίδι και 20-25% απόβλητα τσαγιού (Peksen and Yakupoglu, 2009).

Οι μύκητες λευκής σήψης φαίνεται ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα γεωργικά υπολείμματα και να δώσουν μία ικανοποιητική παραγωγή, χωρίς να αλλοιώνεται η ποιότητα των παραγόμενων μανιταριών.

2.5 *Pleurotus* spp.

Τα *Pleurotus* ανήκουν ταξινομικά στο φύλο Βασιδιομύκητες, ενώ φυσιολογικά-λειτουργικά στο τεχνητό άθροισμα των μυκήτων "λευκής σήψης". Τα τελευταία χρόνια έγιναν ευρέως γνωστά λόγω της εντατικοποίησης της εμπορικής τους καλλιέργειας ως εδώδιμα αλλά και της χρήσης τους σε ένα μεγάλο εύρος βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Ζερβάκης, 2011). Το όνομα τους προκύπτει από την ελληνική λέξη "πλευρωτός" (δηλ. "πλευρικό ους", πλευρικό αυτί) λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος και του τρόπου που αναπτύσσεται η καρποφορία τους πάνω στα φυσικά ξυλώδη υποστρώματα. Τα είδη που κυρίως καλλιεργούνται είναι τα *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae* και *P. djamor* (Ζερβάκης, 2010). Το *Pleurotus ostreatus* είναι στο ευρύ κοινό γνωστό ως "Oyster-mushroom" λόγω του σχήματος του πύλου σε σχήμα όστρακου (Alexopoulos, 1996). Ταξινομούνται ως εξής:

Κλάση: Agaricomycetes

Τάξη: Agaricales

Οικογένεια: Pleurotaceae

Γένος: *Pleurotus*



Εικόνα 3. Καρποφορία του *Pleurotus ostreatus* σε πειραματική κλίμακα

2.5.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το χρώμα του μυκηλίου του είδους κυμαίνεται από λευκό έως καστανό, εμφανίζει ρυθμική ανάπτυξη σε ομόκεντρους κύκλους και είναι συνήθως δικάρυο. Το εναρκτήριο σήμα για το σχηματισμό των καταβολών καρποφορίας δεν σχετίζεται πάντα με το ερέθισμα της χαμηλής θερμοκρασίας (Zervakis and Balis, 1996b).

Η καρποφορία τους χαρακτηρίζεται από ένα έκκεντρο στύπο, ο οποίος διαφέρει ανά στέλεχος όσον αφορά στο μήκος του, ενώ μπορεί μέχρι και να απουσιάζει. Δεν σχηματίζεται δακτύλιος και κολεός και το μέγεθός διαφοροποιείται ανά είδος και επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες (Εικόνα 3) (Rajarithnam *et al.*, 1987). Ο πύλος τους μπορεί να είναι μεμβρανώδης ή σαρκώδης και το μέγεθος να κυμαίνεται από 2-20 cm (Zervakis and Balis, 1996b). Περαιτέρω, το χρώμα του ποικίλει από λευκό έως σκούρο γκρι και φαίνεται ότι επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες (Rajarithnam *et al.*, 1987). Η εξωτερική πλευρά του πύλου είναι λεία ενώ η εσωτερική καλύπτεται από ακτινωτά διατεταγμένα ελάσματα λευκού χρώματος. Τα βασιδιοσπόρια έχουν κυλινδρικό ή ελλειψοειδές σχήμα με λεπτά και λεία τοιχώματα (Zervakis and Balis, 1996b).

Τα μανιτάρια *P. ostreatus* έχουν μέγεθος από 2-15 cm, είναι σαρκώδη και έχουν λευκή έως κρεμ, ελαστική σάρκα. Ο στύπος είναι μικρός και πλευρικός, έχει ουδέτερη οσμή και ήπια ευχάριστη γεύση (Rajarithnam *et al.*, 1987).

2.5.2 Διατροφική αξία- Φαρμακευτικές ιδιότητες

Τα μανιτάρια θεωρούνται τροφή με ιδιαίτερη διατροφική αξία γιατί είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ίνες, βιταμίνες και μέταλλα ενώ παράλληλα έχουν χαμηλή συγκέντρωση σε νάτριο, χοληστερόλη, κορεσμένα λίπη, όπως και μικρή θερμιδική αξία (Kues and Liu, 2000). Ακόμη είναι πλούσια πηγή βιταμινών B, C, D, αλλά και σιδήρου, ψευδαργύρου, φωσφόρου, καλίου, χαλκού, μαγνησίου και σεληνίου. Γενικά, οι καρποφορίες των βασιδιομυκήτων αποτελούνται από περίπου 39,9% υδατάνθρακες, 17,5% πρωτεΐνη, 2,9% λίπη επί του ξηρού βάρους, με το υπόλοιπο ποσοστό να αντιστοιχεί σε μέταλλα (Mendil *et al.*, 2004). Θα πρέπει να επισημανθεί πως η περιεκτικότητά τους σε διάφορα συστατικά επηρεάζεται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το στάδιο ωριμότητάς τους αλλά και από το υπόστρωμα ανάπτυξης.

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό στα *Pleurotus*, η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται από 46,6% σε 81,8% του ξηρού βάρους και απαρτίζονται κυρίως από εξόζες και πεντόζες. Στο στύπο συγκεκριμένα υπάρχει υψηλότερη συγκέντρωση μανόζης

και γλυκόζης, ενώ η συγκέντρωση τηςμανιτόλης είναι μεγαλύτερη από τη γλυκικόλη στη περίπτωση του *P. ostreatus* όπου συνολικά προσεγγίζει το 81,8%. Η περιεκτικότητα ειδών *Pleurotus* σε πρωτεΐνες κυμαίνεται από 8,9% έως 38,7% ενώ στο είδος *P. ostreatus* είναι σχετικά χαμηλή 10,5% (Bano and Rajarathnam, 1988).

Οι λιπαρές ύλες τωνμανιταριών περιλαμβάνουν όλες τις αντιπροσωπευτικές ομάδες λιπαρών συστατικών που απαντώνται στα τρόφιμα, όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο-, δι- και τριγλυκερίδια, στερόλες, εστέρες των στερολών και φωσφολιπίδια. Μεταξύ των στερολών, εμφανίζονται υψηλά ποσοστά περιεχόμενης εργοστερόλης, η οποία θεωρείται πρόδρομος της βιταμίνης D₂ (Mattila *et al.*, 2002). Τα λιπαρά που έχουν μέχρι στιγμής προσδιορίζεται στο *P. ostreatus* αντιστοιχούν στο 1,6% του ξηρού βάρους τους (Bano and Rajarathnam, 1988). Τέλος, τα οξείδια καλίου (K) αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ανόργανων στοιχείων στα άγριαμανιτάρια και κυμαίνεται από 20-40gr/kg ξηρού βάρους (Kalac, 2009).

Ιδιαίτερη σημασία έχουν αποκτήσει τα τελευταία χρόνια οι φαρμακευτικές ιδιότητες των βασιδιομυκήτων που σχηματίζουνμανιτάρια. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη *Pleurotus* εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες, λόγω των πολυσακχαρίτων τους και ειδικότερα των α-γλυκανών (Tong *et al.*, 2009). Επιπροσθέτως έχει αποδειχθεί η εμφάνιση ανοσορρυθμιστικών, αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων, προστατεύει από καρδιαγγειακά νοσήματα και βοηθά στη πτώση της αρτηριακής πίεσης (Gregori *et al.*, 2007). Τέλος, οι έρευνες έχουν επεκταθεί στην αναζήτηση πιθανής πρεβιοτικής δράσης λόγω της συγκέντρωσης β-γλυκανών στα κυτταρικά τους τοιχώματα των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *P. eryngii* (Synytsya *et al.*, 2009).

2.6 *Ganoderma* spp.

Το γένος *Ganoderma* περιλαμβάνει διάφορα είδη, με πιο γνωστό το Reishi (*Ganoderma lucidum*) που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική για την θεραπεία διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών (Peksen and Yakupoglu, 2009). Ανήκουν στους βασιδιομύκητες και στους μύκητες λευκής σήψης αλλά δεν καταναλώνονται ακατέργαστα διότι τομανιτάρι τους είναι πολύ σκληρό με φελλώδη υφή. Παρόλα αυτά αρκετά σκευάσματα είναι διαθέσιμα στην αγορά που είτε περιέχουν σπόρους είτε αποξηραμένες καρποφορίες για ροφήματα. Η ταξινόμηση τους είναι η ακόλουθη:

Κλάση: Agaricomycetes

Τάξη: Polyporales

Οικογένεια: Ganodermataceae

Γένος: *Ganoderma*



Εικόνα 4. Καρποφορία του *Ganoderma lucidum* σε πειραματική κλίμακα

2.6.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το μυκήλιο στις αποικίες που σχηματίζουν είδη του γένους αναπτύσσεται σε ακτινωτή διάταξη, αρχικά είναι λευκού χρώματος και ύστερα κιτρινίζει. Η κατάλληλη θερμοκρασία επώασης είναι 24⁰ C (Stamets, 2000).

Οι καρποφορίες που σχηματίζουν είδη του γένους εμφανίζουν ποικίλα μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία διαφοροποιούνται αναλόγως του είδους και τις κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του βασιδιώματος. Το χρώμα του πύλου μπορεί να είναι βαθύ κόκκινο έως ανοιχτό κίτρινο.

Το *Ganoderma lucidum* παρουσιάζει ποικίλους τρόπους σύνδεσης του πύλου με τον στύπο, οι οποίες μπορεί να είναι πλευρική ή κεντρική ή μπορεί να μην εμφανίζεται καθόλου στύπος. Το μέγεθος του στύπου κυμαίνεται από 0-10 cm και πάχος 0,5-5 cm και έχει λευκό-καφέ χρώμα (Εικόνα 4). Η περιφέρεια του πύλου, μεγέθους 2-30 cm, μπορεί να είναι λεία, τραχιά, ή κυματοειδής και η επιφάνεια χαρακτηρίζεται ως λεία, κυματοειδής-όμως συνήθως εμφανίζει ομόκεντρες ζώνες οι οποίες μπορεί να είναι από τρεις ή να καταλαμβάνουν όλον τον πύλο (Flood, et al., 2000). Οι αρχικές αποχρώσεις του είναι λευκές-κίτρινες αλλά όσο πλησιάζει το στάδιο της ωριμότητας γίνεται κόκκινο προς καφέ σκούρο (Stamets, 2000).

2.6.2 Διατροφική αξία- Φαρμακευτικές ιδιότητες

Παρόλο που το *Ganoderma lucidum* δεν μπορεί να καταναλωθεί ωμό λόγω της υφής του, οπότε συνήθως γίνεται ρόφημα ή σκόνη, η περιεκτικότητα των καρποφοριών του σε ολικές πρωτεΐνες, λιπαρά, ινώδεις ουσίες και τέφρα όταν καλλιεργηθούν σε πριονίδι είναι 4,20%, 0,18% και 1,61% σε ολικές πρωτεΐνες, ολικά λιπαρά, τέφρα αντίστοιχα (Hsieh and Yang 2004).

Αντίθετα, η φαρμακευτική τους αξία είναι ευρέως γνωστή από τη Κινέζικη παραδοσιακή ιατρική για την αντιμετώπιση της ηπατοπάθειας, χρόνιας ηπατίτιδας, νεφρίτιδας, γαστρικού έλκους, υπέρτασης, αρθρίτιδας, νευρασθενιών, βρογχίτιδας, άσθματος κλπ. (Miyzaaki and Nishijima, 1981). Τα τελευταία χρόνια γίνεται εκτεταμένη έρευνα για τα ενεργά συστατικά που συνεισφέρουν σε αυτό. Εμφανίζουν αντικαρκινικές, ανοσορρυθμιστικές, αντιηπατοτοξικές, καρδιαγγειακές ιδιότητες, ενώ επηρεάζουν θετικά ακόμα και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Το τελευταίο καιρό τονίζονται οι δυνατότητές τους στην καταπολέμηση ιών και κυρίως κατά του HIV. Τα κύρια συστατικά που αποδίδουν στα καρποσώματα αυτές τις ιδιότητες είναι η περιεκτικότητά τους σε τριτερπενοειδή και πολυσακχαρίτες (Boh *et al.*, 2007). Τέλος, έρευνες πραγματοποιούνται το τελευταίο καιρό για τη πιθανή πρεβιοτική δράση που μπορεί να παρουσιάζουν τα μανιτάρια του είδους λόγω των β-γλυκανών που περιέχουν (Mohd Hamim *et al.*, 2010, Yamin *et al.*, 2012).

2.7 Πρεβιοτική δράση

Μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζεται τα τελευταία χρόνια για την παρασκευή λειτουργικών συστατικών τροφίμων και κυρίως αυτά που θεωρούνται πρεβιοτικά. Είναι ευρέως γνωστό ότι αυτά επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου με κατ' επέκταση την θετική τους επιρροή στην υγεία του ανθρώπου.

Πρεβιοτικά αρχικά ονομάστηκαν “τα μη- αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων, τα οποία επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή με επιλεκτική προαγωγή της ανάπτυξης και/ή της δραστηριότητας ενός ή περισσότερων στελεχών βακτηρίων του παχέος εντέρου που θεωρείται ότι προάγουν την υγεία του ξενιστή” (Gibson *et al.*, 1995). Εξαιτίας όμως της μονομερούς εξέτασης των πρεβιοτικών μέσω της μικροβιακής αλλαγής στο οικοσύστημα του παχέος εντέρου του ανθρώπου, προτάθηκε η επέκταση του ορισμού και σε άλλους τομείς. Ως εκ τούτου “πρεβιοτικό είναι ένα επιλεκτικά ζυμώσιμο συστατικό που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές, τόσο στη σύνθεση όσο και/ή στη δραστηριότητα της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας, που προσδίδουν ευημερία και υγεία στον ξενιστή” (Gibson *et al.*, 2004).

Η σημαντικότητα των πρεβιοτικών έγκειται στη πεποίθηση ότι μία ισορροπημένη εντερική μικροχλωρίδα είναι θετική ενώ παράλληλα μπορεί να τροποποιηθεί θετικά η σύνθεση της από αυτά. Ακόμη, λόγω της δύσκολης μεταχείρισης των προβιοτικών οργανισμών σε ορισμένα τρόφιμα, τα οποία έχουν θετική επίδραση στην πρόληψη της διάρροιας και της ανοσορύθμισης, ενδείκνυνται η χρήση των πρεβιοτικών ως εναλλακτική λύση. Τέλος, η ινουλίνη, τα παράγωγα της και οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, που είναι τα πλέον διαδεδομένα πρεβιοτικά παρουσιάζουν χαμηλό κόστος (Macfarlane *et al.*, 2006).

Για να θεωρηθούν κάποια συστατικά ότι παρέχουν πρεβιοτική δράση θα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια τα οποία επισημάνθηκαν από τον Wang (2009). Τα βασικότερα είναι η αντοχή τους στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση με ένζυμα θηλαστικών και την γαστρεντερική απορρόφηση. Οι λόγοι που οδήγησαν στα κριτήρια αυτά είναι διότι θα πρέπει τα συστατικά να μπορούν να καταλήξουν σε όλο το τμήμα του παχέος εντέρου αναλλοίωτα, όπου εκεί θα βοηθήσουν τα ευεργετικά για τον ξενιστή γένη βακτηρίων *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Aida *et al.*, 2009, Gibson *et al.*, 2006, Roberfroid, 2007). Επίσης, απαραίτητο κριτήριο είναι να μπορούν τα δυνητικά πρεβιοτικά συστατικά να ζυμωθούν από τα ευεργετικά βακτήρια του εντέρου (Gibson *et al.*, 2004, Wang, 2009). Η ζύμωση συνεισφέρει στην υγεία του ξενιστή μέσω της αύξησης ή την αλλαγή στη σύνθεση των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, την αύξηση του βάρους των κοπράνων, μείωση των αζωτούχων τελικών προϊόντων κ.α. (Aida *et al.*, 2009). Εξορισμού η πρεβιοτική δράση επάγει επιλεκτικά την ανάπτυξη και την δραστηριότητα των προβιοτικών μικροοργανισμών, δηλαδή των μπιφιδοβακτηρίων και των λακτοβακτίλλων, ενώ παράλληλα καταστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων των γενών *Clostridium* και *Bacteroides*. Έτσι δημιουργήθηκε ο πρεβιοτικός δείκτης (PI) όπου όταν είναι θετικός αυξάνεται ο πληθυσμός των προβιοτικών ενώ αρνητικός όταν υπερτερούν τα *Clostridia* ή τα *Bacteroides* (Aida *et al.*, 2009).

$$PI = \frac{Bif}{ολικά} - \frac{Bac}{ολικά} + \frac{Lac}{ολικά} - \frac{Clos}{ολικά}$$

Όπου,

Bif: αριθμός μπιφιδοβακτηρίων κατά τη στιγμή του δείγματος/ αριθμός κατά τον εμβολιασμό

Bac: αριθμός *Bacteroides* κατά τη στιγμή του δείγματος/ αριθμός κατά τον εμβολιασμό

Lac: αριθμός λακτοβακίλλων κατά τη στιγμή του δείγματος/ αριθμός κατά τον εμβολιασμό

Clos: αριθμός κλωστριδίων κατά τη στιγμή του δείγματος/ αριθμός κατά τον εμβολιασμό

Total: συνολικός αριθμός βακτηρίων κατά τη στιγμή του δείγματος/ αριθμός κατά τον εμβολιασμό

Όλοι οι μη εύπεπτοι ολιγοσακχαρίτες αποτελούν δυνητικά πρεβιοτικά, οι οποίοι απαντώνται κυρίως στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα διότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην υδρόλυση των ανθρώπινων ενζύμων. Τέτοιες ενώσεις είναι η ινουλίνη, οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, οι ξυλο-ολιγοσακχαρίτες κ.α. Η πιο διαδεδομένη και αποδεδειγμένη ένωση είναι η ινουλίνη, η οποία είναι μια φυσικώς απαντώμενη β-φρουκτάνη. Τέλος, επίσης σημαντικό κριτήριο για τα πρεβιοτικά συστατικά είναι η σταθερότητα τους στη διαδικασία παρασκευής του τροφίμου.

2.7.1 Ινουλίνη

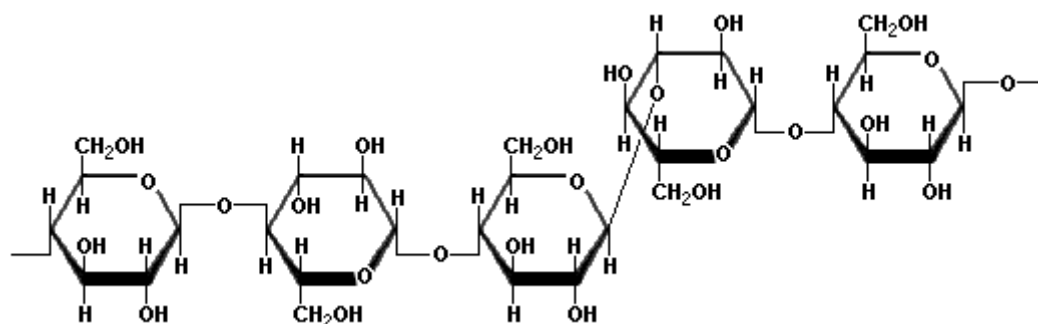
Η ινουλίνη είναι ένα από τα δύο πρεβιοτικά που πληρούν όλα τα κριτήρια που έχουν προαναφερθεί και χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων. Πρόκειται για ένα μόριο με γραμμική αλυσίδα και με παράγωγα φρουκτόζης συνδεδεμένα με β- (2→1) γλυκοσιδικούς δεσμούς, το οποίο ανήκει στις β-φρουκτάνες. Εξάγεται από ρίζα κιχώριου με την βοήθεια ζεστού νερού (Aida *et al.*, 2009). Πρακτικά η ινουλίνη αποτελεί έναν γενικό όρο ο οποίος περιλαμβάνει όλα τα γραμμικά μόρια τα οποία εμφανίζουν β- (2→1) δεσμούς. Συνώνυμα της είναι οι όροι ολιγοφρουκτόζη και φρουκτοολισακχαρίτες, τα οποία αποτελούν μείγμα μικρών ολιγομερών ινουλίνης (Roberfroid, 2007).

Οι λόγοι που οδήγησαν στην ταξινόμηση της ινουλίνης ως πρεβιοτικό είναι ότι τόσο οι *in-vitro* όσο και οι *in-vivo* μελέτες οι οποίες απέδειξαν την επιλεκτική της δράση στους προβιοτικούς μικροοργανισμούς. Ακόμη, λόγω ότι είναι ένας μη αφομοιώσιμος ολιγοσακχαρίτης, παρουσιάζει αντοχή στη γαστρική οξύτητα, στη υδρόλυση με ένζυμα θηλαστικών και στη γαστρεντερική απορρόφηση. Γενικότερα πληροί όλα τα κριτήρια που έχουν τεθεί για την ταξινόμηση της στις πρεβιοτικές ενώσεις (Roberfroid, 2007). Αντίθετα, πολλοί άλλοι πολυσακχαρίτες έχουν απομονωθεί από φυτικούς ιστούς και είναι πιθανά πρεβιοτικά όπως οι β-γλυκάνες, οι οποίες μπορεί να προέρχονται είτε από μανιτάρια είτε από δημητριακά.

2.7.2 β-γλυκάνες

Οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες που έχουν ως μονή μονομερή μονάδα τη γλυκόζη και έχουν γενικό τύπο $(C_6H_{12}O_5)_n$. Οι β-γλυκάνες προέρχονται από αυτές μέσω συμπύκνωσης οποιασδήποτε υδροξυλικής ομάδας ή ατόμου άνθρακα και αποτελούνται κυρίως από μόρια D- γλυκόζης. Παρόλο όμως των πολλών πιθανών συνδυασμών μόνο ένα περιορισμένος αριθμός γλυκανών συναντάται στη φύση (Rop *et al.*, 2009).

Οι β-γλυκάνες ή αλλιώς β-1,3 –D- γλυκάνες ή β-1,4 –D- γλυκάνες αποτελούν δομικό στοιχείο των κυτταρικών τοιχωμάτων ανώτερων φυτών, σπόρων αλλά και ανώτερων μυκήτων και ζυμών. Παρουσιάζουν μεγάλο εύρος μοριακού βάρους και διαλυτότητας στο νερό (Rop *et al.*, 2009). Όπως αναφέρθηκε οι γλυκάνες μπορεί να προέρχονται είτε από ανώτερα φυτά είτε από μύκητες αλλά η μορφή τους διαφέρει. Οι β-γλυκάνες προερχόμενες από βρώμη και σιτάρι διαθέτουν μη διακλαδισμένους β (1-3) και β (1-4) δεσμούς ενώ εκείνες που προέρχονται από μύκητες έχουν αντίστοιχα β (1-3) συνδεδεμένες μονάδες γλυκοπυρανοζυλίου με πλευρικές αλυσίδες β (1-6) (Volman *et al.*, 2009). Ωστόσο, ορισμένες ως κύριο δομικό στοιχείο της πλευρικής τους αλυσίδας περιέχουν αραβινόζη, μαννόζη, φουκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, γλυκόζη και γλυκουρονικό οξύ (Aida *et al.*, 2009). Η βιολογική δραστηριότητα των ενώσεων αυτών είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις δομικές τους ιδιότητες, όπως οι διακλαδώσεις, η τριτοταγής δομή και το μοριακό βάρος (Reverberi *et al.*, 2004). Οι β-γλυκάνες των μανιταριών, οι οποίες αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυσακχαριτών τους μαζί με την χιτίνη, είναι γραμμικά ή διακλαδιζόμενα μόρια τα οποία είναι συνδεδεμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου (1-3), (1-6) β-γλυκάνες και (1-3) α-γλυκάνες (Aida *et al.*, 2009).



Εικόνα 5: Η βασική δομή των β-γλυκανών Πηγή: <http://www.scientificpsychic.com/>

Οι λόγοι που οδήγησαν στη χρήση των εδώδιμων μανιταριών ως διατροφικό συμπλήρωμα και στη φαρμακολογία είναι η παρουσία των β-γλυκανών στη δομή τους. Κάθε ένα είδος μύκητα εμφανίζει διαφορετικό είδος ολιγοσακχαρίτη και σε άλλες αναλογίες, το οποίο οφείλεται κυρίως σε γενετικούς παράγοντες. Τόσο η υδατοδιαλυτή όσο και η αδιάλυτη μορφή τους έχει αναγνωρισθεί σε μύκητες, με την πρώτη να έχει αποδεδειγμένα υψηλότερη επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων (Otake *et al.*, 2009). Ακόμη, το μήκος του μορίου της β-1,3-γλυκάνης, η συχνότητα της και το είδος της διακλάδωσης συμβάλλει και αυτό στον τρόπο επίδρασης (Reverberi *et al.*, 2004). Στον Πίνακα 7 παρατηρούμε επιλεγμένα είδη βασιδιομυκήτων, τα οποία εμφανίζουν βιολογικά

ενεργές β-γλυκάνες με τις αντίστοιχες ονομασίες τους. Ακόμη οι συνθήκες καλλιέργειας και το υπόστρωμα καλλιέργειας επηρεάζουν την περιεκτικότητα τους. Εάν ο λόγος C/N του υποστρώματος είναι 40:1 τότε έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η περιεκτικότητα των βασιδιομυκήτων σε β-γλυκάνες στα *Pleurotus* spp. ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται στην *Lentinula edodes* εάν αυξηθεί η περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις (Reverberi *et al.*, 2004). Επίσης σημαντικό είναι το στάδιο ωριμότητας της καρποφορίας του μύκητα (Otakar *et al.*, 2009).

Υποστηρίζεται ότι οι θεραπευτικές ιδιότητες των μανιταριών οφείλονται στους πολυσακχαρίτες τους, δηλαδή κατά ένα μεγάλο ποσοστό στις β-γλυκάνες. Μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να ενισχύσουν το ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν αντικαρκινική δράση μέσω της αναστολής ορισμένων όγκων (Boh *et al.*, 2007, Reverberi *et al.*, 2004). Στη θεραπεία του διαβήτη έχει αποδειχθεί ότι η *Grifolan* αυξάνει την παραγωγή της ινσουλίνης (Otakar *et al.*, 2009). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι οι β-γλυκάνες μειώνουν το συνολικό επίπεδο της χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης στο αίμα των ανθρώπων ενώ αυξάνουν ελάχιστα το επίπεδο της HDL χοληστερόλης (Otakar *et al.*, 2009). επίσης, μελέτες έδειξαν ότι τα *Pleurotus ostreatus* και *Lentinula edodes* συνεισφέρουν στην αντίσταση του εντερικού βλεννογόνου σε φλεγμονή και αναστέλλουν την ανάπτυξη των εντερικών ελκών (Otakar *et al.*, 2009).

Για τη διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης των β-γλυκανών των μυκήτων δεν έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα. Για τα *Pleurotus ostreatus* και *P. eryngii* αφού έγινε εξαγωγή αυτών των ενώσεων αποδείχθηκε ότι βοηθούν στην ανάπτυξη των *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. και *Enterococcus faecium* σε *in-vitro* μελέτη (Synytsya *et al.*, 2009). Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισαν οι πολυσακχαρίτες από το *Ganoderma lucidum*, καθώς ενίσχυσαν την ανάπτυξη των *Bifidobacterium longum*, *B. pseudocatenulatum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* Shirota και του *B. longum* (Mohd Hamim *et al.*, 2010, Yamin *et al.*, 2012). Επίσης, θετική ανάπτυξη στα *Lactobacillus brevis* και *Bifidobacterium longum* παρατηρήθηκε σε 24ωρη επώαση με β-γλυκάνες από καρποφορίες των *Poria cocos* και *Polyporus rhinoceros* σε αντίστοιχη μελέτη. Ακόμη, η καρποφορία του *Poria cocos* έδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του *Clostridium celatum* ενός παθογόνου του εντέρου (Gao *et al.*, 2009). Επιπλέον, η χρήση πολυσακχαρίτων ως υπόστρωμα ζύμωσης που προέρχονταν από κριθάρι, βακτήριο (*Alcaligenes faecalis*), φύκος (*Laminaria digitata*) και μανιτάρι (*Pleurotus tuber-regium*) συνέβαλλαν θετικά στην ανάπτυξη των *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis* σε σύγκριση με την ινουλίνη (Zhao and Cheung, 2011). Οι ίδιοι

συγγραφείς αργότερα εξέτασαν το μεταβολικό μονοπάτι που χρησιμοποιεί το *B. infantis* για να μεταβολίσει τις διαφορετικές πηγές άνθρακα που αναφέρθηκαν και προηγούμενως (Zhao and Cheung, 2013). Τέλος, εντελλώς διαφορετική προσέγγιση ακολουθήθηκε από μελετητές για τον προσδιορισμό της χρήσης τως β-γλυκανών από τους στύπους των *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* και *Flammulina velutipes*, ως πηγή άνθρακα για την διατήρηση των πληθυσμών των *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii sub. bulgaricus*, *B. longum* και *S. thermophilus* στην συντήρηση. Οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυσακχαρίτες από τον στύπο της *Flammulina velutipes* έδρασε θετικά στη διατήρηση των πληθυσμών του *L. acidophilus* και του *L. casei* σε επίπεδα 10^7 CFU/ml για 21 ημέρες στη συντήρηση (Chou et al., 2013).

2.8 Προβιοτικά

Ο όρος προβιοτικά προέρχεται από τα Ελληνικά και σημαίνει για την ζωή. Ο πρώτος ορισμός που δόθηκε αναφερόταν σε οργανισμούς και ουσίες που συμβάλλουν στην εντερική μικροβιακή ισορροπία (Hamim et al., 2010). Αργότερα όμως αναθεωρήθηκε λόγω γενικότητας της λέξης ουσίας ως “ένα ζωντανό μικροβιακό διατροφικό συμπλήρωμα που επηρεάζει ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας την μικροβιακή εντερική ισορροπία”. Ενώ τα τελευταία χρόνια επικρατεί ότι είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί (βακτήρια γαλακτικού οξέος και άλλα ή ζύμες) που εμφανίζουν ωφέλιμες ιδιότητες για τον ξενιστή και δρουν βελτιώνοντας και διατηρώντας την καλή λειτουργία και ισορροπία την εντερικής μικροχλωρίδας (Gomes and Malcata, 1999, Schezenmeir and Verese, 2001). Αυτοί οι μικροοργανισμοί προσφέρουν πολλά οφέλη στην υγεία του ξενιστή μερικά από αυτά είναι η μείωση της χοληστερόλης, αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης, ανακούφιση από την δυσκοιλιότητα και αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Zhao and Cheung, 2011).

Μικροοργανισμοί διαφόρων γενών έχουν χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικά, οι οποίοι προέρχονται κυρίως από την εντερική μικροχλωρίδα, αλλά οι έρευνες επικεντρώνονται στους λακτοβακίλλους, μπιφιδοβακτήρια, εντερόκοκκους και στη ζύμη *Saccharomyces boulardii* (Andersson et al., 2001, Hamim et al., 2010). Στον Πίνακα 8 αναγράφονται όλοι οι μικροοργανισμοί που θεωρούνται προβιοτικοί. Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

Κατά τη διάρκεια των χρόνων έχουν τεθεί μερικά κριτήρια ασφάλειας για την επιλογή των προβιοτικών οργανισμών ώστε να παρουσιάζουν κάποια επιθυμητά

χαρακτηριστικά. Αυτά χωρίζονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες την καταλληλότητα, τα τεχνικά χαρακτηριστικά, την ανταγωνιστικότητα και την απόδοση και λειτουργικότητα και είναι τα εξής ανα κατηγορία (Klaenhammer *et al.*, 1999):

● Καταλληλότητα

1. Ακριβής ταξινόμηση και ταυτοποίηση
2. Προβιοτικά για ανθρώπινη χρήση είναι προτιμότερο να έχουν ανθρώπινη προέλευση.
3. Να απομονώνονται από το γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ατόμων
4. Να μην είναι παθογόνα
5. Να μην συνδέονται με ασθένειες, όπως ενδοκαρδίτιδες και διαταραχές της πεπτικής οδού.
6. Να μην φέρουν γονίδια με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και ιδιαίτερα εκείνα τα οποία φέρονται σε μετακινούμενα γενετικά στοιχεία.

● Τεχνολογικά κριτήρια

1. Αντοχή κατά την παραγωγική διαδικασία και τη διατήρηση
2. Σταθερότητα μέσα στο προϊόν και κατά τη συντήρησή του
3. Επιβίωση σε υψηλούς πληθυσμούς (κατά προτίμηση 10^6 - 10^8)
4. Σταθερότητα των επιθυμητών χαρακτηριστικών κατά την καλλιέργεια, αποθήκευση και μεταφορά
5. Αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
6. Γενετική σταθερότητα
7. Αντοχή στους φάγους

● Ανταγωνιστικότητα

1. Ικανότητα επιβίωσης, πολλαπλασιασμού και μεταβολικής δραστηριότητας στο επιθυμητό σημείο-στόχο *in vivo*
2. Αντοχή στα οξέα
3. Αντοχή στα χολικά άλατα
4. Προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο και μακρά επιβίωση στον εντερικό σωλήνα
5. Ανοσοδιέγερση αλλά όχι προφλεγμονώδη δράση
6. Ανταγωνιστική δράση κατά γνωστών εντερικών παθογόνων όπως το *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*.

7. Ικανότητα να ανταγωνίζεται την φυσιολογική μικροχλωρίδα, συμπεριλαμβανομένων του ίδιου ή παρόμοιων βακτηρίων

● Απόδοση και λειτουργικότητα

1. Ικανότητα προαγωγής της υγείας (π.χ. ανοχή στη λακτόζη)
2. Ανταγωνιστική δράση εναντίον παθογόνων βακτηρίων
3. Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (βακτηριοσίνες, H_2O_2 , οργανικά οξέα κ.ά)
4. Ανοσοδιέγερση
5. Αντιμεταλλαξιογόνος δράση
6. Αντικαρκινική δράση
7. Παραγωγή βιοενεργών προϊόντων (ένζυμα, εμβόλια, πεπτίδια).

Στη συνέχεια αναλύονται τα δύο βασικά γένη προβιοτικών οι λακτοβάκιλλοι και τα μπιφιδοβακτήρια.

2.8.1 *Lactobacillus* spp.

Γενικότερα τα βακτήρια που έχουν ως κύριο τελικό προϊόν ζύμωσης των σακχάρων το γαλακτικό οξύ είναι κυρίως gram θετικοί, καταλάση αρνητικοί, συνήθως αναερόβιοι ή έστω ανεκτοί σε αερόβιες συνθήκες, μη σποριογόνοι και χωρίς αυτόνομη κίνηση οργανισμοί (Gomes *et al.*, 1999).

Η πρώτη αναφορά για τους λακτοβακίλλους σε εντερική μικροχλωρίδα γίνεται το 1990, όπου ονομάζονται *Bacillus acidophilus*. Τα κύτταρα τους έχουν σχήμα βακίλου, κόκκου ή κοκκοβακίλου, είναι μη σπορογόνα, gram θετικά βακτήρια και είναι αναερόβια ή προαιρετικά αερόβια (Gomes *et al.*, 1999). Στη δεκαετία του 1960 ανακαλύφθηκε η ετερογένεια του *Lactobacillus acidophilus* και προτάθηκε ο διαχωρισμός του σε έξι ομόλογες ομάδες. Αποτέλεσμα αυτού είναι όσα παρουσίασαν υψηλή συγγένεια DNA να παραμείνουν στο είδος *L. acidophilus* και να δημιουργηθούν τα είδη *L. amylovorus*, *L. gallinatum*, *L. crispatus*, *L. gasseri* και το *L. johnsonii* (Holzapfel *et al.*, 2001). Ο *L. acidophilus*, έχει μορφή βακίλλου με στρογγυλεμένες άκρες και σχηματίζει είτε βραχείες αλυσίδες είτε ζεύγη. Δεν φέρει μαστίγια, είναι μη σπορογόνο και ανεκτικό στην αλατότητα. Είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι 35⁰ C με pH 5,5-6 (Gomes *et al.*, 1999).

Από οικολογικής άποψης αυτό το γένος αποτελεί μέλος της φυσικής μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού και του ουρογενετικού συστήματος του ανθρώπου. Τα μέλη του συνεισφέρουν στη διατήρηση της υγιούς κατάστασης του εντέρου και του ουροποιητικού

συστήματος ενώ η δράση του επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η διαθεσιμότητα οξυγόνου κ.α (Gomes *et al.*, 1999).

2.8.2 *Bifidobacterium* spp.

Άλλο ένα γένος βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι *Bifidobacterium* spp., που ανήκουν στα ακτινοβακτήρια. Ένας μικροοργανισμός, ο οποίος εμφάνιζε τα χαρακτηριστικά του γένους, παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1900 σε κόπρανα βρεφών που θηλάζουν και ονομάστηκε *Bacillus bifidus* (Gomes *et al.*, 1999). Είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και είναι δύσκολη η καλλιέργειά τους σε τρόφιμα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (Holzapfel *et al.*, 2001). Αποτελούν μόλις το 3-6% της εντερικής μικροχλωρίδας ενός ενήλικα, ενώ είναι από τα πρώτα βακτήρια που εμφανίζονται σε νεογέννητα (Shell *et al.*, 2002).

Στα πιο σημαντικά είδη του γένους είναι εύκολη η αναγνώριση τους, λόγω διαφορετικών φαινοτύπων (Holzapfel *et al.*, 2001). Όπως αναφέρθηκε, είναι αυστηρά αναερόβια, Gram θετικά, καταλάση αρνητικά βακτήρια, δίχως όργανα κίνησης και μη σποριογόνα. Τα κύτταρα τους έχουν διάφορα σχήματα όπως οι κοντοί κυρτοί βάκιλλοι, ενώ το χαρακτηριστικό τους είναι οι δισχιδείς βάκιλλοι (Gomes *et al.*, 1999). Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37-41⁰ C με pH 6-7.

Η παρουσία τους έχει σχετιστεί με ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου όπως η πρόληψη της διάρροιας, βελτίωση στη δυναξία της λακτόζης κ.α. (Shell *et al.*, 2002). Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο εντερικό και ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου αλλά και των μελισσών. Ο πληθυσμός τους στο έντερο είναι άμεσα εξαρτημένος από την ηλικία και τη διατροφή. Έτσι τα νεογνά εμφανίζουν πολύ υψηλό, καθότι είναι από τους πρώτους μικροοργανισμούς που εγκαθίστανται στην μικροχλωρίδα τους. Ενώ όσο αυξάνεται η ηλικία του ανθρώπου μειώνεται ο πληθυσμός τους και παράλληλα διαφοροποιούνται τα γένη. Αποτέλεσμα αυτού είναι το *B. infantis* και *B. breve* να παρουσιάζεται μόνο στα βρέφη ενώ το *B. adolescentis* στους ενήλικες. Τέλος το *B. longum* είναι μέλος της εντερικής μικροχλωρίδας όλων των ηλικιών (Gomes *et al.*, 1999).

3. Σκοπός της εργασίας

Μέχρι στιγμής υπάρχει εκτενής βιβλιογραφική αναφορά στη χρήση μυκήτων λευκής σήψης για την αποτοξικοποίηση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου όπως και για την αξιοποίηση τους στην παραγωγή εδώδιμων μανιταριών. Όμως, λίγες σχετικά αναφορές υπάρχουν για την καλλιέργεια των μανιταριών σε παραπροϊόντα-απόβλητα ελαιοκομίας, όπως και για την πιθανή πρεβιοτική δράση των β-γλυκάνων των βασιδιομυκήτων. Επιπλέον, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά μανιταριών που παράγονται σε τέτοια υποστρώματα, ενώ δεν υπάρχουν καθόλου στοιχεία για την *in vitro* πρεβιοτική δράση μυκητιακής βιομάζας που αναπτύχθηκε σε παραπροϊόντα ελαιουργίας.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη καλλιεργητικών χαρακτήρων και της απόδοσης στην παραγωγή βιομάζας μυκήτων των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* που αναπτύσσονταν σε διάφορα παραπροϊόντα-απόβλητα ελαιοκομίας. Επίσης, η εργασία στόχευε στη διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης και της διατροφικής αξίας τόσο των μυκηλίων από τα δύο προαναφερθέντα είδη βασιδιομυκήτων (μετά την καλλιέργεια τους σε συμβατικό υγρό θρεπτικό μέσο) όσο και καρποφοριών τους που αναπτύχθηκαν σε συμβατικά και σε υποστρώματα που περιείχαν υπολείμματα ελαιουργίας, με τελικό σκοπό την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Τέλος, εξετάστηκε η αποτοξικοποίηση/αποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιοτριβείου από τα δύο είδη και η ενεργότητα των ενζύμων που εμπλέκονταν στη διαδικασία.

Υλικά και μέθοδοι

4. Καλλιέργεια σε υγρά υποστρώματα

4.1 Παραγωγή μυκηλίου

ΥΛΙΚΑ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μυκήτων κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι τα ακόλουθα:

- Potato dextrose agar (PDA) (Conda), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας δηλαδή προστέθηκαν 39 gr σε 1 lt απιονισμένο νερό σε γυάλινες φιάλες με βιδωτό πώμα και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C , 1,2 Atm. για 20 λεπτά. Έπειτα εντός της τράπεζας νηματικής ροής κατανεμήθηκε σε πλαστικά τρυβλία petri διαμέτρου 11 cm.
- Malt extract broth (Conda) διαλύθηκε σε 1LT απιονισμένο νερό και καταναμέθηκε ανά 100ml σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, οι οποίες πωματίστηκαν με βαμβάκι και αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά στους 121°C , 1,2 Atm με τη χρήση αυτόκαυστου.
- Υγρό απόβλητο ελαιουργείων (OMW, YAE) από τριφασικό ελαιοτριβείο της περιοχής της Κρήτης χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή στερεού και υγρού υποστρώματος. Αρχικά το απόβλητο φυγοκεντρήθηκε στα 4000 rpm για δέκα λεπτά (Biofuge Stratos). Έπειτα, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω χαρτιού Whatman No 4 και ρυθμίστηκε το pH του στη τιμή 5,5 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος CaO συγκέντρωσης 2M. Για την περίπτωση των στερεοποιημένων υποστρωμάτων και για την προετοιμασία τρυβλίων με αραιωμένα YAE (10% v/v σε απιονισμένο νερό), χρησιμοποιήθηκαν διηθημένα YAE και άγαρ σε αναλογία 1,5% (w/v). Στη συνέχεια, ακολούθησε η αποστείρωση του υποστρώματος με τη χρήση αυτόκαυστου στους 121°C , 1,2 Atm για 20 λεπτά και κατανεμήθηκε σε τρυβλία Petri. Για την παρασκευή υγρών υποστρωμάτων στις διάφορες συγκεντρώσεις 12,5%, 25% και 50%, έγιναν οι αντίστοιχες αραιώσεις και μοιράστηκαν ανά 100 ml σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250ml. Οι κωνικές φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι και αποστειρώθηκαν για 1 ώρα στους 121°C , 1,2 Atm με τη χρήση αυτόκαυστου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την παραγωγή βιομάζας, τον υπολογισμό της ενεργότητας των ενζύμων που χρησιμοποιούν οι μύκητες λευκής σήψης καθώς και της μείωσης της φυτοτοξικότητας, του χρώματος, των φαινολικών ενώσεων και του χημικά απαιτούμενο οξυγόνο των αποβλήτων καλλιεργήθηκαν μύκητες σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml σε διάφορες αραιώσεις των ΥΑΕ σε απιονισμένο νερό. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για αυτό τον σκοπό, ήταν το *Pleurotus ostreatus* IK1123, το *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 και το *G. lucidum* VK-7400, τα οποία προήλθαν από την συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α. Για την διεξαγωγή του πειράματος μελετήθηκαν τα εξής υποστρώματα: το συμβατικό υπόστρωμα Malt extract και οι ακόλουθες συγκεντρώσεις ΥΑΕ: 12,5%, 25% και 50%. Σε όλες τις παραπάνω επεμβάσεις διενεργήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις. Τέλος, πριν την διεξαγωγή του πειράματος έγινε ανάλυση των χαρακτηριστικών του αρχικού υγρού αποβλήτου.

Προκειμένου να επιτευχθεί η ομαλή διεξαγωγή του πειράματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με PDA (Conda) για την παραλαβή εμβολίων που θα χρησιμοποιούνταν στον μετέπειτα εμβολιασμό υγρών υποστρωμάτων των κωνικών φιαλών, οι οποίες περιείχαν malt extract ή αραιωμένα ΥΑΕ. Ειδικά για εμβολιασμό των τελευταίων, κρίθηκε απαραίτητος ο προηγούμενος εγκλιματισμός των μυκήτων μέσω της ανάπτυξης τους σε στερεοποιημένα μέσα που περιείχαν αραιωμένα ΥΑΕ 10%.

Προχωρώντας στην πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε όμοια επεξεργασία των ΥΑΕ για την παρασκευή των αντίστοιχων αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως υγρά θρεπτικά υποστρώματα. Αφού ρυθμίστηκε το pH, τα υποστρώματα κατανεμήθηκαν ανά 100 ml στις κωνικές φιάλες και αποστειρώθηκαν με τη χρήση αυτόκαυστου στους 121⁰ C, 1,2 Atm για 1 ώρα. Όταν απέκτησαν την κατάλληλη θερμοκρασία -θερμοκρασία δωματίου- τα υποστρώματα εμβολιάστηκαν ασηπτικώς (με χρήση ειδικού μεταλλικού διακορευτή με κυκλική διατομή διαμέτρου 12 mm) με χρήση δισκίων, σε τράπεζα νηματικής ροής (laminar flow). Τέλος, η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θαλάμους υπό τις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 27⁰ C, απουσία φωτός, καθημερινή χειροκίνητη ανακίνηση και χρονική διάρκεια 42 ημερών. Εξαιρέθηκαν οι φιάλες με Malt extract οι οποίες αφαιρέθηκαν από τον θάλαμο επώασης μόλις ολοκληρώθηκε ο αποικισμός του μέσου καλλιέργειας από τα στελέχη *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* LGAM 9720 και *Pleurotus ostreatus* IK 1123 (σε 21, 31 και 36 ημέρες αντίστοιχα).

4.2 Προσδιορισμός βιομάζας, τελικού pH, αποχρωματισμού και ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Μετά το πέρας της επώασης το περιεχόμενο των κωνικών φιαλών διηθήθηκε σε χαρτί Whatman No 4 με στόχο τη συγκράτηση και παραλαβή των μυκηλίων. Τα τελευταία τοποθετήθηκαν στους -20°C για τουλάχιστον δύο ημέρες, λυοφιλοποιήθηκαν για 48 ώρες και ζυγίστηκαν εκ νέου, με στόχο να υπολογιστεί το ξηρό βάρος της βιομάζας τους.

Το τελικό pH του υγρού μέσου καλλιέργειας μετρήθηκε με τη βοήθεια συσκευής πεχαμέτρησης (Corning-Ell Model 12). Αντίστοιχα, η ηλεκτρική αγωγιμότητα μετρήθηκε με τη συσκευή Jenway, 4010 Conductivity meter. Για τον προσδιορισμό του βαθμού αποχρωματισμού του αποβλήτου μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 525 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρο (U 2001, Hitachi) (Aggelis *et al.*, 2002). Τέλος, τόσο τα υπερκείμενα όσο και τα λυοφιλοποιημένα και -στη συνέχεια- κονιορτοποιημένα μυκήλια αποθηκεύθηκαν σε φιαλίδια στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

4.3 Προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος προσδιορισμού των ολικών φαινολικών που χρησιμοποιήθηκε, βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μείγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος (Folin-Ciocalteu) (Waterman and Mole, 1994).

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Μείγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος (Folin-Ciocalteu) (MERCK).
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 (Alpha Aesar).
- Διάλυμα συριγγικού οξέος (Alpha Aesar).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Αφού τα δείγματα απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκε αραίωσή τους 1:10 σε απιονισμένο νερό, όπου αυτή κρίθηκε απαραίτητη. Η διαδικασία προσδιορισμού ξεκίνησε με τη χρήση ογκομετρικών φιαλών των 25 ml, στις οποίες προστέθηκαν 20ml απιονισμένου νερού, 250 μl δείγματος και 1,250 ml του μίγματος Folin-Ciocalteu. Έπειτα από ένα λεπτό, προστέθηκαν 3,75 ml Na_2CO_3 συγκεντρώσεως 20% w/v. Ακολούθησε ανάδευση των φιαλών και επώασή τους σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες. Στη συνέχεια, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (U 2001, Hitachi) μετρήθηκε η απορρόφηση στα 760 nm. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς με τη χρήση συριγγικού

οξέος στις ακόλουθες συγκεντρώσεις 0, 200, 400, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 μg συριγγικού οξέος / ml.

4.4 Προσδιορισμός φυτοτοξικότητας

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η φυτοτοξικότητα προσδιορίζεται με βάση τον δείκτη βλαστικότητας (Germination Index, G.I.%) σπόρων του φυτού δείκτη (μαρούλι), σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Zucconi *et al.* (1981).

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Στο εσωτερικό μέρος γυαλινών τρυβλίων petri τοποθετήθηκαν τρεις δίσκοι από διηθητικό χαρτί και στην επιφάνειά τους είκοσι πέντε σπόροι μαρουλιού. Έπειτα διαβράχθηκαν με 3ml δείγματος, ενώ ο μάρτυρας διαβράχθηκε με 3ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση για τρεις ημέρες, στους 25°C , σε θάλαμο επώασης και με την απουσία φωτός. Τέλος, μετρήθηκε ο αριθμός των σπόρων που εκβλάστησαν και το μήκος των ριζιδίων τους. Ο δείκτης βλαστικότητας που χρησιμοποιήθηκε προσδιορίζεται από τον τύπο:

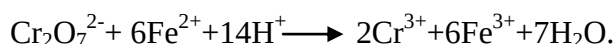
GI % = (αριθμό των εκβλαστημένων σπόρων του δείγματος* μήκος των ριζιδίων του δείγματος) / (αριθμό των εκβλαστημένων σπόρων του μάρτυρα* μήκος των ριζιδίων του μάρτυρα)

4.5 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD) ενός δείγματος είναι η ισοδύναμη ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την οξείδωση σε έντονα οξειδωτικό περιβάλλον, των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα. Ο προσδιορισμός βασίστηκε στην οξείδωση των δειγμάτων με ισχυρό οξειδωτικό διάλυμα διχρωμικού καλίου ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) σε όξινο περιβάλλον, με πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) και υψηλή θερμοκρασία, με παρουσία καταλύτη (Ag_2SO_4), ώστε να εξασφαλιστεί η οξείδωση των οργανικών ενώσεων. Πρόκειται για τη μετατροπή του διχρωμικού ιόντος ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) σε χρωμικό (Cr^{3+}).

Έγινε χρήση της μεθόδου τιτλοδότησης με την χρήση πρότυπου διαλύματος $\text{Fe}(\text{NH}_4\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (FASS, Ferrous Ammonium Sulphate Solution) και τη χρήση φεροΐνης. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:



ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

- **Διάλυμα πέψης $K_2Cr_2O_7$**

Σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου διαλύθηκαν 10,216 gr διχρωμικό κάλιο (SIGMA) και 33,3 gr θεικός υδράργυρος σε 500 ml απιονισμένο νερό. Έπειτα, με παράλληλη ψύξη του διαλύματος προστέθηκε 167 ml θεικό οξύ (MERCK). Το διάλυμα αναδεύτηκε και συμπληρώθηκε με νερό ως το ένα λίτρο.

- **Καταλύτης Θεικός Αργύρος**

Σε φιάλη διαλύθηκαν $22 \pm 0,1$ gr θεικού αργύρου σε 2,5 lt θεικό οξύ (MERCK) και αφέθηκαν για 24 ώρες.

- **FASS**

Σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου διαλύθηκαν 9,80 gr θεικού αμμωνιούχου σιδήρου ($FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, MERCK) σε 80 ml θεικό οξύ (MERCK). Το διάλυμα συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό ως το λίτρο.

- **Δείκτης Φεροΐνης**

Σε 80ml απιονισμένο νερό διαλυτοποιήθηκαν 0,980 gr θεικού αμμωνιούχου σιδήρου. Έπειτα, προστέθηκε 1,485 gr Ο-μονοϋδρική φαινανθρολίνη (FLUKA ANALYTICA), ανακινήθηκε καλά και σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τα 100 ml.

- **Standard Διάλυμα COD**

Σε ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου διαλυτοποιήθηκαν 0,425 gr όξινο φθαλικό κάλιο (Riedel-de Haen AG) σε 1lt απιονισμένο νερό. Το C.O.D. αυτού του διαλύματος είναι $500 \mu g O_2 / ml$.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Αρχικά προθερμάνθηκε η μηχανή πέψης (COD reactor, HACH) και καθορίστηκε ότι απαιτείται αραίωση με απιονισμένο νερό ως εξής: για τα δείγματα 25% και 50% απόβλητο 1:50, ενώ για το 12,5% 1:20. Στα ειδικά σωληνάκια προστέθηκαν 1,5 ml $K_2Cr_2O_7$ και 2,5 ml δείγματος. Έπειτα, με προσοχή λόγω εξώθερμης αντίδρασης, προστέθηκαν 3,5 ml καταλύτη, αναδεύτηκαν, πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν στη μηχανή πέψης στους $150^{\circ}C$ για 2 ώρες. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα είχαν δύο επαναλήψεις: κάθε φορά που συμπληρώνονταν οι 25 θέσεις της μηχανής πέψης, δύο θέσεις καταλάμβαναν δείγματα που αποτελούνταν από απιονισμένο νερό (Blanc) και μία δείγμα που περιείχε το standard διάλυμα COD.

Μετά το πέρας των δύο ωρών και αφού τα διαλύματα ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου ξεκίνησε η διαδικασία τιτλοδότησης. Αρχικά, τιτλοδοτήθηκε δύο φορές διάλυμα το οποίο περιείχε 1,5 ml $K_2Cr_2O_7$, 15 ml H_2O και 3,5 ml καταλύτη και αποτελεί το διάλυμα S. Έπειτα, ξεκίνησε η διαδικασία τιτλοδότησης όλων των δειγμάτων που προήλθαν από την πέψη. Συγκεκριμένα, το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 100ml και ξεπλύθηκε δύο φορές με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, προστέθηκαν δύο σταγόνες φεροΐνης και σημειώθηκε ο όγκος FASS που απαιτείται για τη μετατροπή του χρώματος του διαλύματος σε πορτοκαλί-καφέ με τη χρήση προχοΐδας. Η χημικά απαιτούμενη ποσότητα οξυγόνου υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$COD (mg/L) = (B-T)/S \cdot 1000$$

T: Ο όγκος διαλύματος θειικού αμμωνιούχου σιδήρου που καταναλώνεται για το δείγμα σε ml

B: Ο όγκος διαλύματος FASS που καταναλώνεται για τον τυφλό προσδιορισμό σε ml

S: Ο όγκος διαλύματος θειικού αμμωνιούχου σιδήρου που καταναλώνεται για το διάλυμα διόρθωσης σε ml

4.6 Προσδιορισμός ενεργότητας λακκάσης

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος του Bourbonnais *et al.* (1990) για τον προσδιορισμό της λακκάσης βασίζεται στην οξείδωση του υποστρώματος ABTS (2,2 -αζινο-δις-3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Τρυγικό νάτριο (Alpha Aesar) συγκεντρώσεως 0,1 M και pH 4,5
- Αντιδραστήριο 2,2-azinobis-3-ethylbezothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS, Biomedical)

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Σε κυψελίδα προστέθηκε 0,6 ml τρυγικό νάτριο συγκεντρώσεως 0.1M και pH 4,5. Αφού τα δείγματα αραιώθηκαν καταλλήλως, προστέθηκαν 0,4 ml εντός της κυψελίδας. Η ενζυμική αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 0,2 ml ABTS (1,5 mM) και την ανάδευση του διαλύματος. Στη συνέχεια, ακολούθησε φωτομέτρηση στα 425 nm κάθε 20 δευτερόλεπτα για τρία λεπτά (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer). Η ενεργότητα της λακκάσης

εκφράζεται σε units (U, $\mu\text{mol}/\text{min}$) που ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό και η σχέση που την καθορίζει είναι η εξής:

$$\text{Laccase activity} = \frac{dA_{(425\text{nm})}}{dt (\text{min})} \cdot E (\text{lt}/\text{mol} \cdot \text{cm}) \cdot V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

Όπου: $dA_{(425\text{nm})}/dt (\text{min})$: η κλίση της ευθείας απορρόφησης προς τον χρόνο σε λεπτά

$$E = 36 \text{ lt}/\text{mol} \cdot \text{cm}$$

$V_{\text{reaction}} (\text{ml})$: ο όγκος του υποστρώματος αντίδρασης σε ml και

$V_{\text{sample}} (\text{ml})$: ο όγκος του δείγματος σε ml.

4.7 Προσδιορισμός της δραστηριότητας των υπεροξειδασών (εξαρτώμενης και μη εξαρτώμενης του μαγγανίου)

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αντίδραση στην οποία βασίζονται οι μέθοδοι προσδιορισμού της ενεργότητας των υπεροξειδασών είναι:



Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση του δισθενούς μαγγανίου σε τρισθενές μόριο. Αρχικά, προσδιορίστηκε η παρεμβολή του υποστρώματος (AL) το οποίο είναι ένα μείγμα δίχως θειικό μαγγάνιο και υπεροξείδιο. Έπειτα, μετρήθηκε η δράση του ενζύμου υπεροξειδάση ανεξάρτητη του μαγγανίου (AP) σε μείγμα χωρίς MnSO_4 . Τέλος, εκτιμήθηκε η AR ενεργότητα σε ένα πλήρες μείγμα (Ngo and Lenhoff, 1980).

4.7.1. Προσδιορισμός της παρεμβολής του υποστρώματος στον προσδιορισμό της δραστηριότητας των υπεροξειδασών (εξαρτημένων και μη του μαγγανίου)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 0,1 M στο οποίο ρυθμίστηκε το pH στη τιμή του 4,5 με τη χρήση γαλακτικού νατρίου (Alpha Aesar)
- Διάλυμα 3-διμεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ (DMAB) (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 25mM
- Διάλυμα 1 mM 3-μεθυλο-2-βενζο-θειαζολινοϋδραζονοϋδροχλωρίδιο (MBTH, Alpha Aesar)

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Αρχικά, προστέθηκαν σε κυψελίδα 0,5 ml διαλύματος ηλεκτρικού οξέος. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μlt DMAB συγκέντρωσης 25 mM και 50 μL MBTH. Η ενζυμική αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 330 μlt δείγματος και ανάδευση. Στη συνέχεια

ακολούθησαν διαδοχικές φασμαφωτομετρικές μετρήσεις ανά 20 δευτερόλεπτα για 3 λεπτά στα 590 nm. Η παρεμβολή του υποστρώματος υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση

$$\text{Background activity} = dA_{(590\text{ nm})}/dt (\text{min}) * E (\text{lt/mol*cm}) * V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

Όπου: $dA_{(425\text{nm})}/dt (\text{min})$: η κλίση της ευθείας απορρόφησης προς τον χρόνο σε λεπτά

$$E = 32,9 \text{ lt/mol*cm}$$

V_{reaction} (ml): ο όγκος του υποστρώματος αντίδρασης σε ml και

V_{sample} (ml): ο όγκος του δείγματος σε ml.

4.7.2. Προσδιορισμός της δράσης της υπεροξειδάσης μη εξαρτημένης του μαγγανίου)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 0,1 M στο οποίο ρυθμίστηκε το pH στη τιμή 4,5 με τη χρήση γαλακτικού νατρίου (Alpha Aesar)
- Διάλυμα 3-διμεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ (DMAB) (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 25 mM
- Διάλυμα 1 mM 3-μεθυλο-2-βενζο-θειαζολινοϋδραζονοϋδροχλωρίδιο (MBTH, Alpha Aesar)
- Διάλυμα H₂O₂ (Carlo Erba) συγκέντρωσης 10 mM

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για τον προσδιορισμό της δράσης της υπεροξειδάσης (μη εξαρτημένης του μαγγανίου) ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με αυτήν του προσδιορισμού της παρεμβολής του υποστρώματος, με τη μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν 330 μlt δείγματος ενώ εκκινήτης της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 5 μlt H₂O₂ 10 mM. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές μετρήσεις με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer) ανά 20 δευτερόλεπτα για 3 λεπτά στα 590 nm. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με αφαίρεση της AP από την Background activity και η AP από την ακόλουθη μαθηματική σχέση:

$$\text{AP} = \text{Independent peroxidase} + \text{Background Activity} = dA_{(59\text{ nm})}/dt (\text{min}) * E (\text{lt/mol*cm}) * V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

Όπου: $dA_{(425\text{nm})}/dt (\text{min})$: η κλίση της ευθείας απορρόφησης προς τον χρόνο σε λεπτά

$$E = 32,9 \text{ lt/mol*cm}$$

V_{reaction} (ml): ο όγκος του υποστρώματος αντίδρασης σε ml και

V_{sample} (ml): ο όγκος του δείγματος σε ml

4.7.3 Προσδιορισμός της δράσης της υπεροξειδάσης του μαγγανίου

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα ηλεκτρικού οξέος (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 0,1 M στο οποίο ρυθμίστηκε το pH στη τιμή 4,5 με τη χρήση γαλακτικού νατρίου (Alpha Aesar)
- Διάλυμα 3-διμεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ (DMAB) (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 25mM
- Διάλυμα 1mM 3-μεθυλο-2-βενζο-θειαζολινοϋδραζονοϋδροχλωρίδιο (MBTH, Alpha Aesar)
- Διάλυμα H₂O₂ (Carlo Erba) συγκέντρωσης 10 mM
- Διάλυμα θεικού μαγγανίου MnSO₄ (Mallinckrodt Inc.) συγκεντρώσεως 20mM

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πρώτα προστέθηκε σε κυψελίδα 0,5 ml διάλυμα ηλεκτρικού οξέος-γαλακτικού νατρίου με pH 4,5 και συγκέντρωση 0,1M. Έπειτα προστέθηκαν 100 μ l DMAB συγκέντρωσης 25mM, 50 μ L διαλύματος MBTH, 330 μ l δείγματος και 5 μ l MnSO₄. Η ενζυμική αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 5 μ l 10 mM H₂O₂. Ακολούθησαν διαδοχικές μετρήσεις με τη χρήση φασματοφωτόμετρου ανά 20 δευτερόλεπτα για 3 λεπτά στα 590 nm. Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης μαγγανίου υπολογίστηκε από την αφαίρεση της AP από την AR. Η AR υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$AR = \text{Mn-peroxidase} + \text{Independent peroxidase} + \text{Background Activity} = \frac{dA_{(590\text{ nm})}}{dt (\text{min})} \cdot E (\text{lt/mol} \cdot \text{cm}) \cdot V_{\text{reaction}} (\text{ml}) / V_{\text{sample}} (\text{ml})$$

Όπου: $dA_{(425\text{nm})}/dt (\text{min})$: η κλίση της ευθείας απορρόφησης προς τον χρόνο σε λεπτά

$$E = 32,9 \text{ lt/mol} \cdot \text{cm}$$

V_{reaction} (ml): ο όγκος του υποστρώματος αντίδρασης σε ml και

V_{sample} (ml): ο όγκος του δείγματος σε ml

4.8 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα τρυγικού νατρίου (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 0,1 M (pH 3)
- Διάλυμα βερατρυλικής αλκοόλης (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 20mM

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου της οξειδάσης της βερατρυλικής αλκοόλης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη σε κυψελίδα 0,8 ml τρυγικού νατρίου

συγκεντρώσεως 0,1M με pH 3 και 400 μ l δείγματος. Ακολούθησε η προσθήκη 35 μ lL διαλύματος βερατρυλικής αλκοόλης συγκεντρώσεως 20 mM, και ανάδευση του διαλύματος με το περιεχόμενο της κυψελίδας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης στα 310 nm κάθε 20 sec για τρία λεπτά με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

4.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της λιγνίνης

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της λιγνίνης βασίζεται στη μέθοδο που πρότειναν οι Tien and Kirk (1988) και στηρίζεται στην οξείδωση της βερατρυλικής αλκοόλης σε βερατρυλική αλδεϋδη.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διάλυμα τρυγικού νατρίου (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 0,1 M (pH 3)
- Διάλυμα βερατρυλικής αλκοόλης (Alpha Aesar) συγκέντρωσης 20 mM
- Διάλυμα H₂O₂ (Carlo Erba) συγκέντρωσης 54 mM

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου της υπεροξειδάση της λιγνίνης προστέθηκαν 0,8 ml τρυγικού νατρίου (0,1M, PH 3), 0,4 ml δείγματος και 35 μ l βερατρυλικής αλκοόλης συγκέντρωσης 20 mM. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 15 μ L 54 mM H₂O₂ και η φωτομέτρηση διεξήχθη στα 310 nm για 3 λεπτά κάθε 20 δευτερόλεπτα με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

5. Καλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα

5.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πριονίδι οξιάς σε τεμαχίδια μικρού μεγέθους
- Άχυρο σίτου σε τεμαχίδια μεγέθους 1-3 cm
- Κλαδέματα ελιάς σε τεμαχίδια μεγέθους 1-3 cm
- Φύλλα ελιάς
- Πίτουρο
- Διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου από την περιοχή της Μεσσηνίας το οποίο διατηρόταν σε ψυκτικό θάλαμο

- Ανθρακικό ασβέστιο –μαρμαρόσκονη για την ρύθμιση του pH

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για τον προσδιορισμό της μυκηλιακής ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη μυκήτων *Pleurotus ostreatus* IK1123, *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 και *G. lucidum* VK-7400. Τα στερεά υποστρώματα που αξιολογήθηκαν ανά είδος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επαναλήψεις.

Πίνακας 9: Στερεά υποστρώματα που αξιολογήθηκαν ως προς των ρυθμό ανάπτυξης των μυκηλιακών υφών

<i>P. ostreatus</i>	Συντομογραφία	<i>Ganoderma lucidum</i>	Συντομογραφία
Άχυρο σίτου	WS	Πριονίδι οξιάς	BS
Άχυρο σίτου +25%	WS+25% TPOMW	Πριονίδι οξιάς +25%	BS+25% TPOMW
διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου		διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	
Άχυρο σίτου +50%	WS+50% TPOMW	Πριονίδι οξιάς +50%	BS+50% TPOMW
διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου		διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	
Κλαδέματα ελιάς	OLPR	Κλαδέματα ελιάς	OLPR
Κλαδέματα ελιάς +50%	OLPR+50% TPOMW	Πριονίδι οξιάς +25%	BS+25%TPOMW
διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου		διφασικό απόβλητο	
Άχυρο σίτου+25%	WS+25% OLPR	Πριονίδι οξιάς +50%	BS+50%TPOMW
κλαδέματα ελιάς		διφασικό απόβλητο	
Άχυρο σίτου +50%	WS+50%OLPR	Πριονίδι οξιάς +25%	BS+25%OLPR
κλαδέματα ελιάς		κλαδέματα ελιάς	
Άχυρο σίτου +75%	WS+75% OLPR	Πριονίδι οξιάς +50%	BS+50%OLPR
κλαδέματα ελιάς		κλαδέματα ελιάς	
		Πριονίδι οξιάς +75%	BS+75%OLPR
		κλαδέματα ελιάς	

Αρχικά, όλα τα υποστρώματα είχαν παραμείνει βυθισμένα σε νερό βρύσης για 24 ώρες ώστε να αυξηθεί η υγρασία τους από 50-80%. Στη συνέχεια προστέθηκε στα αρχικά στερεά υποστρώματα ποσότητα πίτουρου για την ρύθμιση του λόγου άνθρακα προς άζωτο και τον εμπλουτισμό τους σε θρεπτικά συστατικά. Έτσι, το άχυρο σίτου αναμείχθηκε με 10% πίτουρο, το πριονίδι με 20%, τα κλαδέματα ελιάς με 5% και το διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου με 5% αντίστοιχα. Σε κάθε μείγμα υποστρώματος προστέθηκε 1% CaCO₃

(w/w) ώστε να διατηρηθεί το pH σε ικανοποιητικά επίπεδα για την ανάπτυξη του μυκηλίου. Κατόπιν, τα υποστρώματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες διαμέτρου 2,6 cm, καταλαμβάνοντας ύψος 10cm, με τέσσερις επαναλήψεις ανά επέμβαση. Πωματίστηκαν με βαμβάκι για να εξασφαλιστεί επαρκής αερισμός στο εσωτερικό τους χωρίς τον κίνδυνο επιμολύνσεων και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο για μία ώρα στους 121°C και 1,2Atm. Οι σωλήνες εμβολιάστηκαν με τη χρήση ειδικού μεταλλικού διακορευτή με διατομή διαμέτρου 1,2 cm, αφαιρέθηκαν δισκία με αποικισμένα με μυκήλιο των μυκήτων που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε τρυβλία με PDA ή με 10% OMW agar, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η επώαση τους έγινε στους 27°C σε σκοτεινό θάλαμο και ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκηλίου σε αυτούς υπολογίστηκε σε (mm/day) μέσω διαδοχικών μετρήσεων κάθε δύο μέρες στα τέσσερα αντιδιαμετρικά σημεία των σωλήνων σε διάστημα 28 ημερών (Philippoussis *et al.*, 2001, Zervakis *et al.*, 2001).

Πρωτότερα, τα υποστρώματα είχαν τοποθετηθεί σε κλίβανο στους 300°C για να ξηρανθούν και με τη χρήση στοιχειακού αναλυτή (Carlo Erba, EA 1108 Elemental analyzer) υπολογίστηκε ο λόγος άνθρακα προς άζωτο. Τέλος, με τη χρήση ζυγού προσδιορισμού υγρασίας (Mettler LP 16) μετρήθηκε η σχετική υγρασία που είχαν αποκτήσει τα στερεά υποστρώματα ύστερα από την διαβροχή τους.

5.2 Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού "σπόρου" για καλλιέργεια μανιταριών

ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Σιτάρι
- Ανθρακικό ασβέστιο CaCO_3 ή μαρμαρόσκονη
- Θεικό ασβέστιο, CaSO_4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αφού αξιολογήθηκε η μυκηλιακή ανάπτυξη στα στερεά υποστρώματα που εξετάστηκαν (Πίνακας 9) επιλέχθηκαν ορισμένα από αυτά, λόγω του ικανοποιητικού μυκηλιακού ρυθμού ανάπτυξής τους για την περαιτέρω αξιολόγηση τους στην παραγωγή μανιταριών. Ο εμβολιασμός των στερεών υποστρωμάτων για τη παραγωγή εδώδιμων μανιταριών προαπαιτεί την δημιουργία 'σπόρου' μύκητα, με την χρήση αποικισμένου σπόρου σιταριού από μυκήλιο που προέρχεται από επιλεγμένα στελέχη.

Η παρασκευή του σπόρου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 2lt. Αρχικά, το σιτάρι βράστηκε για 15 λεπτά και αφέθηκε άλλα 15 λεπτά εντός του βραστού νερού για να απορροφήσει περαιτέρω υγρασία. Έπειτα, αφαιρέθηκε η περίσσεια νερού και

αφού κρύωσε προστέθηκαν 4% CaCO₃ w/w και 2% CaSO₄ w/w. Στη συνέχεια, οι φιάλες πωματίστηκαν με βαμβάκι και αποστειρώθηκαν για μία ώρα στους 121⁰ C στις 1,2 Atm. Ακολούθησε εμβολιασμός με τμήματα μυκηλίου, από τα τρία υπό εξέταση στελέχη, που προήλθαν από τρυβλία PDA με ασηπτική τεχνική, εντός της τράπεζας νηματικής ροής. Ο "σπόρος" επώαστηκε στους 27⁰ C σε σκοτεινό θάλαμο για περίπου 20 ημέρες μέχρι το μυκήλιο να καλύψει πλήρως την επιφάνεια του σιταριού και ανά τακτά χρονικά διαστήματα οι φιάλες ανακινούνταν για την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων (Philippoussis *et al.*, 2001).

5.3 Καλλιέργεια μανιταριών

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πριονίδι οξιάς σε τεμαχίδια μικρού μεγέθους
- Άχυρο σίτου σε τεμαχίδια μεγέθους 1-3 cm
- Κλαδέματα ελιάς σε τεμαχίδια μεγέθους 1-3 cm
- Πίτουρο
- Διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου από την περιοχή της Μεσσηνίας το οποίο διατηρόταν σε ψυκτικό θάλαμο
- Ανθρακικό ασβέστιο –μαρμαρόσκονη για την ρύθμιση του pH

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αφού αξιολογήθηκε ο ρυθμός της μυκηλιακής ανάπτυξης στα διάφορα στερεά υποστρώματα, επιλέχθηκαν μερικά από αυτά για την περαιτέρω αξιολόγησή τους στη παραγωγή εδώδιμων μανιταριών. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν με τέσσερις επαναλήψεις ανά επέμβαση. Τέλος, αξιολογήθηκαν τα ίδια στελέχη μυκήτων, δηλαδή τα *Pleurotus ostreatus* IK 1123, *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 και *G. lucidum* VK-7400.

Πίνακας 10: Στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή εδώδιμων μανιταριών

<i>P. ostreatus</i>	Συντομογραφία	<i>Ganoderma lucidum</i>	Συντομογραφία
Άχυρο σίτου	WS	Πριονίδι οξιάς	BS
Άχυρο σίτου +25% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	WS+25% TPOMW	Πριονίδι οξιάς +25% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	B +25% TPOMW
Άχυρο σίτου +50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	WS+50% TPOMW	Πριονίδι οξιάς +50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	BS+50% TPOMW
Κλαδέματα ελιάς	OLPR	Πριονίδι οξιάς +25% κλαδέματα ελιάς	BS+25%OLPR
Άχυρο σίτου+25% κλαδέματα ελιάς	WS+25% OLPR	Πριονίδι οξιάς +50% κλαδέματα ελιάς	BS+50%OLPR
Άχυρο σίτου +50% κλαδέματα ελιάς	WS+50%OLPR	Πριονίδι οξιάς +75% κλαδέματα ελιάς	BS+75%OLPR
Άχυρο σίτου +75% κλαδέματα ελιάς	WS+75% OLPR		

Η καλλιέργεια των μανιταριών περιελάμβανε αρχικά, την παραμονή των τεμαχισμένων πρώτων υλών για 24 ώρες σε νερό βρύσης ώστε να αποκτήσουν περίπου 70% σχετική υγρασία. Ακολουθούσε η απομάκρυνση της περίσσειας του νερού και η ανάμειξη των υλικών με πίτουρο σε ποσοστό 5% για τα κλαδέματα ελιάς και το διφασικό απόβλητο, 10% για το άχυρο και 16,7% για το πριονίδι. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 1% CaCO_3 στα μείγματα των στερεών υποστρωμάτων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε αποστειρώσιμες πλαστικές σακούλες (1 kg υποστρώματος σε κάθε μια) και πωματίστηκαν με βαμβάκι. Ακολούθησε διπλή αποστείρωση των υποστρωμάτων στους 121°C , 1,1 Atm. για μία ώρα με τη χρήση αυτόκαυστου, με χρονικό διάστημα μεταξύ των αποστειρώσεων τουλάχιστον 12 ωρών. Αργότερα, όταν τα υποστρώματα κρύωσαν εμβολιάστηκαν ασηπτικά με 3-4% w/w 'σπόρο' σε τράπεζα νηματικής ροής και κλείστηκαν ερμητικά. Ακολούθησε η επώαση του μυκηλίου σε θάλαμο δίχως φως στους 27°C μέχρι τον πλήρη αποικισμό των υποστρωμάτων από το μυκήλιο. Μετά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με σχετική υγρασία 95-98%, φως, θερμοκρασία 18°C για το *Pleurotus ostreatus* και 23°C για τα δύο

στελέχη *Ganoderma lucidum* με στόχο τον σχηματισμό καρποφοριών (Gonzalez-Matute *et al.*, 2002).

Για την αξιολόγηση της καλλιεργητικής διαδικασίας στα διάφορα στερεά υποστρώματα καταγράφηκαν για την κάθε επανάληψη τα ακόλουθα: Η διάρκεια επώασης (δηλαδή το χρονικό διάστημα από την ημέρα του εμβολιασμού έως τη πλήρη αποικισμό του υποστρώματος με το μυκήλιο) το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την ημέρα εμβολιασμού μέχρι την ημέρα που σχηματίστηκε η πρώτη καταβολή καρποφορίας (πρωιμότητα), το συνολικό βάρος των παραχθέντων μανιταριών, ενώ τέλος υπολογίσθηκε η βιολογική αποδοτικότητα ως το επί τοις εκατό λόγο του βάρους των νωπών μανιταριών προς το ξηρό βάρος του αντίστοιχου υποστρώματος (Philippoussis *et al.*, 2001).

5.4 Ανάλυση σύστασης παραχθέντων μανιταριών

Η ανάλυση της σύστασης των παραχθέντων μανιταριών είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των χημικών και διατροφικών τους συστατικών και την πιθανή επιρροή τους από τα υποστρώματα που καλλιεργήθηκαν. Για την υλοποίηση της χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική τεχνική Weende η οποία επινοήθηκε από τους Henneberg and Stohmann (1860, 1864). Η τεχνική αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό των βιολογικών υλικών σε βασικές ομάδες θρεπτικών ουσιών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα μανιτάρια των δύο στελεχών *Ganoderma lucidum* που προήλθαν από το πείραμα της καλλιέργειας. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα είχαν καταψυχθεί στους -20°C , λυοφιλιοθεί (Telstar Cryodos) και κονιορτοποιηθεί. Οι ουσίες που προσδιορίστηκαν ήταν η τέφρα, τα ολικά λιπαρά, οι ολικές ινώδεις και οι ολικές πρωτεΐνες. Οι αναλύσεις των τριών πρώτων κατηγοριών ενώσεων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του ΓΠΑ.

5.4.1. Προσδιορισμός της τέφρας

Ο προσδιορισμός της τέφρας βασίζεται στην καύση της οργανικής ουσίας του δείγματος και τον προσδιορισμό της μέσω της διαφοράς βάρους από το αρχικό δείγμα. Αρχικά τοποθετήθηκαν ζεστές κάψες σε ξηραντήρα, ώστε να μην αποκτήσουν περαιτέρω υγρασία, όπου παρέμειναν για 20-30 λεπτά μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αριθμήθηκαν, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκε στο εσωτερικό τους 1 gr δείγματος. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η καύση του δείγματος με την χρήση αποτεφρωτήρα στους 550°C για 5 ώρες. Μόλις η θερμοκρασία του τελευταίου έπεσε σε ανεκτά επίπεδα τα δείγματα

τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος ζυγίστηκαν εκ νέου και υπολογίστηκε το βάρος της τέφρας σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$T(\text{gr}) = ((\text{Μεικτό βάρος κάψας μετά την αποτέφρωση} - \text{Βάρος κάψας}) * 100) / \text{βάρος δείγματος}$.

5.4.2. Προσδιορισμός λιπαρών ουσιών

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πετρελαϊκός αιθέρας καθαρότητας 30-60⁰

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ο προσδιορισμός των λιπαρών ουσιών βασίζεται στη μέθοδο Soxhlet κατά την οποία πραγματοποιείται εκχύλιση του δείγματος με οργανικό διαλύτη για την απομόνωση των διαλυτών υλών όπως το ακατέργαστο λίπος. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση ήταν η συσκευή 2055 Soxtec Avanti, πετρελαϊκός αιθέρας (30-60⁰), δαχτυλήθρες εκχύλισης και μεταλλικά δοχεία εκχύλισης.

Κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας προσδιορισμού τοποθετήθηκαν 0,5 gr δείγματος σε αριθμημένες δαχτυλήθρες εκχύλισης και πωματίστηκαν με βαμβάκι. Έπειτα τα ζεστά μεταλλικά δοχεία εκχύλισης τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, καταγράφηκε το βάρος τους και αριθμήθηκαν. Μόλις η θερμοκρασία της συσκευής εκχύλισης έφτασε στους 76⁰ C τοποθετήθηκαν τα μεταλλικά δοχεία εκχύλισης, τα οποία περιείχαν 55 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Στη συνέχεια, τα δείγματα εμβαπτίστηκαν εντός της συσκευής στο βραστό διαλύτη για να διαλυθεί όλο το λίπος. Έπειτα, το δείγμα ανήλθε πάνω από την επιφάνεια του διαλύτη για να επιτραπεί το ξέπλυμά του από τους συμπυκνωτές. Μετά την εκχύλιση και όταν ο διαλύτης εξατμίστηκε πλήρως τα δοχεία μεταφέρθηκαν σε φούρνο στους 80⁰ C περίπου 30 λεπτά για την ξήρανση τους. Τέλος, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και ζυγίστηκαν εκ νέου. Οι ολικές λιπαρές ουσίες υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$L.O (gr) = (((\text{Βάρος δοχείου λίπος}) - (\text{Βάρος δοχείου})) * 100) / \text{Βάρος δείγματος}$

5.4.3 Προσδιορισμός ινωδών ουσιών

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα αραιού θειικού οξέος συγκέντρωσης 0,255 N
- Διάλυμα αραιού καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0,313 N

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο προσδιορισμός της ανάλυσης των ινωδών ουσιών βασίστηκε στη διαλυτοποίηση και απομάκρυνση των μη κυτταρινούχων συστατικών των δειγμάτων προς ανάλυση με τη βοήθεια αραιών διαλυμάτων θειικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου.

Στην αρχή τοποθετήθηκαν σε αριθμημένα πλαστικά σακίδια (F57-F58 ANCOM) δείγματα βάρους 0,95 gr (w_1) και θερμοκολλήθηκαν (συσκευή θερμοκόλλησης, ANKOM). Πρέπει να επισημανθεί ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο κρίνεται απαραίτητη η χρήση ενός κενού σακιδίου για την διόρθωση των τυχών απωλειών (c_1). Ακολούθησε μία κυκλική διαδικασία ξεπλύματος με πετρελαϊκό αιθέρα καθαρότητας 30-60⁰, κατά την οποία τα σακίδια εμβαπτίζονταν σε αυτόν για δέκα λεπτά. Αφού απορρίπταμε τον αιθέρα, ανακινούσαμε τα σακίδια ώστε να μην προσκολληθεί σε ένα σημείο το δείγμα στο εσωτερικό τους και εμβαπτίζονταν εκ νέου σε αιθέρα για άλλα δέκα λεπτά. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Κατόπιν, τα σακίδια τοποθετήθηκαν σε ειδικό στατό και εντός του μηχανήματος ANKOM 200 το οποίο περιείχε 2 lt H₂SO₄ συγκεντρώσεως 0,255 N. Μετά το πέρας 45λέπτως θέρμανσης και ανάδευσης του υγρού εντός της συσκευής στους 100⁰ C ακολούθησε ξέπλυμα τρεις φορές με βραστό απιονισμένο νερό. Ύστερα εντός της συσκευής προστέθηκε διάλυμα 2 lt NaOH συγκεντρώσεως 0,313 N και ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ξήρανση των δειγμάτων σε κλίβανο για τουλάχιστον 8 ώρες. Στη συνέχεια, οι ζεστές κάψες και τα σακίδια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για 20 λεπτά. Μόλις απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου τόσο οι κάψες όσο και τα δείγματα ζυγίστηκαν, αριθμήθηκαν και στο εσωτερικό των καψών τοποθετήθηκε το αντίστοιχο σακίδιο. Τέλος ακολούθησε αποτέφρωση στους 600⁰ C για 2 ώρες, ενώ όταν η θερμοκρασία του αποτεφρωτήρα έπεσε σε χαμηλά επίπεδα οι κάψες τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για 20 λεπτά και ζυγίστηκαν εκ νέου. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ινωδών ουσιών είναι η παρακάτω:

$$\% \text{ινώδεις ουσίες} = 100 * (w_3 - (w_1 * C_1)) / w_2$$

Όπου w_1 : βάρος σακιδίου χωρίς δείγμα, w_2 : βάρος δείγματος, w_3 : απώλεια βάρους της οργανικής ύλης, C_1 : διόρθωση blank

5.4.4 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο στοιχειακός αναλυτής (Carlo Erba, EA 1108 Elemental analyzer) στον οποίο υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε άνθρακα και άζωτο. Ο υπολογισμός των ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τον

πολλαπλασιασμό της ποσοστιαίας περιεκτικότητας αζώτου των δειγμάτων με το δείκτη 4,38 (Kalac, 2009).

6. Πρεβιοτική δράση

Για τον προσδιορισμό της πιθανής πρεβιοτικής δράσης εξετάστηκαν μυκήλια που προήλθαν από υγρές καλλιέργειες μυκήτων (250 ml) σε φιάλες Erlenmeyer των 500 ml με θρεπτικό υπόστρωμα malt extract και καρποφορίες που προήλθαν από διάφορα στερεά υποστρώματα. Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται όλα τα είδη μυκήτων (προέρχονται από τη σχετική Συλλογή Καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ) από τα οποία παραλήφθηκαν μυκήλια και καρποφορίες που εξετάστηκαν ως προς την πιθανή πρεβιοτική δράση τους καθώς και το υπόστρωμα ανάπτυξης τους. Πρώτα μελετήθηκε η ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079 σε υγρή καλλιέργεια όπου περιείχε ως θρεπτικό υπόστρωμα De Man, Rogossa and Sharpe broth (MRS) δίχως γλυκόζη και 2% v/w μυκήλιο ή μανιτάρι σε σκόνη. Έπειτα επιλέχθηκαν για περαιτέρω εξέταση σε άλλους τρεις προβιοτικούς οργανισμούς (δηλ. ενός επιπλέον είδους του γένους *Lactobacillus* και δύο ειδών του γένους *Bifidobacterium*), δείγματα από καρποφορίες των *Pleurotus ostreatus* IK1123 και *Ganoderma lucidum* LGAM 9720, οι οποίες προέκυψαν μετά την καλλιέργεια των συγκεκριμένων ειδών σε διαφορετικά στερεά υποστρώματα.

Πίνακας 11: Μυκήλια και καρποφορίες που μελετήθηκαν για πιθανή πρεβιοτική δράση και το μέσο στο οποίο καλλιεργήθηκαν

Μυκήλια	Τύπος καλλιέργειας	Μανιτάρια	Υπόστρωμα καλλιέργειας
<i>Ganoderma carnosum</i> (GCL 448)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Pleurotus ostreatus</i> (P.ost)	Μίγμα γεωργικών υπολειμμάτων
<i>Tyromyces lacteus</i> (TLC 16)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Agrocybe cylindracea</i> στίπος (A.cyl)	Συλλογή από δάσος
<i>Ganoderma lucidum</i> (GRL 344)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Hericium erinaceus</i> (HE 4514)	Πριονίδι οξιάς
<i>Abortiporus biennis</i> (ABL 436)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Pleurotus ostreatus</i> (IK1123)	Άχυρο σίτου
<i>Daedalea quercina</i> (DQC 528)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Pleurotus ostreatus</i> (IK1123)	Μίγμα άχυρο σίτου με 50% διφασικό απόβλητο

Υλικά και μέθοδοι

			ελαιοτριβείου
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (P.cit)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Pleurotus ostreatus</i> (IK1123)	Μίγμα άχυρο σίτου με 50% κλαδέματα ελιάς
<i>Pleurotus eryngii</i> (P. er)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Ganoderma lucidum</i> (VK-7400)	Πριονίδι οξιάς
<i>Laetiporus sulfureus</i> (LSL 332)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Ganoderma lucidum</i> (LGAM 9720)	Πριονίδι οξιάς
<i>Pleurotus ostreatus</i> (P.os 67)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Ganoderma lucidum</i> (LGAM 9720)	Μίγμα με πριονίδι οξιάς και 50% διφασικό απόβλητο
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (PPL 111)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract	<i>Ganoderma lucidum</i> (LGAM 9720)	Μίγμα με πριονίδι οξιάς και 50% κλαδέματα ελιάς
<i>Hericium erinaceus</i> (HE 3001)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Hypsizigus ulmarius</i> (HUL 417)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Flammulina velutipes</i> (FV)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Lentinus lepideus</i> (LLL 317)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Lentinula edodes</i> (LEL 315)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Ganoderma lucidum</i> (VK-7400)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Ganoderma lucidum</i> (LGAM 720)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		
<i>Pleurotus ostreatus</i> (IK 1123)	Υγρή καλλιέργεια σε malt extract		

6.1 Καλλιέργεια *Lactobacillus acidophilus* και *L. gasseri*

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- De Man, Rogossa and Sharpe agar, MRS agar (LAB) (de Man *et al.*, 1960)
Σε κωνική φιάλη Erlenmeyer 2 λίτρων διαλύθηκαν 70gr MRS agar σε 1L απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύτηκε για δέκα λεπτά, πωματίστηκε η κωνική

φιάλη και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Αφού η θερμοκρασία του θρεπτικού διαλύματος έπεσε σε ανεκτά επίπεδα, κατανεμήθηκε σε τρυβλία petri διαμέτρου 90 mm εντός της τράπεζας νηματικής ροής.

- De Man, Rogossa and Sharpe broth, MRS broth (LAB)

Σε κωνική φιάλη Erlenmeyer ενός λίτρου διαλυτοποιήθηκαν 55 gr MRS broth σε 1 lt απιονισμένου νερού όπως ορίζει ο κατασκευαστής. Αφού πραγματοποιήθηκε δεκάλεπτη ανάδευση και θέρμανση για την πλήρη διαλυτοποίηση των στερεών, το θρεπτικό διάλυμα κατανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 5 ml με την χρήση πίπετας όγκου 5 ml. Οι σωλήνες πωματίστηκαν και αποστειρώθηκαν με τη χρήση αυτόκαυστου στους 121°C για 15 λεπτά.

- MRS broth δίχως γλυκόζη

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MRS δίχως τη προσθήκη γλυκόζης σε 1lt απιονισμένο νερό προστέθηκαν τα κάτωθι:

- 10 gr Bacteriological peptone (LAB)
- 8 gr Bacteriological extract of meat (Merck)
- 4 gr Yeast extract granulated (Merck)
- 1 ml Tween 80 (Panreac sintesis)
- 2 gr d-potassium hydrogen phosphate anhydrous (Panreac sintesis)
- 3,01 gr Sodium acetate (Merck)
- 1,859 gr Ammonium citrate dibase (Sigma)
- 0,03789 gr Manganese sulfate (Analar)
- 0,2 gr Magnesium sulfate $7\text{H}_2\text{O}$

Αφού τα υλικά διαλυτοποιήθηκαν πλήρως, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή $6,2\pm 0,2$ με τη χρήση HCl συγκέντρωσης 1 N. Έπειτα το θρεπτικό διάλυμα διανεμήθηκε ανά 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι πωματίστηκαν και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.

- Peptone Physiological Saline (PPS)

Για την παρασκευή του ισοτονικού διαλύματος PPS προστέθηκαν 1gr Bacteriological peptone (LAB) και 8,5 gr NaCl (Himedia) σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό. Το διάλυμα κατανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 και 9,9 ml και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121°C , 1,2 Atm για 15 λεπτά με τη χρήση αυτόκαυστου (Joffraud *et al.*, 2001).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε αρχικά μελετήθηκαν δείγματα από τα μυκήλια και τα μανιτάρια που αναγράφονται στο Πίνακα 11 ως θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης, για την 48ώρη καλλιέργεια του πρότυπου προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079, της συλλογής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Πρώτα πραγματοποιήθηκε αναβίωση του βακτηρίου από καλλιέργειες σε γλυκερόλη στους -80°C σε τρυβλίο MRS agar και ακολούθησε 48ωρη αναερόβια επώαση στους 37°C . Έπειτα διενεργήθηκαν δύο ενεργοποιήσεις του βακτηρίου σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου περιείχαν 5 ml MRS broth και επώαστηκαν για 48 ώρες στους 27°C σε αναερόβιο θάλαμο επώασης. Ως θετικός μάρτυρας στη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth ενώ ως αρνητικός το MRS broth δίχως γλυκόζη και για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Αρχικά, προστέθηκαν (ασηπτικώς εντός της τράπεζας νηματικής ροής) 0,1 gr λυοφιλοποιημένου μυκηλίου ή μανιταριού σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml MRS broth δίχως γλυκόζη και έπειτα εμβολιάστηκαν με 50 μL από την ενεργοποιημένη καλλιέργεια του βακτηρίου. Ακολούθησε επώαση των δοκιμαστικών σωλήνων στους 37°C για 48 ώρες σε θάλαμο αναερόβιας επώασης (Bactron 1,5, SHELLAB), κατά την οποία παραλήφθηκε δείγμα μεγέθους 100 μL σε 0, 24 και 48 ώρες. Στη συνέχεια, ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9,9 ml και 9 ml διαλύματος PPS. Αφού επιλέχθηκαν οι τρεις κατάλληλες αραιώσεις ανά επέμβαση, εμβολιάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα MRS σε τρυβλία με 100 μL διαλύματος και επιστρώθηκαν με την χρήση αποστειρωμένης υάλινης κεκλιμένης ράβδου. Μετά το πέρας 48 ωρών αναερόβιας επώασης στους 37°C καταγράφηκε ο αριθμός αποικιών που σχηματίστηκε ανά αραιώση.

Οι καρποφορίες του *Pleurotus ostreatus* οι οποίες είχαν προέλθει από το πείραμα της καλλιέργειας και είχαν αναπτυχθεί στα στερεά υποστρώματα από άχυρο σίτου, άχυρο σίτου με 50% διφασικό απόβλητο και άχυρο σίτου με 50% κλαδέματα ελιάς, καθώς και του *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε πριονίδι, πριονίδι με 50% διφασικό απόβλητο και πριονίδι με 50% κλαδέματα ελιάς, μελετήθηκαν περαιτέρω στην καλλιέργεια του *Lactobacillus gasseri*. Αυτό το στέλεχος αποτελεί μέρος της συλλογής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών και προήλθε από απομόνωση από εντερική μικροχλωρίδα τελειόμηνων βρεφών μέσω ταυτοποίησης με την τεχνική της μοριακής αλληλούχησης γονιδίων. Η πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

6.2 Καλλιέργεια *Bifidobacterium bifidum* και *B. longum*

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Τροποποιημένο De Man, Rogossa and Sharpe agar, mMRS agar (De Man *et al.*, 1960)

Σε κωνική φιάλη Erlenmeyer 2 λίτρων διαλύθηκαν 70 gr MRS agar (LAB) και 0,05% υδροχλωρική κυστεΐνη (Applichem) σε 1 lt απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύτηκε για δέκα λεπτά, πωματίστηκε η κωνική φιάλη και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121⁰ C για 15 λεπτά. Αφού η θερμοκρασία του θρεπτικού διαλύματος έπεσε σε ανεκτά επίπεδα, κατανεμήθηκε σε τρυβλία petri διαμέτρου 90mm εντός της τράπεζας νηματικής ροής.

- Τροποποιημένο De Man, Rogossa and Sharpe broth, mMRS broth με προσθήκη αντιβιοτικού

Σε κωνική φιάλη Erlenmeyer ενός λίτρου διαλυτοποιήθηκαν 55 gr MRS broth (LAB) και 0,5571 gr ένυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη (Applichem) (0,05% υδροχλωρική κυστεΐνη) σε 1 lt απιονισμένου νερού. Αφού πραγματοποιήθηκε δεκάλεπτη ανάδευση και θέρμανση για την πλήρη διαλυτοποίηση των στερεών, το θρεπτικό διάλυμα κατανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 5 ml με την χρήση πίπετας όγκου 5 ml. Οι σωλήνες πωματίστηκαν και αποστειρώθηκαν με τη χρήση αυτόκαυστου στους 121⁰ C για 15 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία ήταν 45⁰ C προστέθηκε Gentamicin σε συγκέντρωση 4 mg/lt.

- mMRS broth δίχως γλυκόζη με προσθήκη αντιβιοτικού

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος MRS δίχως τη προσθήκη γλυκόζης σε 1lt απιονισμένο νερό προστέθηκαν τα κάτωθι:

- 10 gr Bacteriological peptone (LAB)
- 8 gr Bacteriological extract of meat (Merck)
- 4 gr Yeast extract granulated (Merck)
- 1 ml Tween 80 (Panreac sintesis)
- 2 gr d-potassium hydrogen phosphate anhydrous (Panreac sintesis)
- 3,01 gr Sodium acetate (Merck)
- 1,859 gr Ammonium citrate dibase (Sigma)
- 0,03789 gr Manganese sulfate (Analar)
- 0,2 gr Magnesium sulfate 7H₂O
- 0,5571 gr ένυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη (Applichem)

Αφού τα υλικά διαλυτοποιήθηκαν πλήρως, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή $6,2 \pm 0,2$ με τη χρήση HCl συγκέντρωσης 1 N. Έπειτα το θρεπτικό διάλυμα διανεμήθηκε ανά 5 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι πωματίστηκαν και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Τέλος όταν η θερμοκρασία έπεσε στους 45°C προστέθηκε Gentamicin σε συγκέντρωση 4 mg/Lt.

- Peptone Physiological Saline (PPS)

Για την παρασκευή του ισοτονικού διαλύματος PPS προστέθηκαν 1 gr Bacteriological peptone (LAB) και 8,5 gr NaCl (Himedia) σε ένα λίτρο απιονισμένο νερό. Το διάλυμα κατανεμήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 και 9,9 ml και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121°C , 1,2 Atm για 15 λεπτά με τη χρήση αυτόκαυστου (Joffraud *et al.*, 2001).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τα μανιτάρια που μελετήθηκαν όσον αφορά στην επίδραση τους στα δύο είδη του γένους *Bifidobacterium* είναι τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν και στην καλλιέργεια του *Lactobacillus gasserii*. Παρόμοια ήταν η πειραματική διαδικασία με κάποιες μικρές τροποποιήσεις. Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας του πειράματος θεωρήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 5 ml mMRS broth με προσθήκη του αντιβιοτικού Gentamicin συγκέντρωσης 4 mg/Lt και mMRS δίχως γλυκόζη με Gentamicin αντίστοιχα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναβίωση του πρότυπου στελέχους από το εργαστήριο Μικροβιολογίας του Χαρακόπειου Πανεπιστημίου, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20456, σε τρυβλίο petri με θρεπτικό υπόστρωμα mMRS agar. Η καλλιέργεια επώαστηκε σε αναερόβιο θάλαμο για 72 ώρες στους 37°C . Έπειτα ακολούθησε ενεργοποίηση του μικροοργανισμού με τον εμβολιασμό του σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου περιείχαν 5 ml mMRS (LAB) με 4 mg/Lt Gentamicin (D'Aimmo, 2007), και επώαστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε άλλη μία ενεργοποίηση πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 5 ml mMRS+Gentamicin και επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο εμβολιασμός δοκιμαστικών σωλήνων, που περιείχαν 5 ml mMRS δίχως γλυκόζη, με 0,1 gr λυοφιλοποιημένου μανιταριού και 50 μL από τη καλλιέργεια του βακτηρίου. Έπειτα επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες σε θάλαμο αναερόβιας επώασης (Bactron 1,5, SHELLAB) κατά την οποία παραλήφθηκε δείγμα 100 μL στις 0, 24 και 48 ώρες. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9,9 και 9 ml διαλύματος PPS. Αφού επιλέχθηκαν οι

τρεις κατάλληλες αραιώσεις ανά επέμβαση, τρυβλία petri διαμέτρου 90 mm με θρεπτικό υπόστρωμα mMRS εμβολιάστηκαν με 100 μ l διαλύματος και επιστρώθηκαν με την χρήση αποστειρωμένης υάλινης κεκλιμένης ράβδου. Μετά το πέρας των 72 ωρών αναερόβιας επώασης των τριβλίων στους 37⁰ C καταγράφηκε ο αριθμός αποικιών ανά αραιώση.

Τα στελέχη που μελετήθηκαν και η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την καλλιέργεια του *Bifidobacterium longum* ήταν ίδια με αυτά του *B. bifidum*. Η μοναδική τροποποίηση στην πειραματική διαδικασία ήταν η αλλαγή του χρόνου επώασης των ενεργοποιήσεων από τις 72 στις 48 ώρες. Το *B. longum* αποτελεί μέρος της συλλογής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, όπως και τα υπόλοιπα στελέχη και προήλθε από απομόνωση από εντερική μικροχλωρίδα τελειόμηνων βρεφών μέσω ταυτοποίησης με την τεχνική της μοριακής αλληλούχισης γονιδίων.

7. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS 19. Για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kolmogorov-Smirnov σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Για τη σύγκριση των μέσων τιμών δύο επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκε το απλό t-test ανεξάρτητων μεταβλητών. Για τις συγκρίσεις των μέσων τιμών μεγαλύτερου αριθμού επεμβάσεων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ANOVA και τα κριτήρια Duncan όταν υπήρχαν ίσες διασπορές μεταξύ των πληθυσμών. Ο έλεγχος Welch και το κριτήριο Games Howell χρησιμοποιήθηκε όταν οι πληθυσμοί εντός των ίδιων επεμβάσεων παρουσίαζαν άνισες διασπορές.

Αποτελέσματα και συζήτηση

8. Καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα

8.1 Προσδιορισμός pH, ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ξηρής βιομάζας και αποχρωματισμού

Ύστερα από τον προσδιορισμό του pH, της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της ξηρής βιομάζας και του βαθμού αποχρωματισμού, όπως αυτά περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι, ακολούθησε η στατιστική τους ανάλυση όπου κρίθηκε απαραίτητη.

Τα αποτελέσματα από τη παραγωγή μυκηλίου των τριών στελεχών που μελετήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις YAE παρουσιάζονται στον Πίνακα 12, που ακολουθεί

Πίνακας 12: Ξηρή βιομάζα μυκηλίων (mg) ύστερα από επώαση 42 ημερών στους 27°C στο σκοτάδι σε διάφορα υγρά υποστρώματα

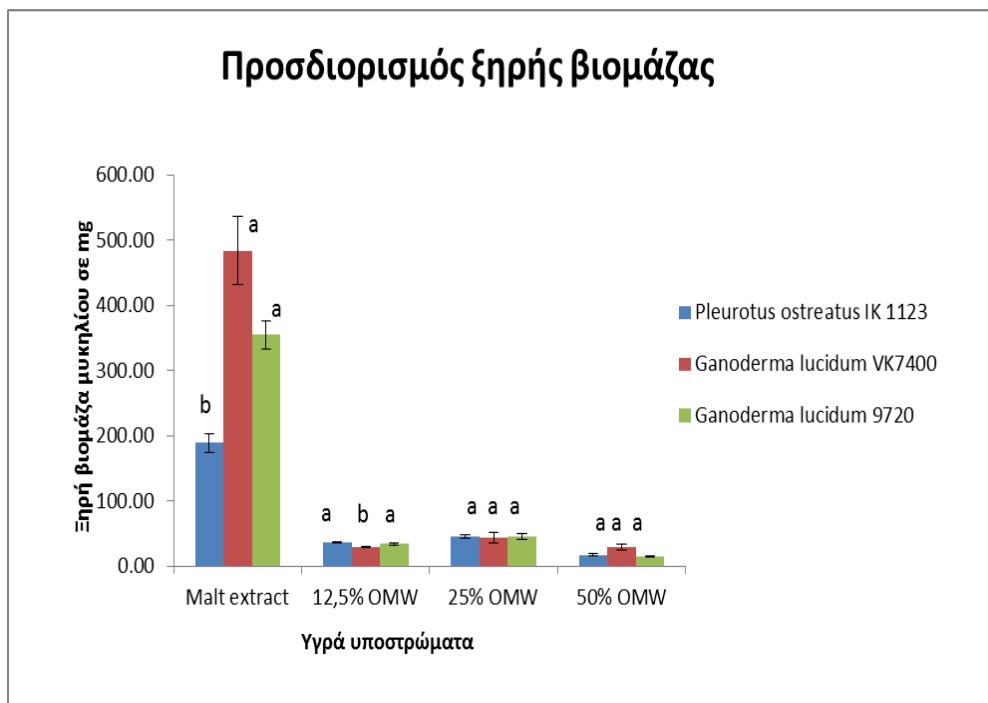
Μύκητας	Malt extract	12,5% OMW	25% OMW	50% OMW
<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	188,9± 14,7 a,B	36,1±1,0 b,A	44,9±2,7 b,A	17,6±1,6 c,A
<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	483,9±52,5 a,A	28,7±0,8 b,B	43,4±7,9 b,A	30,2±4,5b,A
<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	354,5±22,4 a,A	34,0±1,8 b,A	45,7±4,1 b,A	14,9±1,2 c,A

* Διαφορετικά πεζά γράμματα στη γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά υγρά υποστρώματα (p=0,05).

** Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα ανάπτυξης (p=0,05).

Όπως ήταν αναμενόμενο, το σύννηθες θρεπτικό υπόστρωμα (malt extract) ανάπτυξης τους παρουσίασε την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας, η οποία διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τις επεμβάσεις όπου περιείχαν απόβλητο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρατηρείται στις επεμβάσεις με 25% υγρό απόβλητο τριφασικού ελαιοτριβείου (YAE), όπου σημειώνεται αύξηση της ξηρής βιομάζας από το 12,5%, δίχως όμως να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Ακόμη, τα YAE σε συγκέντρωση 50% φαίνεται ότι ήταν ιδιαίτερα τοξικά για την ανάπτυξη των μυκηλίων, η οποία ήταν πολύ μικρή έως αμελητέα. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας εμφάνισε το *G.lucidum* VK-7400 στο malt extract, χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές διαφορές με τα υπόλοιπα στελέχη μυκήτων. Στα υποστρώματα με YAE όλα τα στελέχη εμφάνισαν παρόμοιες αποδόσεις. Η ξηρή βιομάζα που παρήχθη στα συγγενή είδη *G. australe* και *G. carnosum* σε υγρές καλλιέργειες με 25% YAE ήταν κατά 50% περίπου υψηλότερη. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το *P.*

ostreatus (Ntougias *et al.*, 2012). Τέλος, περίπου 0,5 gr/50 ml καλλιέργειας καταγράφηκαν σε άλλο στέλεχος του *P. ostreatus* έπειτα από 6 ημέρες επώασης σε ΥΑΕ δίχως αραίωση (Yesilada *et al.*, 1999).



Διάγραμμα 1: Βάρος ξηρής βιομάζας σε gr των *G.lucidum* VK-7400, *G. lucidum* LGAM 9720 και *P. ostreatus* ύστερα από 42 ημέρες ανάπτυξης του μυκηλίου τους σε διαφορετικά υγρά υποστρώματα

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση του pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας μετά το πέρας των υγρών καλλιεργειών (42 ημέρες) στα διαφορετικά υγρά υποστρώματα.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 13: Αποτελέσματα προσδιορισμού pH και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του υγρού υποστρώματος πριν και μετά τον αποικισμό του από τους μύκητες

Επέμβαση	Στέλεχος μύκητα	pH	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)
12.5% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	5,7±0,04	2,37±0,04a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	4,5±0	2,26±0a
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	4,97±0,09	2,11±0,02b
	Αρχικό δείγμα	5,5±0	2,06±0,02b
25% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	5,45±0,03	4,63±0,09a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	4,85±0,03	4,34±0,07b
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	4,9±0,04	4,14±0,08b
	Αρχικό δείγμα	5,5±0	4,12±0,06b
50% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	5,1±0	8,30±0,07a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	5±0	8,02±0,11b
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	5±0	8,16±0,07a,b
	Αρχικό δείγμα	5,5±0	6,9±0,07c

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη και το αρχικό δείγμα σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0,05$

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση του pH σε όλες τις επεμβάσεις και τα στελέχη από την αρχική τιμή του 5,5 όπου είχε ρυθμιστεί. Αντίθετα, η ανάπτυξη του *P. ostreatus* στην επέμβαση με συγκέντρωση 12,5% OMW αύξησε ελαφρά τη τιμή του pH του υποστρώματος.

Τα αποτελέσματα τόσο για το pH όσο και για την ηλεκτρική αγωγιμότητα έρχονται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την έρευνα στα συγγενή είδη του *Ganoderma* spp. και σε διαφορετικό στέλεχος του *P. ostreatus* από τους Ntougias *et al.* (2012). Έτσι το *P. ostreatus*, το *P. eryngii* και το *G. australe* αύξησαν το pH και μείωσαν την ηλεκτρική αγωγιμότητα του υπερκειμένου καλλιέργειας με 25% YAE έπειτα από 30 ημέρες. Επίσης, το *G. carnosum* μείωσε το pH του υπερκειμένου, όπως συνέβη και με τα στελέχη του *G. lucidum* στην παρούσα εργασία αλλά μείωσε παράλληλα και την ηλεκτρική αγωγιμότητα (Ntougias *et al.*, 2012). Αντίστοιχη αύξηση στις τιμές του pH έχουν καταγραφεί και στην καλλιέργεια του *P. Sajor-caju* μετά από 15 ημέρες επώασης σε υγρές καλλιέργειες YAE 3 ημερών (Yesilada *et al.*, 1999).

Και τα τρία στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με τις μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο στα 525nm, έδειξαν περίπου τον ίδιο βαθμό έντασης χρώματος του αποβλήτου στις συγκεντρώσεις 12,5% και 25% OMW. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση αυξήθηκε στο 50% OMW παρατηρήθηκε ότι το *G. lucidum* LGAM 9720 εμφάνισε τον υψηλότερο βαθμό αποχρωματισμού, της τάξεως του 32,5% (Πίνακας 14), το οποίο διέφερε σημαντικά από το αρχικό δείγμα όμως όχι και από τους υπολοίπους μύκητες. Την υψηλότερη ποσοστιαία μεταβολή στο χρώμα την παρουσίασε το *P.ostreatus* σε ποσοστό 51% στην επέμβαση με 12,5% OMW. Υψηλότερη μείωση χρώματος καταγράφηκε σε άλλα στελέχη *P. ostreatus*, *G. applanatum* και στο *P. sajor-caju* ενώ παρόμοια ποσοστά μείωσης παρατηρήθηκαν για τα συγγενή είδη του *Ganoderma* spp. (Matos, 2007, Ntougias *et al.*, 2012, Yesilada *et al.*, 1999).

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 14: Αποτελέσματα προσδιορισμού έντασης χρώματος, αποχρωματισμού, ολικού φαινολικού φορτίου, της μεταβολής του ολικού φαινολικού φορτίου κατι του δείκτη βλαστικότητα του υγρού υποστρώματος πριν και μετά τον αποικισμό του από τους μύκητες.

Επέμβαση	Στέλεχος μύκητα	Ένταση χρώματος	Μείωση χρώματος %	Ολικό φαινολικό φορτίο (mgr συριγγικού οξέος / ml νερού)	Μείωση ολικού φαινολικού φορτίου %	Δείκτης βλαστικότητας GI%
12.5% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	0,13±0b	51±0,27	1408,24±11,53d	36,47±0,52	89,07±2,21a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	0,13±0b	50,29±0,39	1716,45±39,53b,c	23,44±1,78	84,06±4,29a
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	0,13±0b	50,68±1,13	1774,52±196,27a,b,c,d	19,95±4,43	69,76±4,51b
	Αρχικό δείγμα	0,26±0a		2216,73±53,60a		53,94±5,16c
25% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	0,22±0c	48,94±0,61	1810,25±78,90b	46,41±2,34	48,21±6,07a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	0,22±0c	46,59±0,76	1726,87±39,05b	47,73±1,16	19,47±4,42b
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	0,23±0,02c	44,47±2,45	1917,45±120,30b	43,24±1,78	44,88±6,47a
	Αρχικό δείγμα	0,41±0,01a		3378,08±89,34a		23,00±1,18b
50% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	0,62±0,07b,c	30,89±8,06	4627,28±58,66b	8,59±1,16	0a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	5050,13±95,85a	19,41±2,73	5050,13±95,85a	2,12±1,89	0a
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	5084,38±326,65a	36,2±1,72	5084,38±326,65a	2,47±1,96	0a
	Αρχικό δείγμα	5062,05±456,69a		5062,05±456,69a		0a

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη και το αρχικό δείγμα σε επίπεδο σημαντικότητας p=0,05

8.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου

Με τη χρήση των μυκήτων επιτεύχθηκε η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου σε όλες τις συγκεντρώσεις ΥΑΕ εκτός από το 50% OMW, η οποία πιθανόν να οφείλεται στη μικρή ανάπτυξη του μυκηλίου. Ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης συριγγικού οξέος.

Το *P. ostreatus* παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου στις επεμβάσεις με 12,5% και 50% OMW του υγρού αποβλήτου (Πίνακας 14). Παρατηρήθηκε επίσης ότι και τα τρία υπό μελέτη στελέχη μείωσαν σχεδόν κατά το ήμισυ το ολικό φαινολικό φορτίο στην επέμβαση με 25% OMW και διέφεραν, σημαντικά από το αρχικό δείγμα. Τέλος, τα στελέχη του *Ganoderma lucidum* μείωσαν μόλις κατά 2% το μέγεθος του ολικού φαινολικού φορτίου στο υπόστρωμα με 50% OMW.

Υψηλά ποσοστά μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου καταγράφηκαν για το *P. sajor-caju* και πιο συγκεκριμένα της τάξεως του 60%, από την ερευνητική ομάδα των Yesilada και συνεργατών (1999), ενώ οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα *P. ostreatus* και *P. chrysosporium* μείωσαν τα ολικά φαινολικά από 35-45% έπειτα από 6 ημέρες επώασης σε απόβλητο δίχως αραίωση (Yesilada et al., 1999). Επίσης, υψηλότερα ποσοστά μείωσης καταγράφηκαν από τους Ntougias et al. (2012) με 25% ΥΑΕ στα είδη *P.ostreatus*, *P. eryngii* (περίπου 60%) και στα *G. carnosum* και *G. australe* (περίπου 55-60%) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Ακόμη, οι παραπάνω διαπίστωσαν ότι το *P. ostreatus* μειώνει περισσότερο την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων σε υγρές καλλιέργειες με 25% ΥΑΕ. Το οποίο έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην οποία παρατηρείται ότι σε 25% ΥΑΕ το *G. lucidum* VK-7400 αποδίδει καλύτερα. Επιπλέον, το είδος *G. applanatum* μείωσε κατά 94% το ολικό φαινολικό φορτίο σε υγρές καλλιέργειες με 20% ΥΑΕ (Matos et al., 2007). Τέλος, το *P. ostreatus* ATCC 34675 μείωσε κατά 74% το ολικό φαινολικό φορτίο σε υγρές καλλιέργειες με 75% ΥΑΕ έπειτα από 20 ημέρες επώασης (Tsioulpas et al., 2002).

8.3 Προσδιορισμός φυτοτοξικότητας

Ο προσδιορισμός του βαθμού φυτοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε με την χρήση δείκτη βλαστικότητας GI% (Πίνακας 14). Ενώ στη συγκέντρωση με 12,5% ΥΑΕ παρατηρείται μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου με παράλληλη αύξηση του δείκτη βλαστικότητας, στην επέμβαση με 25% ΥΑΕ δεν παρατηρείται το ίδιο.

Ο δείκτης βλαστικότητα πήρε τη τιμή του 89% στην επέμβαση 12,5% OMW με το *P.ostreatus* και 84,06% με το *G.lucidum* VK-7400 (*G. l.* VK-7400) και διέφερε σημαντικά με το *G. lucidum* LGAM 9720 (*G. l.* 9720). Στο τελευταίο, παρόλο που ήταν σχετικά πιο χαμηλό το ποσοστό βλαστικότητα, παρουσίασε σημαντικές διαφορές με το αρχικό δείγμα. Αντίθετα, στην επέμβαση με 25% OMW το στέλεχος *G.l* 9720 εμφάνισε εξίσου υψηλά ποσοστά με το *P. ostreatus*, ενώ το *G. l.* VK-7400 είχε πολύ χαμηλά ποσοστά και κυμάνθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα με το αρχικό δείγμα. Τέλος, πιθανόν λόγω της μικρής ανάπτυξης του μυκηλίου και της μηδαμινής σχεδόν μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου, κανένας σπόρος δεν κατάφερε να βλαστήσει με συγκέντρωση 50% YAE στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

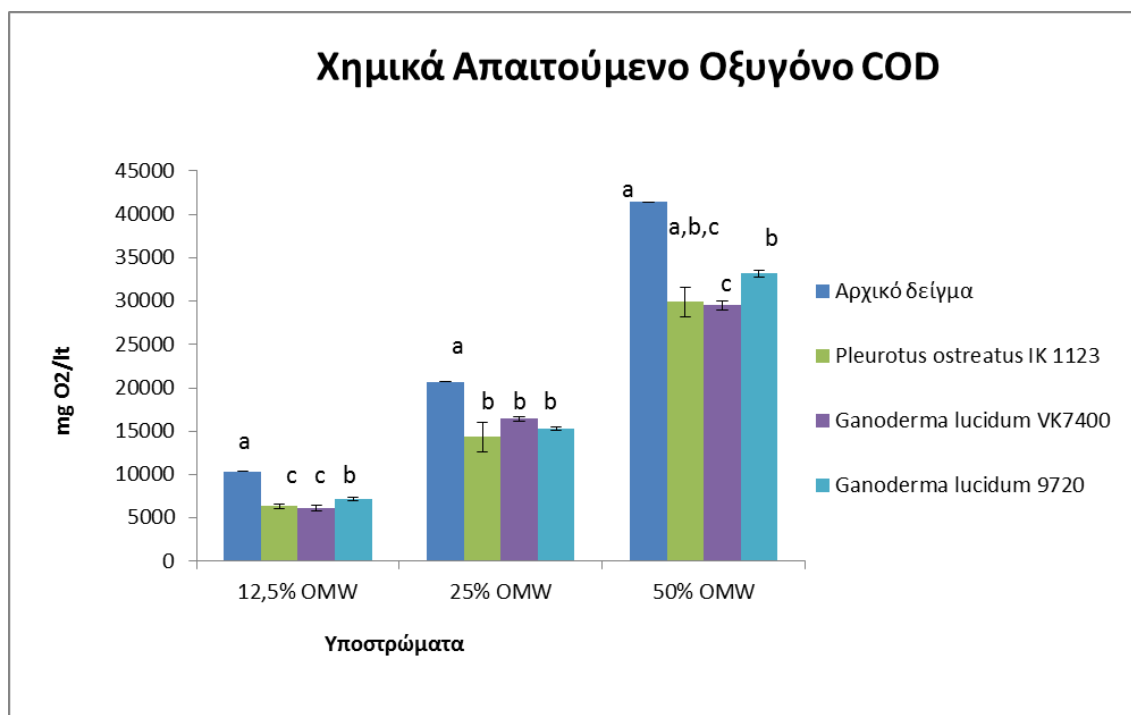
Αντίθετα, με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας σε άλλα στελέχη του *P. ostreatus* παρατηρήθηκε 27% βλαστικότητα σε υγρή καλλιέργεια με 75% YAE και 80% σε συγκέντρωση 25% YAE (Ntougias *et al.*, 2012, Tsioulpas *et al.*, 2002). Τα δύο στελέχη *Ganoderma lucidum* που μελετήθηκαν παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική συμπεριφορά και ιδιαίτερα στη συγκέντρωση με 25% YAE. Επίσης, παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά βλαστικότητα ανάμεσα στο *G. lucidum* LGAM 9720 με το *G. carnosum*, και στο *G. lucidum* VK-7400 με το *G. australe* (Ntougias *et al.*, 2012). Τέλος, σε μελέτες έχει επισημανθεί ότι η τοξικότητα των YAE οφείλεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά του (Tsioulpas *et al.*, 2002, Ntougias *et al.*, 2012).

8.4 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο αποτελεί μία έμμεση μέτρηση της ποσότητας των οργανικών ενώσεων που εμπεριέχονται στο απόβλητο. Αποτελεί τη ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την χημική οξείδωση των οργανικών ενώσεων σε έντονα οξειδωτικό περιβάλλον και τη μετατροπή τους σε ανόργανα παράγωγα.

Παρατηρώντας το *Διάγραμμα 2* μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι οι μύκητες μείωσαν το COD, όπως αναμενόταν. Πιο συγκεκριμένα, στις επεμβάσεις με συγκεντρώσεις 12,5% και 50% OMW παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη μείωση την προκάλεσε το *G. lucidum* VK-7400 και έπεται το *P. ostreatus*, τα οποία διαφέρουν σημαντικά από το *G. lucidum* LGAM 9720. Διαφορετικά αποτελέσματα παρατηρούνται στη συγκέντρωση 25% OMW όπου κανένα στέλεχος δεν διαφέρει σημαντικά από τα υπόλοιπα. Την μεγαλύτερη μείωση τη προκάλεσε το *P. ostreatus* το οποίο συμφωνεί με την παράλληλη αύξηση της βλαστικότητα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το *P. ostreatus* μείωσε περίπου κατά 30% το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο σε καλλιέργειες με υπόστρωμα 100% ΥΑΕ, μετά από έξι ημέρες επώασης (Yesilada *et al.*, 1999). Ενώ στην παρούσα εργασία παρατηρείται ότι το *P. ostreatus* κατόρθωσε να μειώσει περίπου το ίδιο το οργανικό φορτίο αλλά όταν αναπτύσσεται σε 25% ΥΑΕ, έπειτα από 42 ημέρες επώασης. Επίσης, σε αντιπαράθεση έρχονται τα αποτελέσματα των Ntougias *et al.* (2012), όπου το *Ganoderma australe* παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης ανάμεσα στα *G. carnosum*, *P. ostreatus* και *P. eryngii*. Ακόμη, σε σύγκριση με τα δύο στελέχη *Ganoderma lucidum*, σε άλλη μελέτη καταγράφηκε ότι το *G. australe* έχει παρόμοια ποσοστά μείωσης με τα στελέχη της παρούσας μελέτης ενώ στο *G. carnosum* παρατηρούνται πολύ χαμηλότερα. Τέλος, σύμφωνα με τους Matos *et al.* (2007) το συγγενικό είδος *G. applanatum* μείωσε κατά 57% το οργανικό φορτίο σε καλλιέργεια με υπόστρωμα 20% συγκέντρωση ΥΑΕ.



Διάγραμμα 2: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνου υγρού αποβλήτου τριφασικού ελαιοτριβείου πριν και μετά την επεξεργασία του με τρία στελέχη μυκήτων

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

*Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές επιπέδου σημαντικότητας $p=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη στην ίδια αραίωση αποβλήτου

8.5 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμων

Η ενεργότητα των ενζύμων που τελικώς προσδιορίστηκε ήταν της λακκάσης, της υπεροξειδάσης ανεξάρτητης και εξαρτημένης μαγγανίου, διότι η οξειδάση της βερατρυλικής

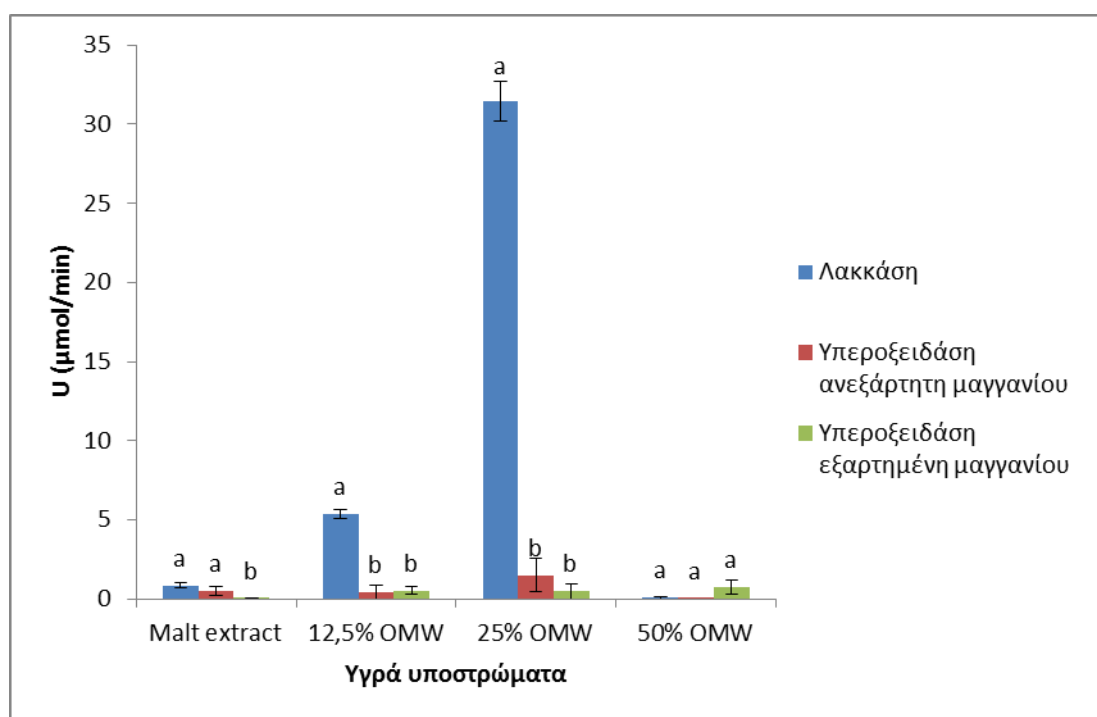
αλκοόλης και η υπεροξειδάση της λιγνίνης παρουσίασαν μηδενική ενεργότητα σε όλα τα στελέχη και σε όλες τις επεμβάσεις.

Η ενεργότητα της λακκάσης όταν τα μυκήλια αναπτύχθηκαν σε malt extract ήταν σχεδόν μηδενική, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς σε αυτό το υπόστρωμα δεν επάγεται η λειτουργία του ενζύμου. Το *P. ostreatus* παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα η οποία φθάνει το 31,43 (μmol/min) όταν αναπτύσσεται σε συγκέντρωση 25% OMW και διαφέρει σημαντικά από αυτή των άλλων δυο στελεχών αλλά και σε σύγκριση με τα άλλα δύο ένζυμα (Πίνακας 15, Διάγραμμα 3). Αντίθετα, στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση YAE (12,5%) το *G. lucidum* VK-7400 παρατηρείται ότι έχει την υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης αλλά χωρίς να διαφέρει στατιστικά από αυτή του *P. ostreatus*, η οποία είναι λίγο χαμηλότερη (Διάγραμμα 4). Τέλος, το *G. lucidum* VK-7400 πιθανότατα λόγω και της υψηλής μυκηλιακής ανάπτυξης σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη στο 50% OMW, παρουσιάζει και την υψηλότερη ενεργότητα σε αυτή την επέμβαση ενώ για τα άλλα δύο στελέχη είναι σχεδόν μηδενική.

Η υπεροξειδάση, ανεξάρτητη και εξαρτημένη μαγγανίου, εμφανίζει τιμές οι οποίες κυμαίνονται από 0-0,01 (μmol/min) και 0-0,03 (μmol/min) αντίστοιχα για τα δυο *G. lucidum* που αναπτύχθηκαν σε malt extract, ενώ λίγο πιο υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν από το *P. ostreatus*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η εντελώς διαφορετική συμπεριφορά των στελεχών του *G. lucidum*. Ενώ στη συγκέντρωση 12,5% OMW το *G. lucidum* VK-7400 και στα δύο ένζυμα εμφανίζει μηδενική ενεργότητα, στη 50% OMW παρουσιάζει την υψηλότερη, της τάξεως του 2,75 (μmol/min) (Διάγραμμα 4). Ακόμη, στην επέμβαση με 12,5% OMW η υψηλότερη ενεργότητα στην ανεξάρτητη υπεροξειδάση μαγγανίου παρατηρείται από το *P. ostreatus* και στην εξαρτημένη από το *G. lucidum* LGAM 9720 με στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Διάγραμμα 5). Τέλος, μόλις 1,55 (μmol/min) είναι η ενεργότητα της εξαρτημένης υπεροξειδάσης μαγγανίου του *G. lucidum* LGAM 9720 στην επέμβαση με 25% OMW, αλλά λόγω των χαμηλών τιμών των άλλων δύο στελεχών διαφέρει στατιστικώς σημαντικά.

Η σύνθεση της λακκάσης προάγεται από κάποιες περιεχόμενες φαινολικές ενώσεις των υγρών αποβλήτων ελαιολιβερίου (YAE), με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη ενεργότητα ύστερα από την επίδραση με μύκητες. Η μέγιστη ενεργότητα λακκάσης έχει παρατηρηθεί στο *P. ostreatus* όταν το αντίστοιχο φαινολικό φορτίο του υπερκείμενου σε υγρή καλλιέργεια ήταν 2,55gr/l (Tsioulpas *et al.*, 2002) ενώ οι Tomati *et al.* (1991) έδειξαν ότι αυτό συμβαίνει όταν ήταν περίπου 1,5 gr/l. Στη παρούσα μελέτη η μέγιστη ενεργότητα λακκάσης καταγράφηκε όταν το φαινολικό φορτίο αντιστοιχούσε σε 1,8 gr/l (25% OMW), ενώ διπλασιάζοντας τη συγκέντρωσή του ήταν σχεδόν μηδενική. Οι Ntougias *et al.* (2012)

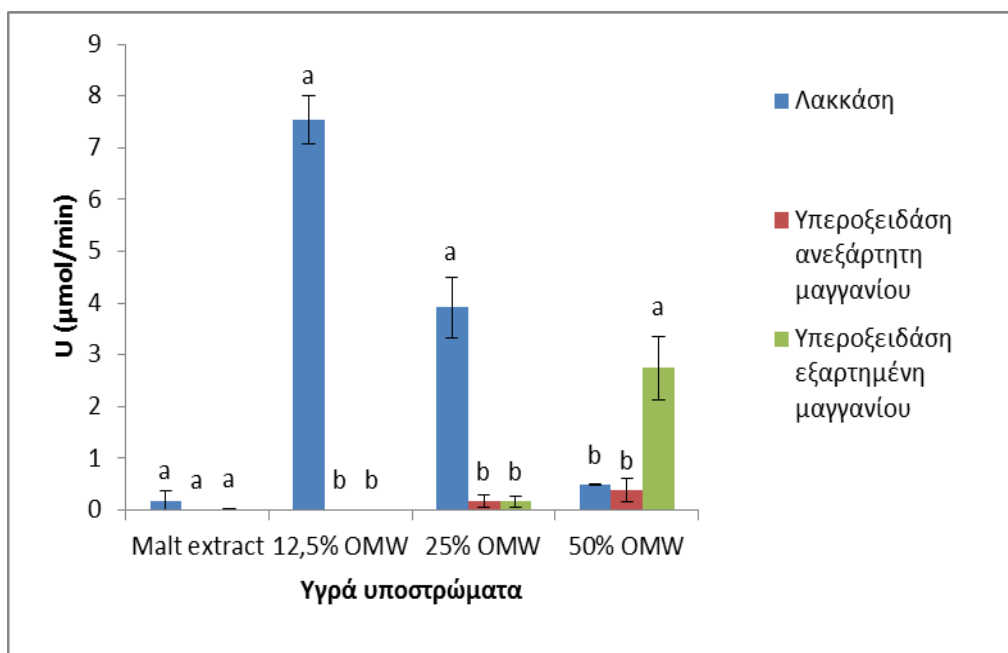
κατέγραψαν πολύ υψηλότερη ενεργότητα λακκάσης σε ακόμη πιο χαμηλές συγκεντρώσεις ολικού φαινολικού φορτίου. Επίσης, μελέτησαν και την ενεργότητα των υπεροξειδάσεων εξαρτημένης και ανεξάρτητης μαγγανίου τόσο στο *P. ostreatus* αλλά και σε δύο συγγενικά είδη του *Ganoderma lucidum*. Ακόμη, παρατήρησαν ότι το *P. ostreatus* παρουσιάζει υψηλότερη ενεργότητα ενζύμων από το *G. carnosum* και το *G. australe*, τα οποία συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Τέλος, παρατηρείται ότι το *G. lucidum* LGAM 9720 σε συγκέντρωση με 12,5 YAE αποτοξικοποιεί το απόβλητο με κυρίως τη χρήση της εξαρτημένης υπεροξειδάσης μαγγανίου, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 3: Ενεργότητα των τριών υπο μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις YAE ύστερα από επεξεργασία τους με τον μύκητα *Pleurotus ostreatus* IK 1123

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

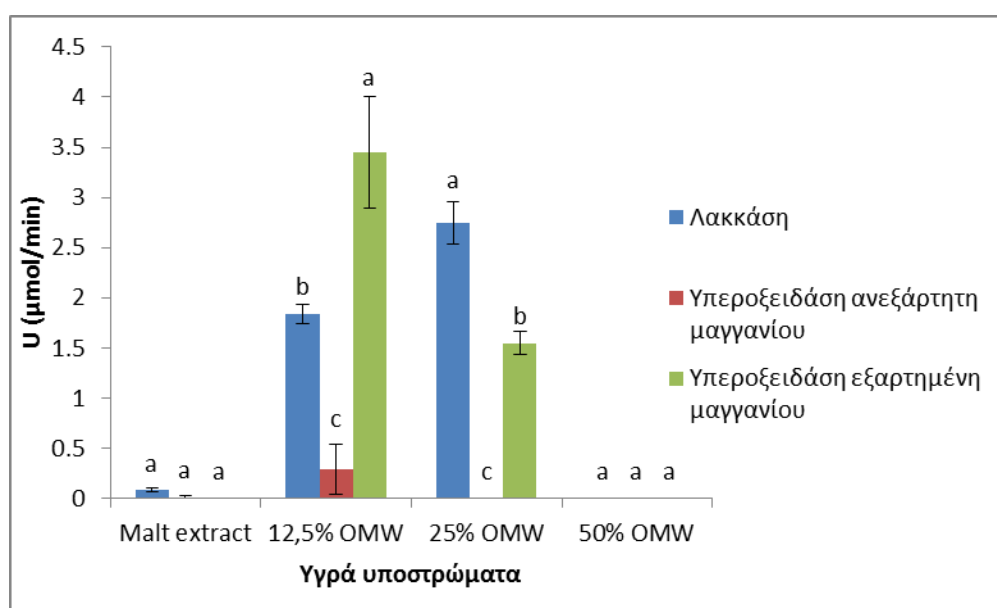
* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 4: Ενεργότητα των τριών υπο μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ΥΑΕ ύστερα από επεξεργασία τους με τον μύκητα *Ganoderma lucidum* VK-7400

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 5: Ενεργότητα των τριών υπο μελέτη ενζύμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ΥΑΕ ύστερα από επεξεργασία τους με τον μύκητα *Ganoderma lucidum* LGAM 9720

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα ένζυμα στο ίδιο υπόστρωμα.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 15: Ενεργότητα των ενζύμων λακκάση, υπεροξειδάση ανεξάρτητη μαγγανίου και εξαρτημένη μαγγανίου από τους μύκητες λευκής σήψης *P. ostreatus*, *G. lucidum* VK-7400 και *G. lucidum* LGAM 9720 ύστερα από τη χρήση τους σε διάφορες συγκεντρώσεις τριφασικού αποβλήτου

Επέμβαση	Στέλεχος μυκηλίου	Ενεργότητα Λακκάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Υπεροξειδάση ανεξάρτητη Μαγγανίου ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Υπεροξειδάση εξαρτημένη Μαγγανίου ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Malt extract	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	0,85 $\pm$ 0,15a	0,52 $\pm$ 0,27a	0,02 $\pm$ 0,02a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	0,18 $\pm$ 0,18b	0a	0,03 $\pm$ 0,01a
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	0,08 $\pm$ 0,02b	0,01 $\pm$ 0,01a	0 $\pm$ 0a
12,5% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	5,09 $\pm$ 0,27a	0,42 $\pm$ 0,42a	0,53 $\pm$ 0,26b
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	7,55 $\pm$ 0,46a	0a	0b
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	1,84 $\pm$ 0,10b	0,29 $\pm$ 0,25a	3,45 $\pm$ 0,56a
25% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	31,43 $\pm$ 1,24a	1,48 $\pm$ 1,05a	0,48 $\pm$ 0,48b
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	3,92 $\pm$ 0,59b	0,17 $\pm$ 0,13a	0,16 $\pm$ 0,10b
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	2,75 $\pm$ 0,21b	0a	1,55 $\pm$ 0,12a
50% OMW	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123	0,06 $\pm$ 0,06b	0,01 $\pm$ 0,07a	0,73 $\pm$ 0,43a
	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	0,50 $\pm$ 0,02a	0,38 $\pm$ 0,22a	2,75 $\pm$ 0,61a
	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720	0b	0a	0a

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη συμβολίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p=0.05$ ανάμεσα στα στελέχη στην ίδια επέμβαση

9. Καλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα

9.1 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης σε διάφορα στερεά υποστρώματα

Τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες κατά την πειραματική διαδικασία ήταν το άχυρο σίτου (WS) για το *P. ostreatus* και το πίτουρο (BS) για τα δύο στελέχη *G. lucidum*. Τα υποστρώματα αυτά παρουσίασαν τον υψηλότερο ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στη καλλιέργεια των μανιταριών σε εμπορική κλίμακα.

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ρυθμού μυκηλιακής ανάπτυξης του *Pleurotus ostreatus* IK 1123 σε διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 16: Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης του *Pleurotus ostreatus* IK 1123 σε mm/day σε υποστρώματα αποτελούμενα από άχυρο (WS), διφασικό απόβλητο ελαιουργείων (TPOMW), και κλαδέματα ελιάς (OLPR)

Επεμβάσεις	<i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123
WS 100%	0,75± 0,09 a
WS+25% TPOMW	0,68±0,04 a,b
WS+50%TPOMW	0,42±0,14 a,b,c
OLPR 100%	0,15±0,11 a,b,c
WS+25%OLPR	0,49±0,01 a,b,c
WS+50%OLPR	0,39±0,13 a,b,c
WS+75%OLPR	0,35±0,03 c
OLPR+50%TPOMW	0,11±0,09 b,c

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$.

Ελάχιστη αρνητική επίδραση στο ρυθμό της μυκηλιακής ανάπτυξης του *P. ostreatus* είχε η χρήση άχυρου με 25% διφασικό απόβλητο ως υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να μπορεί να αντικαταστήσει επαρκώς το κοινό υπόστρωμα καλλιέργειας. Παρόλο όμως που το μυκήλιο αναπτύσσεται με χαμηλότερους ρυθμούς στα υπόλοιπα στερεά υποστρώματα, μόνο τα μείγματα άχυρου με 75% κλαδέματα ελιάς και τα κλαδέματα ελιάς με 50% διφασικό απόβλητο διαφέρουν σημαντικά από τον μάρτυρα (*Πίνακας 16*).

Αποτελέσματα και συζήτηση

Στον Πίνακα 17 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ρυθμού μυκηλιακής ανάπτυξης του *G. lucidum* VK-7400 και του *G. lucidum* LGAM 9720 σε διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 17: Ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης του *Ganoderma lucidum* VK-7400 και του *G. lucidum* LGAM 9720 σε mm/day σε υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδι (BS), διφασικό απόβλητο ελαιουργείων (TPOMW), και κλαδέματα ελιάς (OLPR).

Επεμβάσεις	<i>Ganoderma lucidum</i> VK-7400	<i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720
BS 100%	0,71±0,06 a, A	0,48±0,04 a,B
BS+25% TPOMW	0,41±0,02 b,c,A	0,41±0,06 a,b,c A
BS+50%TPOMW	0,39±0,11 a,b,c,d, A	0,34±0,01 a,b A
OLPR 100%	0,23±0,01 d,A	0,26±0,03 b,c,d,A
OLPR+25%TPOMW	0,03±0,03e,B	0,20±0,01 c,A
OLPR+50%TPOMW	0,01±0,01 e,A	0±0 d,A
BS+25%OLPR	0,49±0,02 a,b,A	0,48±0,07 a,b, A
BS+50%OLPR	0,46±0,09 a,b,c,A	0,40±0,01 a,b,A
BS+75%OLPR	0,30±0,03 c,d,A	0,39±0,05 a,b,c,d,A

*Διαφορετικά πεζά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στερεά υποστρώματα σε κάθε στέλεχος επιπέδου (p=0.05)

**Διαφορετικά Κεφαλαία γράμματα στη γραμμή υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο στελέχη (p=0.05)

Τα στελέχη του *G. lucidum* δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη του μυκηλίου τους ανάμεσα στα ακόλουθα υποστρώματα: πριονίδι (BS), πριονίδι με 50% διφασικό απόβλητο (BS+50%TPOMW), πριονίδι με 25% κλαδέματα ελιάς (BS+25%OLPR) και πριονίδι με 50% κλαδέματα ελιάς (BS+50%OLPR). Ιδιαίτερα μικρός ήταν επίσης ο ρυθμός ανάπτυξης στα μείγματα των κλαδεμάτων ελιάς με διφασικό απόβλητο (OLPR+TPOMW) για το *G. lucidum* VK-7400 και στις δύο αναλογίες που μελετήθηκαν. Ομοίως, μικρό ρυθμό ανάπτυξης εμφάνισε το μυκήλιο του ίδιου στελέχους στο στερεό υπόστρωμα με 75% κλαδέματα ελιάς. Τέλος, στατιστικές διαφορές εντοπίζονται ανάμεσα στο μείγμα πριονιδιού με 25% διφασικό απόβλητο και το πριονίδι, δίχως όμως να διαφέρει από τα υπόλοιπα υποστρώματα ανάπτυξης.

Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα, το *G. lucidum* LGAM 9720 δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές ανάμεσα στον μάρτυρα (πριονίδι) και στα μείγματα πριονιδιού με κλαδέματα και με διφασικό απόβλητο. Αρνητική επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης φαίνεται ότι έχει η προσθήκη διφασικού αποβλήτου σε συνδυασμό με κλαδέματα ελιάς στο στερεό

υπόστρωμα. Τέλος, εξίσου αρνητικά αποτελέσματα είχε η χρήση στο υπόστρωμα εξολοκλήρου κλαδεμάτων ελιάς (Πίνακας 17).

Στο παρελθόν μελέτες έδειξαν ότι το άχυρο σίτου δεν μπορεί να αντικατασταθεί από κελύφη φυσιτικών και απόβλητα εκκοκιστηρίου βαμβακιού ως στερεά υποστρώματα, διότι ο ρυθμός της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, και *Volvariella volvacea* που δοκιμάστηκαν ήταν σημαντικά μικρότερος στα νέα αυτά υλικά (Philippousis and Diamantopoulou, 2011, Philippousis *et al.*, 2001). Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και σε υποστρώματα με πριονίδι λεύκας, πριονίδι βελανιδιάς, στελέχη καλαμποκιού και ελαιόπαστα (Zervakis *et al.*, 2001). Εν αντιθέσει με τα παραπάνω, από τη παρούσα έρευνα προέκυψε ότι στο άχυρο θα μπορούσε να προστεθεί 25% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου δίχως να επηρεάσει σημαντικά την μυκηλιακή ανάπτυξη.

Οι Gonzalez-Matute *et al.* (2002) μελέτησαν την μυκηλιακή ανάπτυξη του *Ganoderma lucidum* σε υποστρώματα με φλοιό σπόρου ηλίανθου και μείγματα με 2,5% ή 5% πίτουρο σιταριού ή βύνη. Παρατήρησαν ότι τα μείγματα με 2,5% και 5% πίτουρο σιταριού και 5% βύνη εμφάνιζαν την υψηλότερη μυκηλιακή ανάπτυξη. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η κατάλληλη σχετική υγρασία του υποστρώματος σε μείγματα με υπόλειμματα ζύμωσης καρπών σιτηρών, πίτουρο σιταριού και αλεσμένου ρυζιού είναι 60%, ενώ η προσθήκη του αλεσμένου ρυζιού στο μίγμα του υποστρώματος δρα ανασταλτικά στην μυκηλιακή ανάπτυξη (Yang *et al.*, 2003). Ακόμη, οι Hsieh και Hang (2004) μελέτησαν τον ρυθμό της μυκηλιακής ανάπτυξης του είδους με κριτήριο αυτή τη φορά τον λόγο άνθρακα προς άζωτο και διαπίστωσαν ότι ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης απαντάται στον C/N=80. Εν κατακλείδι, στη παρούσα μελέτη και τα δύο στελέχη *Ganoderma lucidum* είχαν υψηλό μυκηλιακό ρυθμό ανάπτυξης σε πριονίδι με προσμίξεις 25% ή 50% διφασικό απόβλητο και κλαδέματα ελιάς.

9.2 Αποτελέσματα της καλλιέργειας μανιταριών

Στη καλλιέργεια των μανιταριών αξιολογήθηκε η απόδοση σε βάρος μανιταριών, η διάρκεια επώασης, η πρωιμότητα, η βιολογική αποδοτικότητα και η κατανομή της απόδοσης στα κύματα καρποφορίας.

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια μανιταριών του *P. ostreatus* IK1123.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 18: Διάρκεια επώασης, πρωιμότητα, βιολογική αποδοτικότητα, απόδοση και κατανομή της ανά κύμα καρποφορίας της καλλιέργειας του *P. ostreatus* σε διάφορα στερεά υποστρώματα.

Στερεά υποστρώματα	Διάρκεια επώασης (ημέρες)	Πρωιμότητα (ημέρες)	Απόδοση (gr)	Κατανομή της απόδοσης %			Βιολογική αποδοτικότητα (gr/kg ξηρού υποστρώματος)
				1ο κύμα καρποφορίας	2ο κύμα καρποφορίας	3ο κύμα καρποφορίας	
WS 100 %	36±4,04	40,67±4,81a	215,87±15,43 a,b	44,48	32,28	23,24	77,26±5,52 a,b
WS + 25% TPOMW	25±0,25	40,5±1,44 a	220,75±3,17 a	57,87	26,47	15,65	73,68±1,06 a
WS + 50% TPOMW	27±1,44	58,67±5,55 a	256,87±44,34 a,b	54,83	30,13	15,04	71,33±12,31 a,b
OLPR 100%	44±6,66	53,33±4,10 a	223,39±89,93 a,b	78,88	21,12	0,00	44,68±17,99 a,b
WS + 25% OLPR	28±0,33	37±1,53 a	263,84±46,40 a,b	58,44	22,55	19,01	82,60±14,53 a,b
WS + 50% OLPR	30±2,33	41±1,16 a	255,72±28,04 a,b	62,9	18,70	18,39	56,79±6,23 a,b
WS + 75% OLPR	36±2,19	46±2 a	134,87±4,816 b	64,83	13,58	21,58	39,73±1,42 b

* Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p=0.05) σε διάφορα στερεά υποστρώματα

Μικρή διαφοροποίηση παρατηρείται στη διάρκεια επώασης ανάλογα με το στερεό υπόστρωμα στο *P. ostreatus*, με τη προσθήκη διφασικού αποβλήτου στο υπόστρωμα να συμβάλλει στη μείωσή της. Γενικά η διάρκεια επώασης κυμάνθηκε από 25-44 ημέρες, με τις μέγιστες να αντιπροσωπεύουν το στερεό υπόστρωμα που αποτελείται μόνο από κλαδέματα ελιάς (Πίνακας 18). Ακόμη, η διαφορετικότητα των στερεών υποστρωμάτων δεν επηρέασε τη πρωιμότητα. Συμπεραίνουμε όμως ότι η προσθήκη διφασικού αποβλήτου και κλαδεμάτων ελιάς σε μεγάλο ποσοστό αύξησε ελαφρά τη διάρκεια από την ημέρα του εμβολιασμού έως την πρώτη εμφάνιση καταβολής της καρποφορίας. Η μικρότερη πρωιμότητα παρουσιάζεται στο μείγμα αχύρου με κλαδέματα ελιάς και μετά έπονται τα υποστρώματα άχυρο και άχυρο με 25% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου. Επίσης, η υψηλότερη απόδοση και βιολογική αποδοτικότητα παρατηρήθηκε στο μείγμα άχυρο με 25% κλαδέματα ελιάς δίχως όμως να διαφέρει σημαντικά από τα υπόλοιπα, εκτός από το μείγμα αχύρου με 75% κλαδέματα ελιάς. Τέλος, η βιολογική αποδοτικότητα κυμάνθηκε από 82,60 έως 39,73 gr μανιταριών/kg ξηρού υποστρώματος και το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής ήταν μέρος του πρώτου κύματος καρποφορίας.

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια μανιταριών των δύο στελεχών του είδους *Ganoderma lucidum*.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 19: Διάρκεια επώασης, πρωιμότητα, βιολογική αποδοτικότητα, απόδοση και κατανομή της ανά κύμα καρποφορίας της καλλιέργειας των *G. lucidum* LGAM 9720 και *G. lucidum* VK-7400 σε διάφορα στερεά υποστρώματα.

Στερεά υποστρώματα	Στελέχη <i>Ganoderma lucidum</i>	Διάρκεια επώασης (ημέρες)	Πρωιμότητα (ημέρες)	Απόδοση (gr)	Κατανομή της απόδοσης %			Βιολογική αποδοτικότητα (gr/kg ξηρού υποστρώματος)
					1ο κύμα καρποφορίας	2ο κύμα καρποφορίας	3ο κύμα καρποφορίας	
BS 100 %	9720	43±0	45,75±0,25 a,A	275,22±14,48 a,A	37,7	26,49	35,80	61,24±3,22 a, A
	7400	31,14±1,93	61,67±17,18 a,b,A	166,81±29,07 a,B	37,32	24,11	38,56	32,53±10,28 a,B
BS + 25% TPOMW	9720	33±1,155	77±18,543 a,A	36,1±14,47 c,d, B	25,51	74,49	-	12,05±4,83 c,d,B
	7400	25±0	116±0 a,A	95,39±21,6 a,A	68,78	31,22	-	31,84±7,21 a,A
BS + 50% TPOMW	9720	26,33±0,67	83,5±19,5 a,A	61,46±10,84 c,A	64,39	29,67	5,94	20,52±3,62 c,A
	7400	25,67±0,67	116±0 a,A	101,60±10,84 a,A	47,62	52,38	-	33,92±3,62 a,A
BS + 25% OLPR	9720	43±0	45±3,68 a,A	193,42±13,52 b,A	58,91	19,99	21,09	40,24±2,81 b,A
	7400	32±0	35,5±0,5 b,B	82,31±12,02 a,B	64,88	15,6	3,64	17,13±2,5 a,B
BS + 50% OLPR	9720	26,5±0,5	52,75±4,498 a,A	17,09±3,39 d, B	56,93	38,88	4,18	3,98±0,79 d,B
	7400	32±0	36,5±0,5 b,B	73,21±2,51 a, A	81,69	5,25	1,64	12,85±0,44 a, A
BS + 75% OLPR	9720	31,25±0,63	63,67±15,50 a,A	19,10±8,32 d,B	51,66	32,38	15,96	4,54±1,98 d,B
	7400	32±0	34,25±0,25 b,A	63,88±3,76 a,A	93,96	4,16	1,88	11,84±0,70 a,A

* Διαφορετικά πεζά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p=0.05) σε διάφορα στερεά υποστρώματα

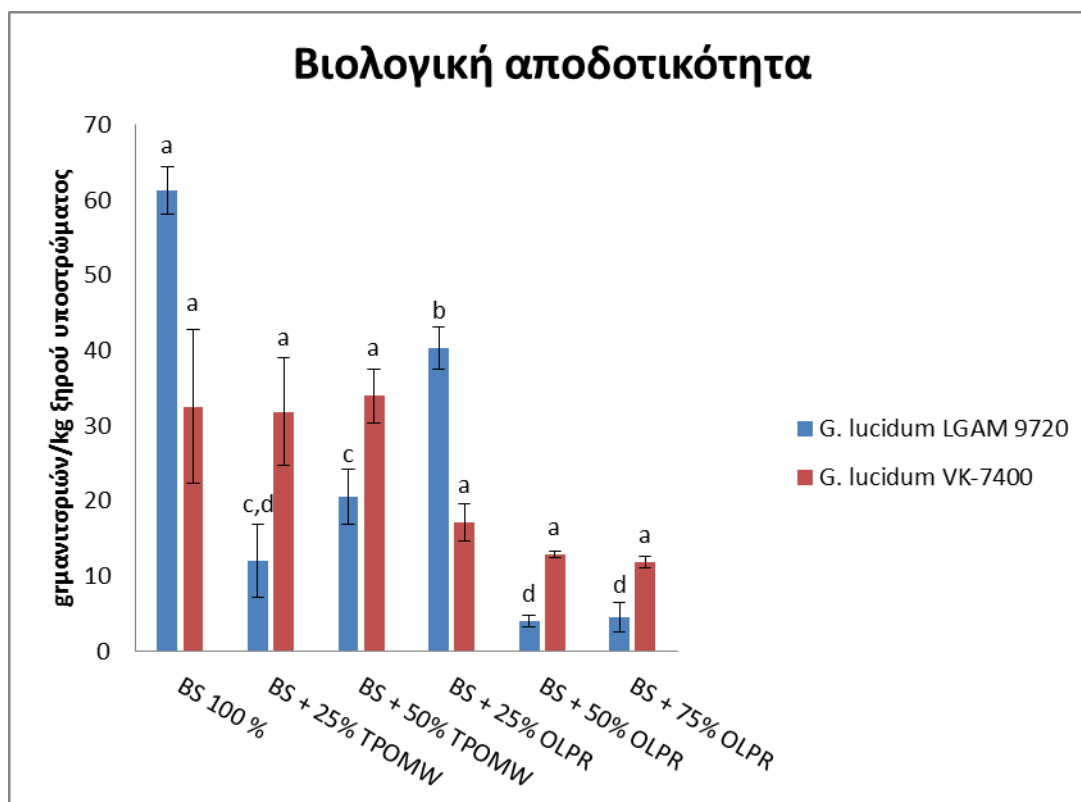
** Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p=0.05) ανάμεσα στα στελέχη

Η διάρκεια επώασης για τα δύο στελέχη *Ganoderma lucidum* ήταν παρόμοια και κυμάνθηκε από 25-43 ημέρες (Πίνακας 19). Ακόμη, η προσθήκη ποσοστού διφασικού αποβλήτου στο στερεό υπόστρωμα φαίνεται ότι αύξησε την διάρκεια της πρωιμότητας και στα δύο στελέχη, όπως συνέβη και στο *P. ostreatus*. Παρόλο που η απόδοση και η βιολογική αποδοτικότητα στο πριονίδι του *G. lucidum* VK-7400 είναι υψηλότερη από την απόδοσή του στα εμπλουτισμένα υποστρώματα, δεν διαφέρει σημαντικά, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 6. Αντίθετα, η βιολογική αποδοτικότητα του *G. lucidum* LGAM 9720 σε πριονίδι παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με τα υπόλοιπα υποστρώματα καλλιέργειας. Ακόμη, εξίσου ικανοποιητική ήταν η βιολογική αποδοτικότητα του υποστρώματος πριονίδι με 25% κλαδέματα ελιάς στο *G. lucidum* LGAM 9720, η οποία έφτασε σε 40,24 gr μανιταριού/kg ξηρού υποστρώματος. Επίσης, συγκρίνοντας τα δύο στελέχη διαπιστώνουμε ότι το *G. lucidum* LGAM 9720 απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό έως την εμφάνιση καταβολών καρποφορίας, όταν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με κλαδέματα ελιάς. Γενικότερα ανάμεσα στα δύο στελέχη *G. lucidum* καλύτερη βιολογική απόδοση έχει το *G. lucidum* VK-7400 με εξαίρεση τα υποστρώματα πριονίδι και πριονίδι με κλαδέματα ελιάς που είναι αποδοτικότερο το άλλο στέλεχος και το πριονίδι με 50% διφασικό απόβλητο όπου δεν διαφέρει η απόδοση τους.

Έτσι το *P. ostreatus* IK1123 και το *G. lucidum* VK-7400 δεν παρουσίασε μεγάλες διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα διάφορα στερεά υποστρώματα στις διάφορες παραμέτρους που αξιολογήθηκαν. Όμως, στο στέλεχος *G. lucidum* LGAM 9720 παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απόδοση και στην βιολογική αποδοτικότητα ανά υπόστρωμα.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει στο παρελθόν για την αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχων υπολλείματων για την καλλιέργεια του *P. ostreatus*. Καλή βιολογική αποδοτικότητα έχει καταγραφεί στην ανάπτυξη του είδους σε υπολείμματα βαμβακιού και άχυρο σίτου οι οποίες συμφωνούν με αυτές της παρούσας εργασίας σε άχυρο, άχυρο με 25% διφασικό απόβλητο, άχυρο με 25% και 50% κλαδέματα ελιάς (Philippousis *et al.*, 2001). Ακόμη, μελετητές χρησιμοποίησαν διάφορες συγκεντρώσεις υγρών αποβλήτων ελαιολιπιδίου με τις οποίες διέβρεξαν το άχυρο που θα αποτελούσε το στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των ΥΑΕ μειωνόταν η βιολογική αποδοτικότητα της καλλιέργειας, ενώ η έντονη μείωση αφορούσε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50% (Kalmis *et al.*, 2008, Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2010). Τέλος, οι Kurt and Buyukalaca (2010) εξέτασαν τα υπολείμματα της αμπελουργίας, άχυρο σίτου, άχυρο σουσαμιού άχυρο 'δίχως φλοιό' και πίτουρο σε διάφορες προσμίξεις ως υποστρώματα

καλλιέργειας του είδους και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τη καλύτερη απόδοση έχουν το μείγμα άχυρο σίτου με πίτουρο (2:1) και έπεται το πριονίδι με πίτουρο (2:1).



Διάγραμμα 6: Βιολογική αποδοτικότητα σε διάφορα στερεά υποστρώματα των *G. lucidum* LGAM 9720 και *G. lucidum* VK-7400

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα.

Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για το *Ganoderma lucidum*. Η χρήση φλοιών σπόρου ηλίανθου με 2% ή 5 % πίτουρο ή βύνη μείωσε τη βιολογική αποδοτικότητα σε ποσοστά από 7,6-10% (Gonzalez-Matute *et al.*, 2002). Επίσης, σε άλλη έρευνα επισημάνθηκε ότι τόσο η μυκηλιακή ανάπτυξη όσο και ο σχηματισμός των καρποφοριών επηρεάζεται από τον λόγο C/N και ότι οι καλύτερες αποδόσεις σημειώθηκαν όταν ο λόγος αυτός ήταν C/N=80 (Hsieh and Yang, 2004). Ακόμη, υψηλή βιολογική απόδοση καταγράφηκε σε στερεά υποστρώματα με πριονίδι και 20-25% υπολείμματα τσαγιού (Peksen and Yakupoglu, 2009). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία είχαν υψηλότερη βιολογική απόδοση από αυτά που μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Τέλος, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι το *G. lucidum* VK-7400 είχε υψηλή βιολογική απόδοση σε υπόστρωμα με 50% διφασικό απόβλητο και πριονίδι οξιάς.

9.3 Ανάλυση σύστασης μανιταριών

9.3.1. Προσδιορισμός της τέφρας

Η τέφρα η οποία αντιπροσωπεύει τα ανόργανα συστατικά των μανιταριών, αντιπροσωπεύει κυρίως τα μέταλλα που περιέχονται στη σύσταση τους. Στον Πίνακα 20 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την αναλυτική σύσταση των μανιταριών στα διαφορετικά υποστρώματα.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 20: Τέφρα, ολικές ινώδεις ενώσεις και ολικά λιπαρά των καρποφοριών της καλλιέργειας των *G. lucidum* LGAM 9720 και *G. lucidum* VK-7400 σε διάφορα στερεά υποστρώματα.

Στερεά υποστρώματα	Στελέχη <i>Ganoderma lucidum</i>	Τέφρα (% ξηρού βάρους)	Ολικές ινώδεις ενώσεις (%)	Ολικά λιπαρά (% ξηρού βάρους)	Ολικές πρωτεΐνες (% ξηρού βάρους)
BS 100 %	9720	3,10±0,08 c,A	47,93±1,86 b,B	2,21±0,08 a,A	16,84±0,62 b,c,A
	7400	1,75±0,10 b,c,B	58,51±1,15 c,A	1,12±0,16 a,B	9,34±0,62 b,B
BS + 25% TPOMW	9720	3,68±0,07 b,c,A	52,89±3,77 a,b,A	1,56±0,52 a,A	18,85±0,55 a,b,A
	7400	2,61±0,14 a,B	62,23±1,24 b,A	1,60±0,14 a,A	15,04±0,37 a,B
BS + 50% TPOMW	9720	4,26±0,18 b,A	49,34±1,56 b,B	1,10±0,12 a,A	22,21±0,79 a,A
	7400	2,65±0,45 a,b,c,B	67,20±1,94 a,A	1,07±0,04 a,A	13,99±2,34 a,B
BS + 25% OLPR	9720	3,08±0,12 c,A	62,48±1,18 a,B	2,45±0,05 a,A	17,06±0,15 b,c,A
	7400	1,49±0,03 c,B	69,42±1,34 a,A	1,37±0,21 a,B	8,10±0,24 b,B
BS + 50% OLPR	9720	3,41±0,33 c,A	43,80±2,02 b,B	2,03±0,49 a,A	15,28±0,55 c,A
	7400	2,20±0,07 a,b,B	65,78±1,13 a,b,A	1,37±0,21 a,A	8,21±0,22 b,B
BS + 75% OLPR	9720	5,20±0,32 a,A	21,57±9,66 c,B	2,04±0,50 a,A	23,25±4,08 a,b,c,A
	7400	1,87±0,14 a,b,c,B	66,10±0,54 a,A	1,30±0,11 a,A	8,63±0,58 b,A

*Διαφορετικά πεζά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικά υποστρώματα στο ίδιο στέλεχος

**Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο στελέχη στο ίδιο υπόστρωμα

Τα δύο στελέχη *G. lucidum* διέφεραν σημαντικά σε όλες τις επεμβάσεις, με το VK-7400 να περιέχει χαμηλότερες τιμές τέφρας, οι οποίες κυμάνθηκαν από 1,75-2,65%. Η προσθήκη διφασικού αποβλήτου στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας του *G. lucidum* VK-7400 αύξησε την περιεκτικότητά του σε ανόργανα συστατικά. Η προσθήκη 50% διφασικού αποβλήτου στο υπόστρωμα καλλιέργειας του τελευταίου συνέβαλλε στην υψηλή περιεκτικότητα των καρποφοριών του σε τέφρα. Τέλος, η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με 25% κλαδέματα ελιάς (Πίνακας 20).

Σε αντίθεση με το στέλεχος VK-7400, το *G. lucidum* LGAM 9720 παρουσίασε αύξηση της περιεκτικότητας σε τέφρα των μανιταριών όταν στο στερεό υπόστρωμα εμπλουτιζόταν τόσο με διφασικό απόβλητο όσο και με κλαδέματα ελιάς. Τη μέγιστη περιεκτικότητα την παρουσίασαν οι καρποφορίες που αναπτύχθηκαν σε πριονίδι με 75% κλαδέματα ελιάς και διέφεραν σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Ακόμη, η τέφρα αποτελούσε το 4,26% της ξηράς ουσίας για την επέμβαση με 50% διφασικό απόβλητο, η οποία δεν διέφερε από αυτή του 25% διφασικού αποβλήτου αλλά διέφερε από τις υπόλοιπες επεμβάσεις.

Η περιεκτικότητα σε τέφρα των μανιταριών συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5-12% του ξηρού βάρους τους και είναι μικρότερη από την περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες (Kalas, 2009). Από τη βιβλιογραφία όμως διαπιστώνουμε ότι το *Ganoderma lucidum* εμφανίζει ακόμη πιο χαμηλή περιεκτικότητα της τάξεως του 1,77% (Mau *et al.*, 2001). Ακόμη, όπως παρατηρείται στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η περιεκτικότητα σε τέφρα επηρεάζεται από το υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργείται αλλά και από τον λόγο C/N (Hsieh and Yang, 2004, Peksen and Yaprakoglu, 2009). Συμπερασματικά, η προσθήκη διφασικού αποβλήτου στο στερεό υπόστρωμα και κλαδεμάτων ελιάς αυξάνει τη περιεκτικότητα σε τέφρα.

9.3.2. Προσδιορισμός ινωδών ουσιών

Οι ολικές ινώδεις ενώσεις αντιπροσωπεύουν το σύνολο των διαιτητικών και των λειτουργικών ινών. Τα δύο υπό μελέτη στελέχη παρουσίασαν υψηλά ποσοστά ινωδών στις καρποφορίες που αναπτύχθηκαν στο πριονίδι με 25% κλαδέματα ελιάς, οι οποίες προσεγγίζουν μέχρι το 69,43% για το *G. lucidum* VK-7400 και το 62,48% για το *G. lucidum* LGAM 9720.

Όπως προαναφέρθηκε, το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών ινωδών ενώσεων του στελέχους *G. lucidum* VK-7400 παρατηρήθηκε στα δείγματα από την επέμβαση με 25% κλαδέματα ελιάς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά παρά μόνο με τις καρποφορίες που προέρχονταν από καλλιέργεια σε πριονίδι και σε πριονίδι με 25%

διφασικό απόβλητο. Παρότι η προσθήκη διφασικού αποβλήτου αύξησε τη ποσοστιαία περιεκτικότητα σε ολικές ινώδεις, δεν ήταν παρόμοια τα αποτελέσματα με τη προσθήκη κλαδεμάτων ελιάς (Πίνακας 20). Η υψηλή περιεκτικότητα του υποστρώματος σε κλαδέματα ελιάς (75%) και σε πριονίδι πιθανόν να συνέβαλλε στη χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικές ινώδεις ενώσεις στο *G. lucidum* LGAM 9720, οι οποίες διέφεραν σημαντικά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επίσης, όσες καρποφορίες προήλθαν από κλαδέματα ελιάς σε ποσοστό 25% δεν διέφεραν από αυτές που προήλθαν από αντίστοιχο ποσοστό διφασικού αποβλήτου. Τέλος, τα δύο στελέχη εμφανίζουν διαφορές μεταξύ τους, με το *G. lucidum* VK-7400 να έχει υψηλότερη περιεκτικότητα ινωδών ουσιών σε όλες τις επεμβάσεις, με μοναδική εξαίρεση την επέμβαση με 25% διφασικό απόβλητο όπου δεν διαφέρουν μεταξύ τους τα δύο στελέχη.

Περιορισμένες είναι οι μελέτες για το προσδιορισμό των ολικών ινωδών που περιέχονται σε καλλιεργούμενα αλλά και σε άγρια μανιτάρια. Σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη, η περιεκτικότητα του *P. ostreatus* σε ολικές ινώδεις είναι μόλις 12% και επηρεάζεται από τα διαφορετικά υποστρώματα που καλλιεργήθηκε (Garcha *et al.*, 1993). Αντίθετα, η περιεκτικότητα του *Ganoderma lucidum* ήταν 59,16%, το οποίο συμφωνεί με τη περιεκτικότητα στο μάρτυρα του στελέχους *G. lucidum* VK-7400 και είναι λίγο υψηλότερο από το άλλο στέλεχος (Mau *et al.*, 2001). Τέλος, τα στελέχη που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία περιείχαν υψηλότερα ποσοστά ολικών ινωδών ουσιών από το *P. ostreatus* με το *G. lucidum* VK-7400 να υπερτερεί και κυμαίνεται από 58-69%.

9.3.3 Προσδιορισμός των ολικών λιπαρών

Γενικά, τα μανιτάρια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικά λιπαρά, τα οποία χαρακτηρίζονται ως κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα και κυμαίνονται περίπου από 2-6% (Kalac, 2009). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν μόνο το σύνολο αυτών και δεν προσδιορίστηκε το ποσοστό των επιμέρους.

Η σύσταση του στερεού υποστρώματος καλλιέργειας δε παρατηρείται να επηρεάζει τη περιεκτικότητα των δύο στελεχών *Ganoderma lucidum* σε ολικά λιπαρά (Πίνακας 20). Το *G. lucidum* LGAM 9720 περιέχει υψηλότερες τιμές οι οποίες κυμαίνονται από 1,09-2,213% gr ξηρού βάρους ενώ το *G. lucidum* VK-7400 1,06-1,59% gr ξηρού βάρους. Τέλος, υπάρχουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στα δύο στελέχη όταν οι καρποφορίες προέρχονταν από πριονίδι και πριονίδι με 25% κλαδέματα ελιάς.

Σε αντίθεση με τα χαμηλά ποσοστά ολικών λιπαρών έρχονται τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών, κατά τις οποίες η περιεκτικότητα κυμαινόταν από 4,60-5,13% (Hsieh and Yang, 2004, Mau *et al.*, 2001). Επίσης, παρατηρείται διαφοροποίηση στη περιεκτικότητα ανάμεσα στα στερεά υποστρώματα και στη σχέση τους σε λόγο C/N (Hsieh and Yang, 2004, Yang *et al.*, 2003).

9.3.4 Προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών

Ο υπολογισμός των ολικών πρωτεϊνών έγινε με τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του μανιταριού σε άζωτο και τη χρήση ενός παράγοντα μετατροπής για την αφαίρεση αζώτου που προέρχεται από μη πρωτεϊνούχες πηγές, όπως η χιτίνη. Κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφοροι μετατροπείς, για το λόγο αυτό πολλές φορές διαφέρουν τα αποτελέσματα. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το 4,38 (Kalac, 2009).

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα των ολικών πρωτεϊνών του ξηρού βάρους των μανιταριών των δύο υπό μελέτη στελεχών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους σε όλα τα υποστρώματα που εξετάστηκαν, με το *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές. Οι τιμές για το στέλεχος αυτό κυμάνθηκαν από 15,28-23,25% και η υψηλότερη παρατηρήθηκε σε αυτά που αναπτύχθηκαν σε πριονίδι με 75% κλαδέματα ελιάς, τα οποία δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά με πριονίδι και διάφορες συγκεντρώσεις διφασικού αποβλήτου. Ακόμη, η προσθήκη του τελευταίου στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας αύξησε τη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών στις καρποφορίες ενώ τα κλαδέματα ελιάς εμφάνισαν υψηλότερη τιμή στην συγκέντρωση 75%.

Τα δύο στελέχη συμπεριφέρθηκαν εντελώς διαφορετικά, έτσι το *G. lucidum* VK-7400 περιείχε μόλις από 8,10-15,04% ολικές πρωτεΐνες. Η προσθήκη κλαδεμάτων ελιάς μείωσε ελάχιστα τη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών σε όλες τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν. Τέλος, η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε μανιτάρια που είχαν καλλιεργηθεί σε μείγμα πριονιδίου με 25% διφασικό απόβλητο δίχως να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτά με 50% διφασικό απόβλητο, όπου και ήταν χαμηλότερη.

Λόγω των διαφορετικών συντελεστών που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς από τους μελετητές για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών, παρατηρούνται πολλές φορές υπερεκτιμημένες τιμές. Σύμφωνα με τους Mau *et al.* (2001) η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες του *Ganoderma lucidum* ήταν κοντά στο 8%, δηλαδή παρόμοια τιμή με το *G. lucidum*

VK-7400. Ενώ η περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες του άλλου εξεταζόμενου στελέχους προσεγγίζουν τη βιβλιογραφική αναφορά των Peksen and Yakupoglu (2009). Επιπλέον, η ανώτερη τιμή που καταγράφηκε από τους προαναφερθέντες ήταν 20,17% σεμανιάρια με 25% απόβλητα τσαγιού με πριονίδι όταν στη παρούσα ήταν 23,25% (*G. lucidum* LGAM 9720) σεμανιάρια που καλλιεργήθηκαν με 75% κλαδέματα ελιάς.

Στο σύνολο των αναλύσεων για την σύσταση τωνμανιταριών που πραγματοποιήθηκε διαπιστώνουμε ότι τα υπό εξέταση στελέχη διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους όσο αφορά τη σύσταση των καρποφοριών τους, όπως ότι και αυτή διαφοροποιείται ανάλογα με τα στερεά υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται οι καρποφορίες. Τέλος, συμπεραίνεται ότι περιέχουν πολύ υψηλά ποσοστά ολικών ινωδών ουσιών που πολλές φορές αγγίζουν και το 50% του ξηρού τους βάρους ενώ είναι πολύ χαμηλά σε ολικά λιπαρά.

10. Έλεγχος πρεβιοτικών ιδιοτήτων

Ένα από τα κριτήρια για να διαπιστωθεί εάν κάποιο υλικό εμφανίζει πρεβιοτικές ιδιότητες είναι η δοκιμή ανάπτυξης γνωστών προβιοτικών στελεχών στο υλικό αυτό. Για τον λόγο αυτό δοκιμάστηκαν χωριστά τα μυκήλια και οι καρποφορίες στελεχών βασιδιομυκήτων ως μοναδική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus acidophilus*, *L.gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* και *B. longum*.

10.1 Ανάπτυξη *Lactobacillus acidophilus*

Προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της ανάπτυξης του *L. acidophilus*, τα δεδομένα για τη στατιστική ανάλυση χωρίστηκαν σε μυκήλια και σε καρποφορίες, όπου πραγματοποιήθηκε έλεγχος ANOVA σε κάθε χρονική στιγμή και ζευγαρωτά t-test ανά δύο χρονικές στιγμές για το προσδιορισμό των στατιστικών διαφορών στη μεταβολή του πληθυσμού.

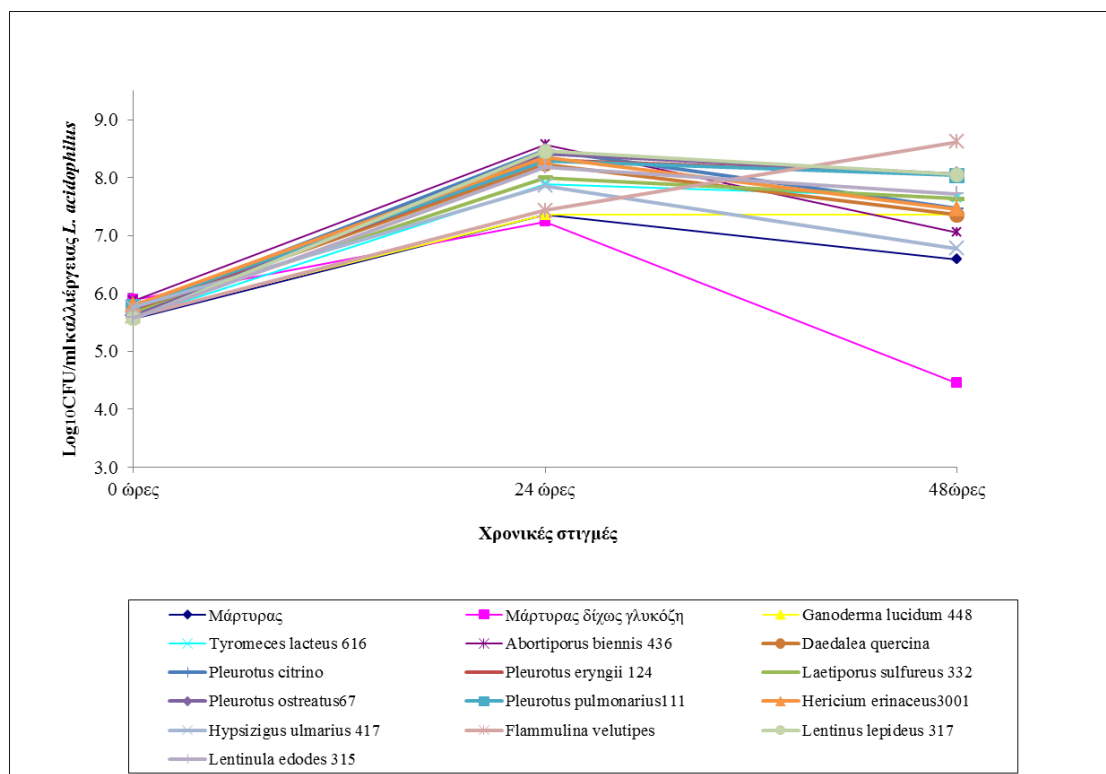
10.1.1 Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υλικό εμπλουτισμένο με σκόνη μυκηλίου βασιδιομυκήτων

10.1.1.1 Έλεγχος ανάπτυξης του *L. acidophilus* σε μυκήλια 14 ειδών βασιδιομυκήτων

Μυκήλιο από 14 διαφορετικά στελέχη βασιδιομυκήτων δοκιμάστηκε (2% συγκέντρωση) ως μοναδική πηγή άνθρακα για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *L. acidophilus*. Το θρεπτικό υλικό που ενσωματώθηκε το μυκήλιο είχε την σύσταση του MRS broth χωρίς την παρουσία γλυκόζης. Για την καταμέτρηση του πληθυσμού του λακτοβακίλλου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (cfu). Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας η ανάπτυξη του ίδιου λακτοβακίλλου στο κλασικό υπόστρωμα MRS broth.

Ο πληθυσμός του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με 2% μυκήλια βασιδιομυκήτων τη μηδενική χρονική στιγμή (εμβόλιο) κυμαινόταν σε 5,5-5,8 $\log_{10}$ CFU/ml δίχως να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα στελέχη (Πίνακας 21). Παρατηρείται ότι ο λακτοβακίλλος εμφανίζει τις μέγιστες τιμές του πληθυσμού του ($\log_{10}$ CFU/ml 7,24-8,46) στις 24 ώρες, για όλα τα υποστρώματα (μυκήλια διαφορετικών στελεχών βασιδιομυκήτων), εκτός από το *Flammulina velutipes* (FVL), στο οποίο φτάνει στην μέγιστη τιμή του στις 48 ώρες (8,61 $\log_{10}$ CFU/ml) (Διάγραμμα 7). Παρόλη την έντονη αύξηση του πληθυσμού του λακτοβακίλλου στα υποστρώματα με τα μυκήλια, δεν εμφανίζονται διαφορές στη μεταβολή του πληθυσμού από τις 0 έως τις 24 ώρες για όλες τις καλλιέργειες. Σημαντικά υψηλότερο πληθυσμό εμφανίζουν οι καλλιέργειες με μυκήλια από *Lentinus lepideus* (LLL), *Pleurotus eryngii* (P.er), *Pleurotus ostreatus* 67 (P.os) και *Pleurotus pulmonarius* (PPL) σε σχέση με τον μάρτυρα, μετά από 48 ώρες επώασης. Τέλος, ο πληθυσμός του λακτοβακίλλου με πηγή άνθρακα το μυκήλιο *Daedalea quercina* 528 (DQC 528) είναι σημαντικά χαμηλότερος στις 48 ώρες σε σχέση με την τιμή που είχε στις 24 ώρες επώασης.

Αποτελέσματα και συζήτηση



Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη του *Lactobacillus acidophilus* σε σχέση με διάρκεια επώασης σε υποστρώματα με μυκήλια βασιδιομυκήτων ως μοναδική πηγή C

Αποτελέσματα και συζήτηση

Πίνακας 21: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με μυκήλια βασιδιομυκήτων ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Στελέχη μυκήτων	0 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	5,56±0,19a ^{+,*}	7,36±0,04a [*]	6,59±0,06b
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	5,89±0,01a ^{+,*}	7,24±0,14a [*]	4,45±0,09c
<i>Ganoderma lucidum</i> 448	5,60±0,14a	7,35±0,15a	7,36±0,22a,b
<i>Tyromeces lacteus</i> 616	5,57±0,19a	7,89±0,15a	7,65±0,26a,b
<i>Abortiporus biennis</i> 436	5,87±0,03a ⁺	8,57±0,08a	7,06±0,39a,b,c
<i>Daedalea quercina</i>	5,70±0,01a ^{+,*}	8,23±0,09a [*]	7,36±0,18a,b
<i>Pleurotus citrinus</i>	5,73±0,09a ^{+,*}	8,47±0,10a	7,46±0,28a,b
<i>Pleurotus eryngii</i> 124	5,69±0,05a ^{+,*}	8,30±0,17a	8,06±0,15a
<i>Laetiporus sulfureus</i> 332	5,67±0,05a ^{+,*}	8,00±0a	7,63±0,18a,b
<i>Pleurotus ostreatus</i> 67	5,61±0,01a ^{+,*}	8,42±0,01a	8,05±0,08a
<i>Pleurotus pulmonarius</i> 111	5,76±0,07a ^{+,*}	8,28±0,11a	8,03±0,10a
<i>Hericium erinaceus</i> 3001	5,80±0,06a ⁺	8,35±0,23a	7,46±0,54a,b,c
<i>Hypsizigus ulmarius</i> 417	5,76±0,02a ^{+,*}	7,86±0,48a	6,77±0,16a,b
<i>Flammulina velutipes</i>	5,59±0,06a ^{+,*}	7,43±1,22a	8,61±0,29a,b
<i>Lentinus lepideus</i> 317	5,56±0,03a ^{+,*}	8,45±0,14a	8,05±0,04a
<i>Lentinula edodes</i> 315	5,58±0,05a ^{+,*}	8,18±0,15a	7,72±0,33a,b,c

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (log₁₀CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στελέχη

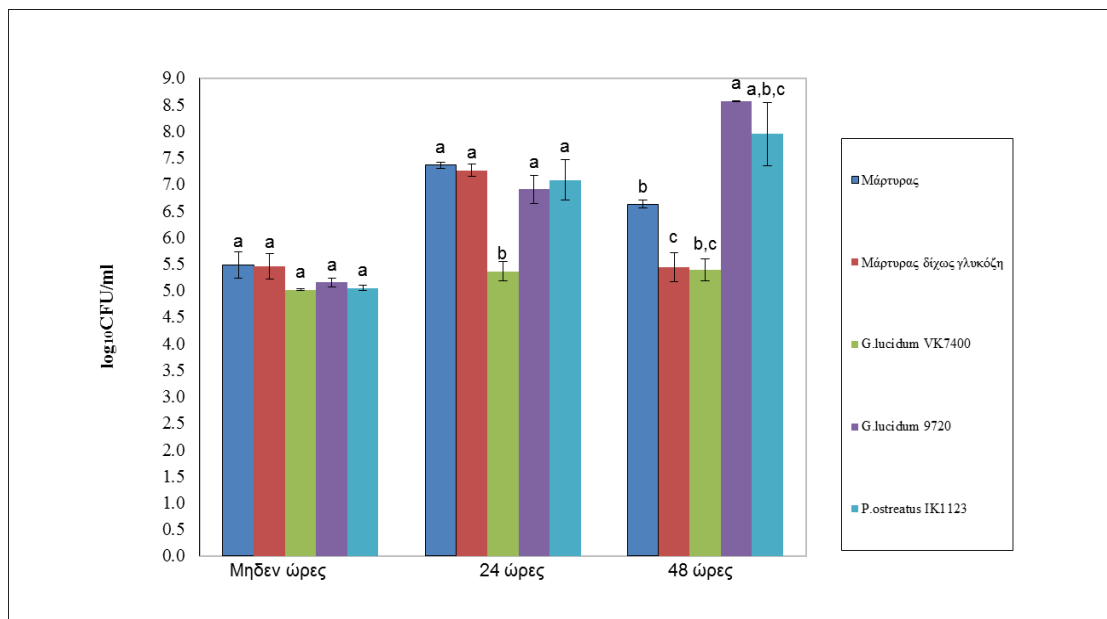
⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

10.1.1.2. Έλεγχος ανάπτυξης του *L. acidophilus* σε μυκήλια των *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* 9720 και *Pleurotus ostreatus*

Ξεχωριστά μελετήθηκαν τα μυκήλια των *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* 9720 και *Pleurotus ostreatus*, όπου τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με μυκήλια των *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* 9720 και *Pleurotus ostreatus* ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή.

Στις μηδέν ώρες δεν υπάρχουν διαφορές στο πληθυσμό, ο οποίος κυμαίνεται από 5,01 έως 5,48 $\log_{10}\text{CFU/ml}$ (Διάγραμμα 8). Μετά από 24 ώρες όλες οι καλλιέργειες του λακτοβακίλλου αναπτύχθηκαν και είναι στα ίδια περίπου επίπεδα (6,91-7,36 $\log_{10}\text{CFU/ml}$), εκτός από την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα το μυκήλιο του *G. lucidum* VK-7400 όπου σχεδόν παρέμεινε στο πληθυσμό του αρχικού εμβολίου και διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες καλλιέργειες. Η ίδια καλλιέργεια παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα και έπειτα από 48 ώρες αναερόβιας επώασης. Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές η ανάπτυξη του από τις 0 έως τις 48 ώρες, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *L. acidophilus* (Πίνακας 22). Τέλος, ο υψηλότερος πληθυσμός έπειτα από 48 ώρες αναερόβιας επώασης παρατηρείται στο *G. lucidum* 9720 (8,57 $\log_{10}\text{CFU/ml}$) το οποίο διαφέρει σημαντικά από τον μάρτυρα (MRS), από τον αρνητικό μάρτυρα και από την καλλιέργεια με υπόστρωμα το

Αποτελέσματα και συζήτηση

G.lucidum VK7400. Το υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το *P.ostreatus* ευνόησε την αύξηση του λακτοβακίλλου, όπου ο πληθυσμός του αυξήθηκε σημαντικά στις 24 ώρες και παρέμεινε σημαντικά μεγαλύτερος από το εμβόλιο στις 48 ώρες. Δεν παρουσίασε όμως σημαντικές διαφορές από τον μάρτυρα.

Πίνακας 22: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με μυκήλια των *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* 9720 και *Pleurotus ostreatus* ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Στελέχη μυκηλίων	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	5,48±0,24a ⁺ *	7,37±0,06a [*]	6,63±0,07b
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	5,46±0,23a ^{+,*}	7,27±0,12a [*]	5,44±0,03c
<i>G.lucidum</i> VK7400	5,01±0,01a	5,36±0,18b	5,39±0,21b,c
<i>G.lucidum</i> 9720	5,15±0,08a ^{+,*}	6,91±0,27a [*]	8,57±0,01a
<i>P.ostreatus</i> IK1123	5,05±0,05a ^{+,*}	7,09±0,38a	7,95±0,59a,b,c

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων ($\log_{10}$ CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών ($p=0.05$)

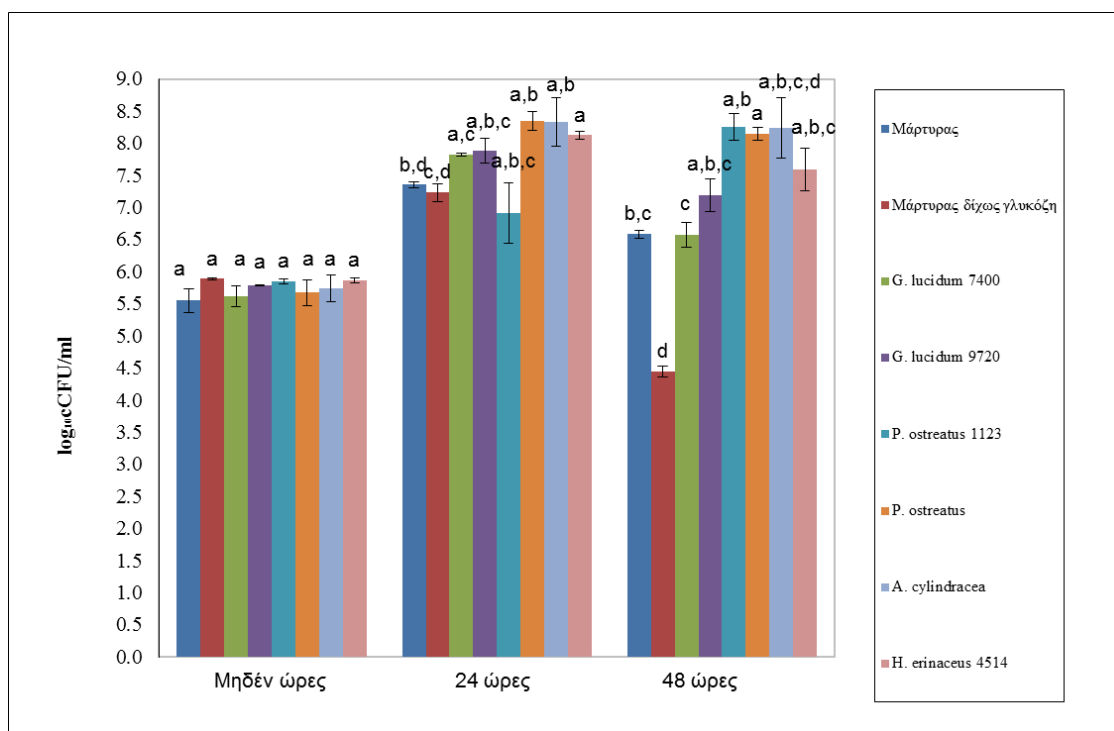
⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

10.1.2 Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υλικό εμπλουτισμένο με σκόνη από καρποφορίες βασιδιομυκήτων

10.1.2.1 Έλεγχος ανάπτυξης του *L. acidophilus* σε καρποφορίες των *G. lucidum* 7400, *G. lucidum* 9720, *P. ostreatus* 1123, *P. ostreatus*, *A. cylindracea*, *H. erinaceus* 4514



Διάγραμμα 9: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με καρποφορίες έξι στελεχών βασιδιομυκήτων ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή

Συγκρίνοντας τον πληθυσμό του *L. acidophilus* σε διαφορετικούς χρόνους σε υγρές καλλιέργειες με μοναδική πηγή άνθρακα μία από τις καρποφορίες από έξι στελέχη βασιδιομυκήτων (*G. lucidum* 7400, *G. lucidum* 9720, *P. ostreatus* 1123, *P. ostreatus*, *A. cylindracea*, *H. erinaceus* 4514) παρατηρήθηκε αύξηση έπειτα από 24 και 48 ώρες αναερόβιας επώασης. Σχεδόν όλες οι καλλιέργειες του *L. acidophilus* έφτασαν την μεγαλύτερη τιμή τους (από 6,91 έως 8,35 $\log_{10}$ CFU/ml) μετά από 24 ώρες επώασης, με εξαίρεση την καλλιέργεια με πηγή άνθρακα την καρποφορία του *Pleurotus ostreatus* IK 1123 η οποία εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή στις 48

ώρες. (Διάγραμμα 9). Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι καλλιέργειες με πηγή άνθρακα κάποια από τις καρποφορίες των βασιδιομυκήτων, εκτός από το *Pleurotus ostreatus* IK 1123, παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη από τον μάρτυρα (MRS) στις 24 ώρες, έστω και εάν οι διαφορές δεν έφτασαν σε επίπεδα σημαντικότητας. Μόνο η καλλιέργεια με την καρποφορία από το στέλεχος *Hericiium erinaceus* 4514 διαφέρει σημαντικά από το μάρτυρα.

Η μεγαλύτερη ανάπτυξη στις 48 ώρες παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα του *P. ostreatus* IK 1123 και ήταν της τάξεως του $8,26 \log_{10}\text{CFU/ml}$, χωρίς όμως να διαφέρει σημαντικά από το μάρτυρα (MRS). Αντίθετα είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον μάρτυρα ο πληθυσμός του λακτοβακίλλου με πηγή άνθρακα το *P.ostreatus* (Πίνακας 23). Τέλος, σε όλες τις επεμβάσεις εκτός από αυτές που περιείχανμανιτάρια από τα είδη *Agrocybe cylindracea* και *G. lucidum* VK-7400 σημειώθηκαν διαφορές στις μεταβολές του πληθυσμού του προβιοτικού οργανισμού από την μηδενική χρονική στιγμή έως της 48 ωρής αναερόβιας επώασης (Πίνακας 23).

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι το *Lactobacillus acidophilus* χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα τις καρποφορίες των έξι βασιδιομυκήτων που εξετάστηκαν (*G. lucidum* 7400, *G. lucidum* 9720, *P.ostreatus* 1123, *P.ostreatus*, *A. cylindracea*, *H. erinaceus* 4514) εμφανίζοντας υψηλότερες τιμές ανάπτυξης από το ίδιο στέλεχος όταν καλλιεργείται στο ευνοϊκό υπόστρωμα MRS, αν και οι διαφορές από τον μάρτυρα δεν φτάνουν πάντα το επίπεδο της σημαντικότητας. Για τα υποστρώματα με τις πέντε καρποφορίες η μέγιστη τιμή εμφανίστηκε στις 24 ώρες, όπως και στον μάρτυρα, ενώ για το υπόστρωμα με το *P. ostreatus* IK 1123 η μέγιστη τιμή εμφανίστηκε στις 48 ώρες γεγονός που υποδηλώνει ότι ο λακτοβάκιλλος χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να διασπάσει την συγκεκριμένη πηγή άνθρακα.

Πίνακας 23: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με καρποφορίες έξι στελεχών βασιδιομυκήτων ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Στελέχη	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	5,56±0,19a ^{+,*}	7,36±0,04b,d [*]	6,59±0,06b,c
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	5,89±0,01a ^{+,*}	7,24±0,14c,d [*]	4,45±0,09d
<i>G. lucidum</i> 7400	5,62±0,16a ⁺	7,82±0,03a,c [*]	6,58±0,20c
<i>G. lucidum</i> 9720	5,79±0,01a ^{+,*}	7,88±0,19a,b,c	7,19±0,25a,b,c
<i>P. ostreatus</i> IK 1123	5,85±0,04a [*]	6,91±0,47a,b,c	8,26±0,21a,b
<i>P. ostreatus</i>	5,68±0,20a ^{+,*}	8,35±0,15a,b [*]	8,15±0,11a
<i>A. cylindracea</i>	5,74±0,21a ⁺	8,33±0,38a,b	8,24±0,47a,b,c,d
<i>H. erinaceus</i> 4514	5,87±0,04a ^{+,*}	8,13±0,06a	7,59±0,33a,b,c

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (log₁₀CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (p=0.05)

⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

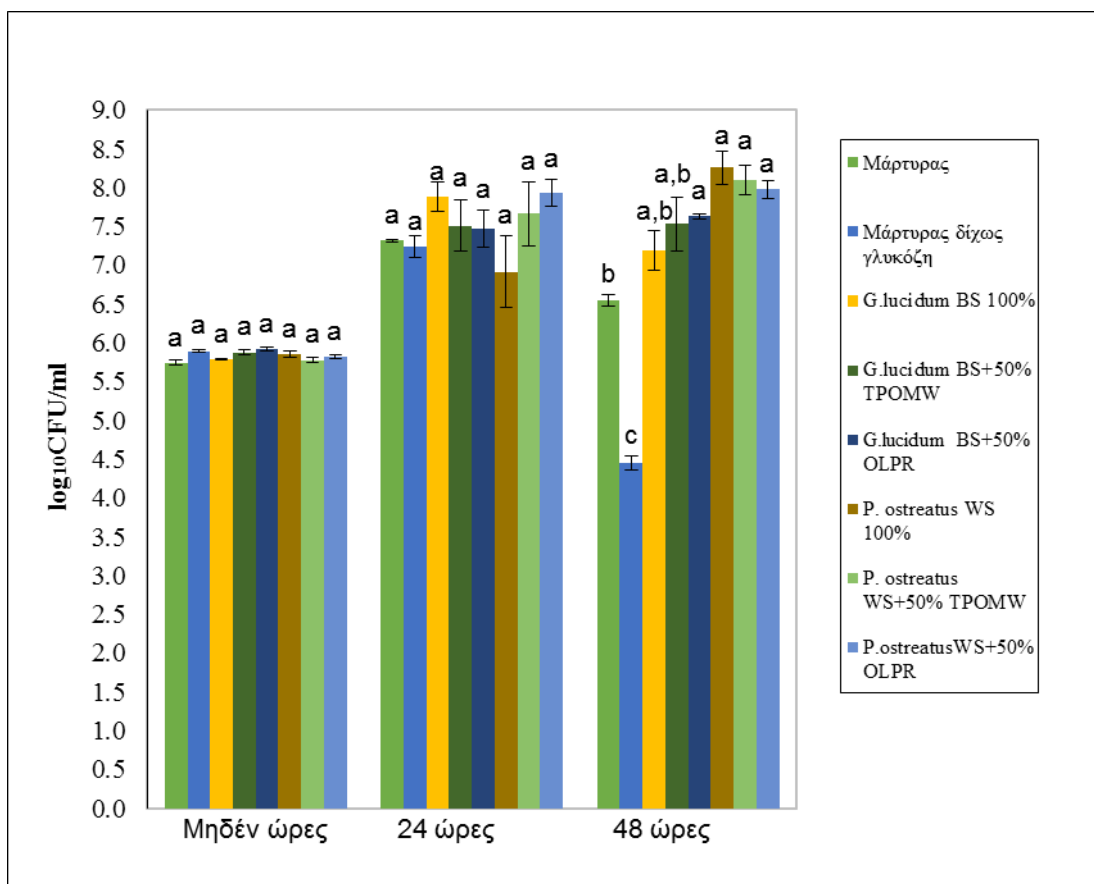
10.1.2.2 Έλεγχος ανάπτυξης του *L. acidophilus* σε καρποφορίες των *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα

Τέλος, μελετήθηκαν οι καρποφορίες του *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 και του *Pleurotus ostreatus* IK 1123 τα οποία είχαν αναπτυχθεί τόσο σε υποστρώματα αποτελούμενα από πριονίδι οξιάς και άχυρο σίτου αντίστοιχα, καθώς και σε μείγματα με 50% αναλογία διφασικού αποβλήτου και 50% κλαδέματα ελιάς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον *Πίνακα 24*.

Όλες οι καλλιέργειες δεν εμφανίζουν διαφορές τη στιγμή του εμβολιασμού, όπου το εμβόλιο κυμαινόταν από 5,74-5,91 log₁₀CFU/ml (*Πίνακας 24*). Όπως και στις προηγούμενες αναλύσεις, παρατηρήθηκε αύξηση στα διαφορετικά υποστρώματα των δύο στελεχών έπειτα από 24 ώρες, χωρίς όμως η αύξηση αυτή να φτάσει τα επίπεδα της σημαντικότητας για καμία από τις

καλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα δεν παρουσιάζονται διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα του πληθυσμού του λακτοβακίλλου στα διαφορετικά υποστρώματα στις 24 ώρες (Διάγραμμα 10). Για τα υποστρώματα με πηγή άνθρακα την καρποφορία του *G. lucidum* 9720 παρατηρούμε ότι στις 24 ώρες ο λακτοβάκιλλος φτάνει είτε τις υψηλότερες τιμές του (BS) είτε παραμένει σταθερός (BS+50%TPOMW, BS+50%OLPR), σε σχέση με την ανάπτυξη που παρουσιάζει στα ίδια υποστρώματα στις 48 ώρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός του λακτοβακίλλου ήταν μεγαλύτερος από εκείνον του μάρτυρα, αλλά η διαφορά αυτή δεν έφτασε τα επίπεδα σημαντικότητας.

Για τα υποστρώματα με πηγή άνθρακα την καρποφορία του *P. ostreatus*, όταν προερχόταν από άχυρο σίτου 100% (WS 100%) η καλλιέργεια του λακτοβακίλλου δεν παίρνει την μέγιστη τιμή της στις 24 ώρες αλλά μετά από 48 ώρες επώασης. Ο πληθυσμός του λακτοβακίλλου στις 24 ώρες σε αυτό το υπόστρωμα είναι μικρότερος από τον μάρτυρα (MRS), χωρίς όμως η διαφορά να φτάνει τα επίπεδα σημαντικότητας. Αντίθετα, οι καλλιέργειες του λακτοβακίλλου στα υποστρώματα με καρποφορία το *P. ostreatus*, όταν αυτό προερχόταν από άχυρο σίτου εμπλουτισμένο με διφασικό απόβλητο (WS+50%TPOMW) ή με κλαδέματα ελιάς (WS+50%OLPR) έχουν μεγαλύτερο πληθυσμό από τον μάρτυρα, χωρίς όμως οι διαφορές να είναι σημαντικές.



Διάγραμμα 10: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G.lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή

Εντελώς διαφορετική εικόνα παρατηρούμε στις 48 ώρες όπου σε όλες τις καλλιέργειες καταμετρήθηκαν σημαντικά υψηλότεροι πληθυσμοί του λακτοβακίλλου από το μάρτυρα εκτός από το *G. lucidum* από 100% πριονίδι (BS 100%) και εμπλουτισμένο με διφασικό απόβλητο (BS+50%TPOMW) στα οποία μειώθηκε ο πληθυσμός του (Πίνακας 24).

Για τα υποστρώματα με πηγή άνθρακα την καρποφορία του *G.lucidum* 9720 προερχόμενη από πριονίδι οξιάς εμπλουτισμένο είτε με 50% διφασικό απόβλητο (BS+50%TPOMW), είτε με κλαδέματα ελιάς (BS+50%OLPR) παρατηρούμε ότι στις 48 ώρες ο λακτοβάκιλλος παραμένει σταθερός σε σχέση με τον αντίστοιχο στις 24 ώρες.

Για τα υποστρώματα με πηγή άνθρακα τη καρποφορία του *P. ostreatus*, εμφανίζονται υψηλότερες τιμές από τις 24 ώρες, υψηλότερες από τον μάρτυρα χωρίς όμως οι διαφορές να είναι σημαντικές.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

- η ανάπτυξη του *Lactobacillus acidophilus* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* είναι στα ίδια ή και σε ευνοϊκότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (MRS), χωρίς οι διαφορές να είναι σημαντικές πάντα
- η ανάπτυξη του *Lactobacillus acidophilus* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με την προέλευση αυτών των καρποφοριών, δηλαδή τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργειά τους, χωρίς αυτές οι διαφορές να φτάνουν πάντα τα επίπεδα σημαντικότητας. Τα εμπλουτισμένα υποστρώματα με διφασικό απόβλητο ή με κλαδέματα ελιάς για την καλλιέργεια των μανιταριών σε σχέση με τα κλασικά υποστρώματα, φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη του λακτοβακίλλου, χωρίς όμως οι διαφορές στην αύξηση να είναι σημαντικές.

Πίνακας 24: Ανάπτυξη του *L. acidophilus* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G. lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Καρποφορία μύκητα	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	5,74±0,03a ^{+,*}	7,32±0,02a [*]	6,55±0,07b
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	5,89±0,01a ^{+,*}	7,24±0,14a [*]	4,45±0,09c
<i>G. lucidum</i> BS 100%	5,79±0,01a ^{+,*}	7,88±0,19a	7,19±0,25a,b
<i>G. lucidum</i> BS+50% TPOMW	5,88±0,03a ^{+,*}	7,51±0,33a	7,53±0,34a,b
<i>G. lucidum</i> BS+50% OLPR	5,91±0,03a ^{+,*}	7,47±0,24a	7,63±0,03a
<i>P. ostreatus</i> WS 100%	5,85±0,04a [*]	6,91±0,47a	8,26±0,21a
<i>P. ostreatus</i> WS+50% TPOMW	5,78±0,03a ^{+,*}	7,66±0,42a	8,10±0,19a
<i>P. ostreatus</i> WS+50% OLPR	5,82±0,02a ^{+,*}	7,93±0,18a	7,97±0,11a

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (log₁₀CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (p=0.05)

⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

10.2 Ανάπτυξη *Lactobacillus gasseri*

10.2.1. Έλεγχος ανάπτυξης του *L. gasseri* σε καρποφορίες των *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα

Οι καρποφορίες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα που μελετήθηκαν στον *Lactobacillus acidophilus* χρησιμοποιήθηκαν και για τα υπόλοιπα προβιοτικά στελέχη. Ο πληθυσμός του *L. gasseri* στις υγρές καλλιέργειες στη μηδενική ώρα (εμβόλιο) κυμαινόταν από 6,625-6,779 ($\log_{10}$ CFU/ml) ενώ στις 24 ώρες αυξήθηκε στις τιμές από 8,509-9,1369 ($\log_{10}$ CFU/ml), εκτός από το μάρτυρα δίχως γλυκόζη όπου μειώθηκε από το 6,7459 στο 6,3693 ($\log_{10}$ CFU/ml) (Διάγραμμα 11).

Όλες οι καλλιέργειες παρουσιάζουν σημαντική αύξηση μετά από 24 ώρες επώασης, συγκρινόμενες με το εμβόλιο που ξεκίνησαν. Οι πληθυσμοί του λακτοβακίλλου στις 24 ώρες στα διάφορα υποστρώματα δεν διαφέρουν από τον μάρτυρα, που παρουσίασε αντίστοιχη αύξηση στο ευνοϊκό για τον λακτοβάκιλλο υλικό (MRS) (Πίνακας 25).

Πίνακας 25: Ανάπτυξη του *L. gasseri* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G. lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Καρποφορία μύκητα	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	6,71±0,06a ^{+,*}	8,51±0,37a	8,75±0,07a,b
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	6,75±0,04a	6,37±0,30b	6,38±0,30c
<i>G. lucidum</i> BS 100%	6,74±0,02a ^{+,*}	8,65±0,07a	8,34±0,17a,b
<i>G. lucidum</i> BS+50% TPOMW	6,78±0,03a ^{+,*}	8,81±0,13a	8,89±0,20a,b
<i>G. lucidum</i> BS+50% OLPR	6,63±0,07a ^{+,*}	9,14±0,11a	8,74±0,04a,b
<i>P. ostreatus</i> WS 100%	6,74±0,02a ^{+,*}	9,09±0,01a	9,14±0a
<i>P. ostreatus</i> WS+50% TPOMW	6,69±0,05a ^{+,*}	8,81±0,20a	8,84±0,02a,b
<i>P. ostreatus</i> WS+50% OLPR	6,72±0,07a ^{+,*}	9,00±0,05a	9,01±0,04a,b

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων ($\log_{10}$ CFU/ml καλλιέργειας)

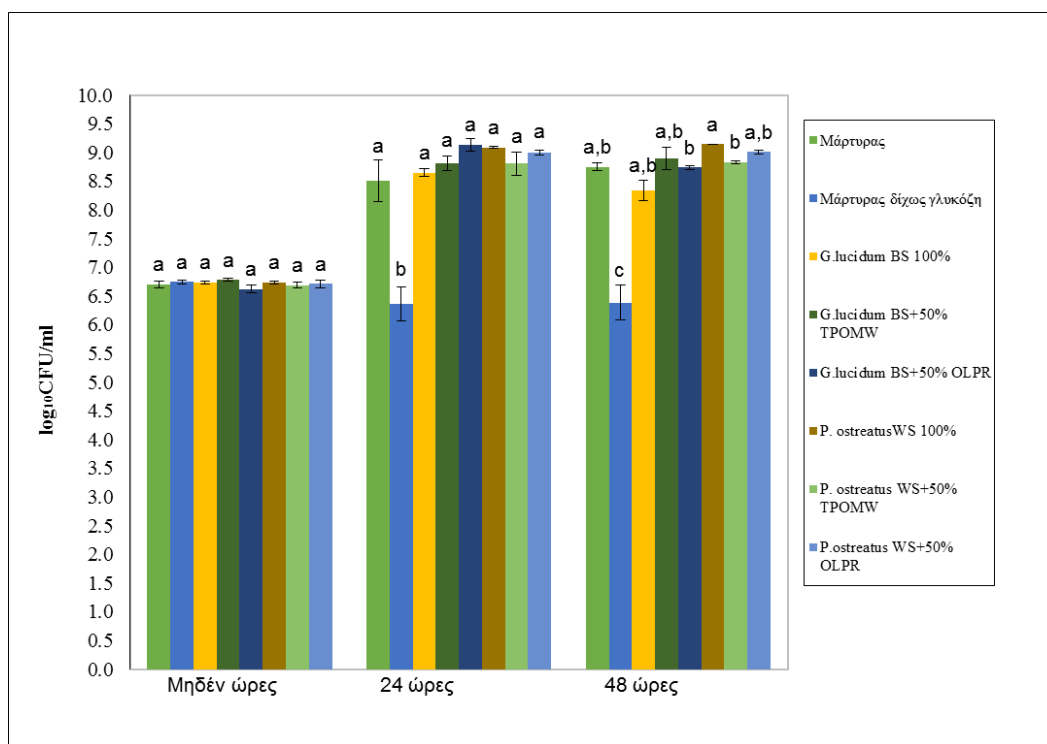
*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών ($p=0.05$)

⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

* Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

* Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

Έπειτα από 48 ώρες επώασης οι καλλιέργειες του λακτοβακίλλου σε όλα τα υποστρώματα (εκτός από τον αρνητικό μάρτυρα) παραμένουν με υψηλούς πληθυσμούς και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τον χρόνο έναρξης, ενώ δεν παρουσιάζουν διαφορά από τα επίπεδα που είχαν οι πληθυσμοί στις 24 ώρες. Οι καλλιέργειες που περιείχαν καρποφορίες από υποστρώματα με πριονίδι και μείγμα πριονιδιού με 50% κλαδέματα ελιάς παρουσίασαν μία μικρή πτώση στον πληθυσμό του *L. gasseri*. Στις υπόλοιπες καλλιέργειες παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση με εξαίρεση τον αρνητικό μάρτυρα. Ακόμη, δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στις 48 ώρες ανάμεσα στο μάρτυρα και στις καλλιέργειες με μανιτάρια, ενώ ανασταλτικό παράγοντα φαίνεται να αποτελεί η καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε διφασικό απόβλητο διότι εμφανίζει διαφορές στην ανάπτυξη του πληθυσμού του *L. gasseri* σε σχέση με αυτό που αναπτύχθηκε σε 100% άχυρο. Εντελώς διαφορετική εικόνα παρατηρείται στο *G. lucidum*, στο οποίο η επέμβαση με διφασικό απόβλητο προήγαγε την ανάπτυξη του προβιοτικού οργανισμού δίχως όμως να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τα υπόλοιπα.



Διάγραμμα 11: Ανάπτυξη του *L. gasseri* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G. lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

- η ανάπτυξη του *Lactobacillus gasseri* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* είναι στα ίδια ή και σε ευνοϊκότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (MRS), χωρίς οι διαφορές να είναι σημαντικές
- η ανάπτυξη του *Lactobacillus gasseri* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* δεν παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με την προέλευση αυτών των καρποφοριών, δηλαδή τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργειά τους.

10.3 Ανάπτυξη *Bifidobacterium bifidum*

10.3.1. Έλεγχος ανάπτυξης του *Bifidobacterium bifidum* σε καρποφορίες των *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα

Σε προκαταρκτικό πείραμα για να ελεγχθούν οι συνθήκες που απαιτούνται για τα bifidobacteria παρατηρήθηκε ότι εμφανίζονται μετά την επώαση στα τρυβλία εκτεταμένες μολύνσεις κυρίως από Gram+ βακτήρια, που πιθανά προέρχονται από τις καρποφορίες των βασιδιομυκήτων. Έτσι εξετάστηκε η προσθήκη του αντιβιοτικού Gentamicin σε συγκέντρωση 4mg/L τόσο στα τρυβλία επίστρωσης όσο και στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Αφού διαπιστώθηκε ότι το αντιβιοτικό δεν αναστέλλει τον υπό μελέτη μικροοργανισμό μας και ότι είναι απαραίτητη η προσθήκη του μόνο στο υγρό θρεπτικό μέσο, ακολούθησε η μελέτη των καρποφοριών του *G. lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* IK 1123 οι οποίες είχαν αναπτυχθεί σε διαφορετικά υποστρώματα.

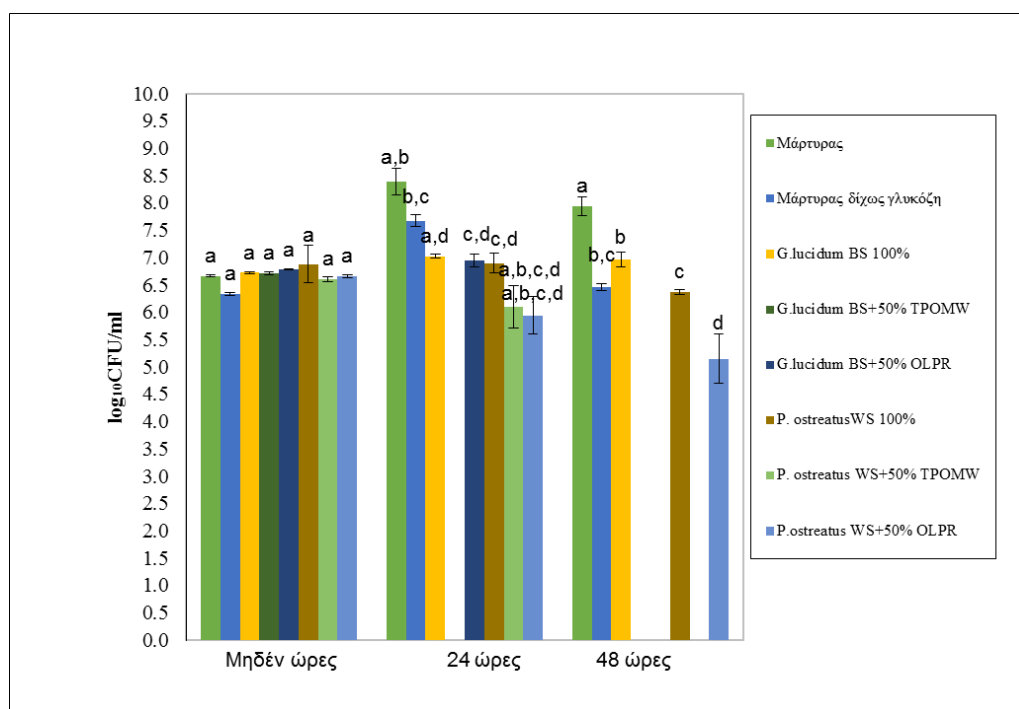
Ο πληθυσμός του εμβολίου δε διέφερε και κυμαινόταν από 6,35-6,89 log₁₀CFU/ml (Πίνακας 26). Ο μικροοργανισμός αυτός ελέγχθηκε για πρώτη φορά ως προς την ανάπτυξη του σε υλικό με πηγή άνθρακα καρποφορία βασιδιομυκήτων.

Παρατηρούμε ότι όταν η καρποφορία του *G. lucidum* προέρχεται από στερεό υπόστρωμα πριονίδι οξιάς (BS), στις 24 ώρες παρουσιάζει σημαντική αύξηση σε σχέση με το εμβόλιο (t=0), αλλά παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα από την αύξηση που παρουσιάζει ο μάρτυρας, παρότι η διαφορά αυτή δεν είναι σημαντική.

Ο πληθυσμός παραμένει στα ίδια επίπεδα στις 48 ώρες στο ίδιο υπόστρωμα και είναι σημαντικά μικρότερος από τον μάρτυρα. Αρνητική επίδραση είχε η ανάπτυξη της καρποφορίας

του *G. lucidum* σε πριονίδι οξιάς και διφασικό απόβλητο γιατί ο πληθυσμός του *B.bifidum* μειώθηκε έπειτα από 24ώρες αναερόβιας επώασης και δεν ήταν δυνατή η καταμέτρησή του (Διάγραμμα 12). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην επέμβαση με καρποφορίες από πριονίδι οξιάς με 50% κλαδέματα ελιάς. Στις 24 ώρες παρέμεινε σταθερός σε σχέση με το εμβόλιο και στις 48 ώρες δεν ήταν δυνατή η καταμέτρησή του.

Όταν δοκιμάστηκε η καρποφορία του *P.ostreatus* (προερχόμενη από υπόστρωμα άχυρο σίτου WS) ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε ότι η καλλιέργεια του *B.bifidum* στις 24 και στις 48 ώρες δεν αυξάνεται σε σχέση με το εμβόλιο (t=0) και παραμένει ο πληθυσμός χαμηλότερος από τον αντίστοιχο του μάρτυρα. Αρνητική επίδραση είχε η ανάπτυξη της καρποφορίας του *P.ostreatus* σε άχυρο σίτου εμπλουτισμένο με διφασικό απόβλητο (WS+50%TPOMW) ή με κλαδέματα ελιάς (WS+50%OLPR) αντίστοιχα.



Διάγραμμα 12: Ανάπτυξη του *Bifidobacterium bifidum* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G.lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος±τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή

Πίνακας 26: Ανάπτυξη του *Bifidobacterium bifidum* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G.lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Καρποφορία μύκητα	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	6,67±0,02a ^{+,*}	8,40±0,24a,b	7,94±0,17a
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	6,35±0,03a ⁺	7,68±0,11b,c [*]	6,46±0,06b,c
<i>G. lucidum</i> BS 100%	6,73±0,02a ⁺	7,03±0,04a,d	6,97±0,13b
<i>G. lucidum</i> BS+50% TPOMW	6,71±0,03a	-	-
<i>G. lucidum</i> BS+50% OLPR	6,79±0,01a	6,96±0,12c,d	-
<i>P. ostreatus</i> WS 100%	6,89±0,35a	6,91±0,18c,d	6,38±0,04c
<i>P. ostreatus</i> WS+50% TPOMW	6,61±0,04a	6,10±0,38a,b,c,d	-
<i>P. ostreatus</i> WS+50% OLPR	6,67±0,03a	5,95±0,35a,b,c,d	5,15±0,45d

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (log₁₀CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (p=0.05)

- Ο πληθυσμός του *B. bifidum* ήταν κάτω από 3000 CFU/ml και δεν ήταν εφικτή η καταμέτρηση του

⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

- η ανάπτυξη του *Bifidobacterium bifidum* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (mMRS),
- η ανάπτυξη του *Bifidobacterium bifidum* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* δεν ευνοήθηκε στα υποστρώματα αυτά και δεν παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με την προέλευση αυτών των καρποφοριών.

10.4 Ανάπτυξη *Bifidobacterium longum*

10.4.1. Έλεγχος ανάπτυξης του *Bifidobacterium longum* σε καρποφορίες των *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* 1123, προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα

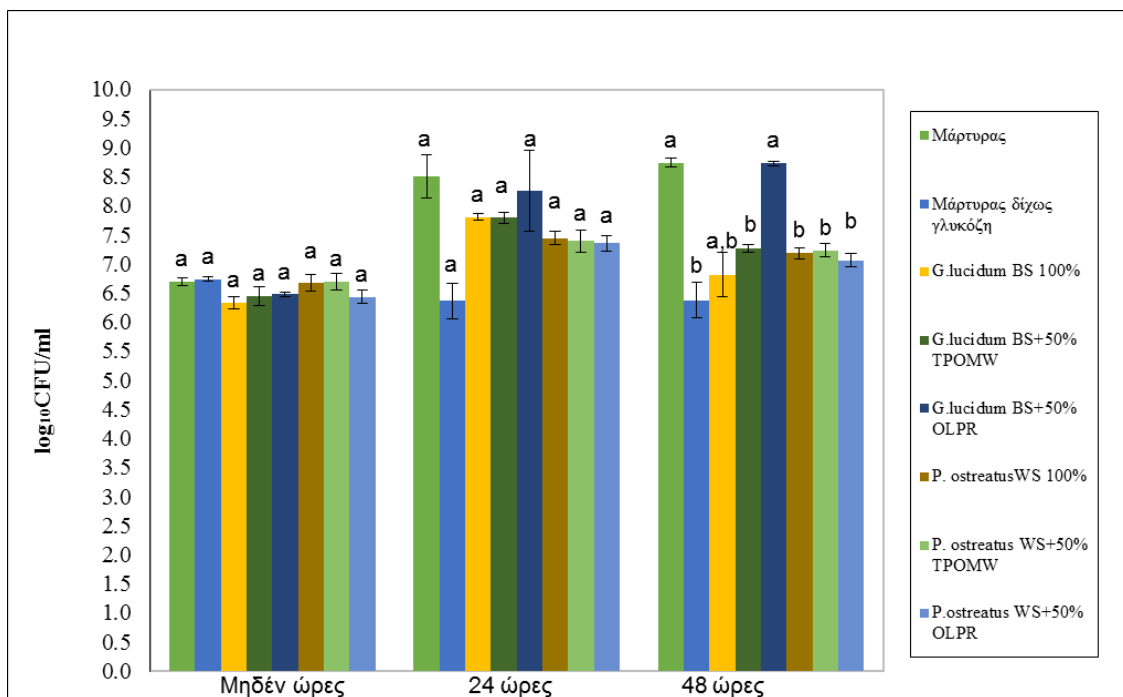
Σύμφωνα με το Πίνακα 27 ο αρχικός πληθυσμός του *Bifidobacterium longum*, που εμβολιάστηκε σε κάθε επέμβαση για τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών καρποφοριών βασιδιομυκήτων και των υποστρωμάτων που αυτοί καλλιεργήθηκαν, στην ανάπτυξη του προβιοτικού οργανισμού, κυμαινόταν από 6,3433-6,7044 ($\log_{10}$ CFU/ml).

Τα μανιτάρια του *G.lucidum* ως μέρος του θρεπτικού υποστρώματος παρατηρήθηκε ότι συνέβαλλαν σημαντικά θετικά στην ανάπτυξη του *B. longum* έπειτα από 24 ώρες επώασης (Διάγραμμα 13). Η μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζεται στην καλλιέργεια με την καρποφορία από πριονίδι οξιάς και 50% κλαδέματα ελιάς, δίχως όμως η αύξηση αυτή να είναι σημαντική στις 24 ώρες ή στις 48 ώρες για την συγκεκριμένη καλλιέργεια. Και οι τρεις καλλιέργειες με μανιτάρια του *G.lucidum* από διαφορετικά υποστρώματα (BS, BS+50%TPOMW, BS+50%OLPR) παραμένουν με μικρότερη αύξηση από τον μάρτυρα στους αντίστοιχους χρόνους, χωρίς αυτή η διαφορά να φτάνει τα επίπεδα της σημαντικότητας.

Τα μανιτάρια του *P.ostreatus* ως μέρος του θρεπτικού υποστρώματος παρατηρήθηκε ότι συνέβαλλαν θετικά στην ανάπτυξη του *B. longum* έπειτα από 24 ώρες επώασης και μάλιστα η αύξηση του πληθυσμού του *B.longum* στις 24 ώρες ήταν σημαντική τόσο για τα μανιτάρια που προέρχονταν από υπόστρωμα με άχυρο σίτου (WS), όσο και από υπόστρωμα άχυρο σίτου εμπλουτισμένο με διφασικό απόβλητο (WS+50%TPOMW) (Πίνακας 27).

Στις 48 ώρες η αύξηση του βακτηρίου ήταν σημαντική για όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν καρποφορίες του *P.ostreatus* σε σχέση με τα επίπεδα του πληθυσμού αρχικά ($t=0$), αλλά δεν παρουσίασε διαφορές σημαντικές από τις 24 ώρες (Πίνακας 27).

Όμως τα επίπεδα των πληθυσμών του *B.longum* στις καλλιέργειες με πηγή άνθρακα τα μανιτάρια παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα, τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες και σε κάποιες περιπτώσεις η διαφορά είναι σημαντική.



Διάγραμμα 13: Ανάπτυξη του *Bifidobacterium longum* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G.lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες

^a Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα τριών επαναλήψεων

* Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$ ανάμεσα στα στελέχη την ίδια χρονική στιγμή

Πίνακας 27: Ανάπτυξη του *Bifidobacterium longum* σε υποστρώματα με καρποφορίες του *G.lucidum* 9720 και του *P. ostreatus* προερχόμενες από διαφορετικά στερεά υποστρώματα, ως μοναδική πηγή C, στις 0, 24 και 48 ώρες ^a

Καρποφορία μύκητα	Μηδέν ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Μάρτυρας	6,67±0,02a ^{+,*}	8,40±0,24a	7,94±0,17a
Μάρτυρας δίχως γλυκόζη	6,35±0,03a	7,68±0,11a	6,46±0,06b
<i>G.lucidum</i> BS 100%	6,34±0,10a ⁺	7,81±0,06a	6,82±0,38a,b
<i>G.lucidum</i> BS+50% TPOMW	6,45±0,16a ⁺	7,81±0,10a	7,27±0,16b
<i>G.lucidum</i> BS+50% OLPR	6,48±0,04a	8,26±0,70a	8,74±0,04a
<i>P. ostreatus</i> WS 100%	6,69±0,14a ^{+,*}	7,45±0,12a	7,20±0,10b
<i>P. ostreatus</i> WS+50% TPOMW	6,70±0,15a ^{+,*}	7,40±0,19a	7,24±0,11b
<i>P.ostreatus</i> WS+50% OLPR	6,44±0,12a [*]	7,36±0,14a	7,07±0,12b

^a Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε δεκαδικούς λογάριθμους των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (log₁₀CFU/ml καλλιέργειας)

*Διαφορετικά γράμματα στη στήλη υποδηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών (p=0.05)

⁺ Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 24 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού από 24 έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

^{*} Στατιστικές διαφορές στη μεταβολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού έως 48 ώρες αναερόβιας επώασης

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

- η ανάπτυξη του *Bifidobacterium longum* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (mMRS), χωρίς οι διαφορές να είναι πάντα σημαντικές
- η ανάπτυξη του *Bifidobacterium longum* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G.lucidum* 9720 και *P. ostreatus* ευνοούν την αύξηση του βακτηρίου και φαίνεται ότι υπάρχουν και διαφορές ανάλογα με την προέλευση των καρποφοριών αυτών (BS+50%OLPR)

10.5 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στην αναζήτηση ενώσεων που εμφανίζουν πρεβιοτική δράση, με τελικό στόχο τη παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων. Μία κατηγορία από αυτές είναι οι β-γλυκάνες οι οποίες απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα σιτηρά και στους μύκητες, αποτελώντας δομικό στοιχείο των κυτταρικών τους τοιχωμάτων.

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής για τη διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης των β-γλυκανών των μυκήτων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, είναι περιορισμένες. Με τη παρούσα *in vitro* μελέτη έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης πιθανής πρεβιοτικής δράσης μυκηλίων ή καρποφοριών βασιδιομυκήτων μέσω της χρήσης τους ως μοναδικής πηγής άνθρακα στη καλλιέργεια προβιοτικών μικροοργανισμών. Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση της χημικής σύστασης του υποστρώματος καλλιέργειας των καρποφοριών στη πρεβιοτική τους δράση. Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκαν τέσσερα προβιοτικά στελέχη, δύο λακτοβάκιλλοι και δύο μπιφιδοβακτήρια. Ακόμη, σε αντίθεση με τις υπάρχουσες μελέτες, δεν έγινε απομόνωση των πολυσακχαριτών που πιθανά παρουσιάζουν πρεβιοτική δράση αλλά χρησιμοποιήθηκαν αυτούσιες οι καρποφορίες και τα μυκήλια των μυκήτων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης μυκηλίων προερχόμενων από ένα σχετικά μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών βασιδιομυκήτων και τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα μυκήλια των *Flammulina velutipes*, *Lentinus lepideus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* και *Pleurotus pulmonarius* εμφάνισαν υψηλότερους πληθυσμούς του *L. acidophilus* έπειτα από 48 ώρες σε σύγκριση με το μάρτυρα. Παρόλη τη θετική δράση που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα μυκήλια στο λακτοβάκιλλο δεν εξετάστηκαν περαιτέρω σε άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.

Παρόμοια πορεία ανάπτυξης ακολούθησαν και οι καρποφορίες βασιδιομυκήτων μεγιστοποιώντας το πληθυσμό του λακτοβακίλλου στις 24 ώρες εκτός από το *Pleurotus ostreatus* IK 1123, το οποίο απαιτεί περισσότερο χρόνο για να συμβάλλει στην ανάπτυξη του προβιοτικού μικροοργανισμού.

Όπως αποδείχθηκε από τη παρούσα μελέτη, το στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας επηρεάζει τη τελική σύσταση των καρποφοριών των μανιταριών και κατ' επέκταση τη πιθανή πρεβιοτική δράση. Έτσι, επιλέχθηκαν καρποφορίες από το *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 και το *Pleurotus ostreatus* IK 1123 τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα με πριονίδι

οξιάς και άχυρο σίτου αντίστοιχα, καθώς και σε μείγματα με 50% αναλογία διφασικού αποβλήτου και 50% κλαδέματα ελιάς για να μελετηθούν περαιτέρω σε άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς.

Οι υπό μελέτη επεμβάσεις αύξησαν το πληθυσμό του *L. acidophilus* και διέφεραν σημαντικά από το μάρτυρα έπειτα από 48 ώρες, καθώς επίσης το καλλιεργητικό υπόστρωμα των καρποφοριών επηρέασε την ανάπτυξη. Έτσι, τα μανιτάρια του *G. lucidum* LGAM 9720, τα οποία προήλθαν από προσμίξεις με διφασικό απόβλητο και κλαδέματα ελιάς, ευνόησαν την ανάπτυξη του λακτοβακίλου. Αντίθετα, στο *P. ostreatus* δεν διαφοροποιήθηκε η ανάπτυξη αντίστοιχα με το υπόστρωμα, παρόλο που σύμφωνα με μελέτη η χρήση ΥΑΕ και κατά επέκταση του ΑΔΕ προάγει τη σύνθεση της β-1,3-γλυκάνης στο είδος και αναμέναμε υψηλότερη ανάπτυξη (Reverberi *et al.*, 2004). Ακόμη, η χρήση των καρποφοριών ως μοναδική πηγή άνθρακα στον άλλο λακτοβάκιλλο (*L. gasseri*) δεν κατόρθωσε να προάγει την ανάπτυξή του σε βαθμό που να διαφέρει σημαντικά από το μάρτυρα, όμως ευνόησε και εδώ την αύξησή του. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να χρησιμοποιήσει τις καρποφορίες των βασιδιομυκήτων για να αναπτυχθεί, όχι όμως τόσο ικανοποιητικά όσο με το τυπικό υπόστρωμά του, το MRS.

Αντίθετη συμπεριφορά παρουσίασαν τα μπιφιδοβακτήρια, τα οποία γενικότερα φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα. Έτσι, ο πληθυσμός του *Bifidobacterium bifidum* κατόρθωσε να αναπτυχθεί μόνο στη καρποφορία του *G. lucidum* που προέρχονταν από πριονίδι στις 24 ώρες, η οποία ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα από το θετικό μάρτυρα. Δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη του στελέχους σε κανένα άλλο υπόστρωμα. Ακόμη, τα μανιτάρια ως μοναδική πηγή άνθρακα του θρεπτικού υποστρώματος παρατηρήθηκε ότι συνέβαλλαν θετικά στην ανάπτυξη του *B. longum* έπειτα από 24 ώρες επώσης, δίχως όμως να πλησιάζει το επίπεδο ανάπτυξης των λακτοβακίλλων. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός παρουσιάζεται στην επέμβαση με τη καρποφορία από πριονίδι με 50% κλαδέματα ελιάς.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη συμβολή των β-γλυκανών μυκήτων στην ανάπτυξη προβιοτικών μικροοργανισμών. Η πρώτη *in vitro* μελέτη αφορούσε τους πολυσακχαρίτες από τις καρποφορίες του *P. ostreatus* και του *P. eryngii*. Οι Synytsya *et al.* (2009) αφού εξήγαγαν τους πολυσακχαρίτες από τις καρποφορίες, εξέτασαν την ανάπτυξη τεσσάρων στελεχών λακτοβακίλλων, τριών μπιφιδοβακτηρίων και δύο εντερόκοκκων μέσω του προσδιορισμού του ρυθμού ανάπτυξης και της οπτικής πυκνότητας. Διαπίστωσαν ότι

τα διαφορετικά εκχυλίσματα προήγαγαν την ανάπτυξη διαφορετικών στελεχών, με αυτά που προέρχονται από το *P. ostreatus* να είναι ιδιαίτερα ευνοϊκά για την ανάπτυξη των λακτοβακίλλων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη παρούσα εργασία, όπου ανεξαρτήτου του στερεού υποστρώματος που είχαν αναπτυχθεί οι καρποφορίες του *P. ostreatus* αύξησαν το πληθυσμό των λακτοβακίλλων. Αντίθετα, η ανάπτυξη στα μπιφιδοβακτήρια εξαρτήθηκε από το είδος του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε, όπου παρατηρείται στη παρούσα μελέτη πως μόνο το *B. longum* μπορεί να μεταβολίσει τα μανιτάρια αυτά. Ανάλογα, θετική ανάπτυξη στα *Lactobacillus brevis* και *Bifidobacterium longum* παρατηρήθηκε και σε 24ωρη επώαση με β-γλυκάνες από καρποφορίες των *Poria cocos* και *Polyporus rhinoceros*, κάτι που εξετάστηκε σε αντίστοιχη μελέτη, ενώ η καρποφορία του *Poria cocos* έδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του *Clostridium celatum* ενός παθογόνου του εντέρου (Gao et al., 2009).

Οι καρποφορίες του *Ganoderma lucidum* συνέβαλλαν στην ανάπτυξη όλων των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν στη παρούσα έρευνα, το οποίο αντιτίθεται με τα αποτελέσματα των Mohd Hamim et al. (2010) και Yamin et al. (2012). Πιο συγκεκριμένα, οι Mohd Hamim et al. (2010) εξέτασαν την ανάπτυξη των *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *B. longum* και *B. pseudocatenulatum* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τους πολυσακχαρίτες που εκχύλισαν από το *G. lucidum* και διαπίστωσαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αυτών των προβιοτικών οργανισμών. Επίσης, οι Yamin et al. (2012) μελέτησαν την ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων με τη χρήση ποσοτικής PCR με μοναδική πηγή άνθρακα τους πολυσακχαρίτες από το *G. lucidum*, και διαπίστωσαν ότι οι τελευταίοι αυξάνουν το πληθυσμό τόσο των μπιφιδοβακτηρίων όσο και των λακτοβακίλλων.

Αργότερα, οι Zhao and Cheung (2011) εξέτασαν τη μεταβολή του pH και τη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας κατά τη διάρκεια της επώασης για την ανάπτυξη μπιφιδοβακτηρίων (*B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*) σε β-γλυκάνες διαφορετικής προέλευσης. Χρησιμοποίησαν πολυσακχαρίτες που προέρχονταν από κριθάρι, βακτήριο (*Alcaligenes faecalis*), φύκος (*Laminaria digitata*) και μανιτάρι (*Pleurotus tuber-regium*). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όλα τα μπιφιδοβακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις β-γλυκάνες ως υπόστρωμα ζύμωσης σε σύγκριση με την ινουλίνη, σε αντίθεση με τη παρούσα μελέτη όπου δεν υπήρχε ικανοποιητική ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων σε κανένα στέλεχος. Επίσης, το *B. infantis* παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή ανάπτυξη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Οι ίδιοι συγγραφείς αργότερα εξέτασαν το μεταβολικό

μονοπάτι μου χρησιμοποιεί το *B. infantis* για να μεταβολίσει τις διαφορετικές πηγές άνθρακα που αναφέρθηκαν και προηγούμενως (Zhao and Cheung, 2013).

Τέλος, εντελώς διαφορετική προσέγγιση ακολουθήθηκε από μελετητές για το προσδιορισμό της χρήσης των β-γλυκανών από τους στύπους των *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* και *Flammulina velutipes*, ως πηγή άνθρακα για τη διατήρηση των πληθυσμών των *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbruecki sub. bulgaricus*, *B. longum* και *S. thermophilus* στη συντήρηση. Έτσι, συμπέραναν πως οι πολυσακχαρίτες από το στύπο της *Flammulina velutipes* έδρασαν θετικά στη διατήρηση των πληθυσμών του *L. acidophilus* και του *L. casei* σε επίπεδα 10^7 CFU/ml για 21 ημέρες στη συντήρηση (Chou *et al.*, 2013). Αντίστοιχα θετικά ήταν και τα αποτελέσματα από τη παρούσα μελέτη για την ανάπτυξη του *L. acidophilus* στα μυκήλια αυτών των βασιδιομυκήτων.

Προτείνεται η μελέτη να επεκταθεί και σε άλλους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, όπως επίσης και σε μικτούς πληθυσμούς από την εντερική μικροχλωρίδα εθελοντών. Επιπροσθέτως, μείζονος σημασίας αποτελεί η πραγματοποίηση και κάποιων *in vivo* μελετών για τη περαιτέρω αξιολόγηση των β-γλυκανών των μυκήτων ως πρεβιοτικές ενώσεις.

Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα συμπεραίνουμε τα κάτωθι:

- Τα τρία στελέχη των μυκήτων λευκών σήψης (*P. ostreatus* IK 1123, *Ganoderma lucidum* VK-7400, *G. lucidum* LGAM 9720) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτοξικοποίηση υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιοτριβείου διότι κατόρθωσαν να μειώσουν περίπου κατά το ήμισυ το ολικό φαινολικό φορτίο και το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο σε υγρές καλλιέργειες με συγκέντρωση 25%.
- Για τον αποχρωματισμό του υγρού αποβλήτου και την αύξηση της βλαστικότητας τα τρία αυτά στελέχη πρέπει να καλλιεργηθούν σε 12,5% συγκέντρωση για να αποδώσουν το βέλτιστο αποτέλεσμα.
- Διαφορετικές ενζυμικές οδούς ακολούθησαν το *P. ostreatus* και το *G. lucidum* VK-7400 από το *G. lucidum* LGAM 9720 για την αποτοξικοποίηση του υγρού αποβλήτου. Στα πρώτα παρατηρήθηκε κυρίως ενεργότητα λακκάσης, ενώ στο άλλο της εξαρτημένης του μαγγανίου υπεροξειδάσης.
- Η χρήση διφασικού αποβλήτου και κλαδεμάτων ελιάς σε συγκέντρωση έως και 50% σε μείγμα με άχυρο σίτου στα στερεά υποστρώματα δεν επηρέασε δυσμενώς τη μυκηλιακή ανάπτυξη και τη βιολογική αποδοτικότητα του *P. ostreatus* IK 1123, με αποτέλεσμα να μπορούν να αντικαταστήσουν το συμβατικό υπόστρωμα.
- Ακόμη πιο ευπροσάρμοστα στα εναλλακτικά υποστρώματα που εξετάστηκαν φαίνεται να ήταν το *G. lucidum* VK-7400, αφού δεν εμφάνισε διαφορές στη μυκηλιακή ανάπτυξη και στην παραγωγή καρποφοριών σε εμπλουτισμένα υποστρώματα πριονιδιού οξιάς με μέχρι και 75% διφασικό απόβλητο ή κλαδέματα ελιάς.
- Αποδείχθηκε ότι ο τύπος του στερεού υποστρώματος στο οποίο αναπτύχθηκαν τα δύο στελέχη επηρέασε τη σύσταση των καρποφοριών τους, με αποτέλεσμα οι καρποφορίες του *G. lucidum* VK-7400 που αναπτύχθηκαν σε 50% διφασικό απόβλητο να παρουσιάζουν αυξημένη περιεκτικότητα τέφρας και ολικών ινωδών ουσιών και σε 25% διφασικό απόβλητο αυξημένη περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών. Ενώ το *G. lucidum* LGAM 9720 παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά τέφρας και ολικών ινωδών ουσιών σε αυτά

που προήλθαν από 75% κλαδέματα ελιάς και 25% κλαδέματα αντίστοιχα και από 50% διφασικό απόβλητο αυξημένη περιεκτικότητα ολικών πρωτεϊνών.

- Η χρήση των μυκηλίων ως μοναδική πηγή C στο υπόστρωμα καλλιέργειας του προβιοτικού οργανισμού *Lactobacillus acidophilus* είχε θετικά αποτελέσματα, με τα μυκήλια από τα *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *Lentinus lepideus* και *Flammulina velutipes* να εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή ανάπτυξη.
- Ακόμη, οι καρποφορίες των *P. ostreatus*, *P. ostreatus* IK 1123 και της *Agrocybe cylindracea* παρουσίασαν θετική επίδραση στην αύξηση του *L. acidophilus*
- Η ανάπτυξη των δύο λακτοβακίλλων που μελετήθηκαν σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* είναι στα ίδια ή και σε ευνοϊκότερα επίπεδα από τον μάρτυρα (MRS), χωρίς οι διαφορές να είναι σημαντικές πάντα.
- Αντίθετα, τα *B. bifidum* και *B. longum* εμφάνισαν μικρότερη ή ίση ανάπτυξη από τον μάρτυρα (mMRS) σε υποστρώματα με μοναδική πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus*
- Το καλλιεργητικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκαν τα μανιτάρια των *P. ostreatus* IK 1123 και *G. lucidum* LGAM 9720 δεν επηρέασε την ανάπτυξη των *L. gasseri* και *B. bifidum*
- Αντίθετα, τα εμπλουτισμένα υποστρώματα με διφασικό απόβλητο ή με κλαδέματα ελιάς για την καλλιέργεια των μανιταριών σε σχέση με τα κλασικά υποστρώματα, φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη του *L. acidophilus*, χωρίς όμως οι διαφορές στην αύξηση να είναι σημαντικές.
- Τέλος, ομοίως η ανάπτυξη του *Bifidobacterium longum* σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα καρποφορίες των βασιδιομυκήτων *G. lucidum* 9720 και *P. ostreatus* που προήλθαν από εμπλουτισμένα υποστρώματα με κλαδέματα ελιάς ευνοούν την αύξηση του βακτηρίου.

Βιβλιογραφία

- Αρέθας Α., (1999), Το άθερμο ελαιόλαδο. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"* σελ.153-156. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα
- Βέρβερη Μ., (2004), Σύστημα διαχείρισης αποβλήτων ελαιουργείων Γέρας. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη
- Γεωργακάκης Δ., (1994), Διαχείριση υγρών αποβλήτων ελαιотριβείων πριν από την βιολογική τους επεξεργασία. Ερευνητικό Πρόγραμμα Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Εθνική τράπεζα, (2011), Ελαιόλαδο: Προώθηση ποιότητας μέσω συγκέντρωσης και τυποποίησης, κλαδική μελέτη.
- Ζερβάκης Γ., (2010), Στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις στα πλαίσια του μαθήματος "Βιοτεχνολογία Μικροοργανισμών". ΓΠΑ, Αθήνα
- Ζερβάκης Γ., (2011), Εισαγωγή στη Μυκητολογία. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις στα πλαίσια του μαθήματος "Γενική Μικροβιολογία". ΓΠΑ, Αθήνα
- Θεριός Ι., (2005), *Ελαιοκομία*. Εκδόσεις Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη
- Καρποδίνη-Δημητριάδη Ε.,(1999), Η παραγωγή και η κατανάλωση ελαιολάδου. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"*, σελ.297-319. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα
- Κυδώνη Α., (1999), Το λάδι στα ψιμύθια των γυναικών στη νεότερη Ελλάδα. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"*, σελ.231-235. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα
- Κυριακόπουλος Χ., (2005), Η αποδόμηση των υγρών αποβλήτων των ελαιотριβείων στο έδαφος. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα
- Μουζάκης Σ., (1999), Υπόσκαφο ελαιотριβείο σε ελληνόφωνα χωριά της Κάτω Ιταλίας-Πρόδρομη παρουσίαση. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"*, σελ.95-102. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα
- Μπαλατσούρας Γ., (1997), Σύγχρονη ελαιοκομία - Το ελαιόλαδο. Ιδιωτική έκδοση, Αθήνα

Οικονόμου Α., (1999), Η ελιά και το λάδι στην παραδοσιακή κοινωνία της Λακωνίας. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"*, σελ.236-249. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα

Ποντίκης Κ.,(2000), *Ειδική Δενδροκομία - Ελαιοκομία*. Εκδόσεις Αθαν. Σταμούλης, Αθήνα
Φακλάρης Π.Α. και Σταματοπούλου Β.Γ.,(1999), Η ελιά και το λάδι στην αρχαία Ελλάδα. *Πρακτικά διεθνούς συνεδρίου "Η ελιά και το λάδι από την αρχαιότητα έως σήμερα"*, σελ.33-47. Επιμελητές Αικ. Πολυμέρου - Καμηλάκη, Π. Καμηλάκης, Λ. Καραπιδάκη. Ακαδημία Αθηνών, Αθήνα

Χρυσοβαλάντου Ν. (2010), Αξιολόγηση τριφασικής και διφασικής μεθόδου ελαιοποίησης του ελαιοκάρπου. Μεταπτυχιακή εργασία, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα

Fooks R., (1995), *Το βιβλίο της ελιάς*. Εκδόσεις Ψυχάλου, Αθήνα

Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F. and Ozer A., (2004), A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 34, pp. 209-247

Aggelis G., Ehaliotis C., Nerud F., Stoychev I., Lyberatos G. and Zervakis G., (2002), Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 59, pp. 353-360

Aida F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M. and Maaruf A.G., (2009), Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 20, pp. 567-575

Aktas E.S., Imre S. and Ersoy L., (2001), Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, Vol. 35, pp. 2336-2340

Alexopoulos C.J., Mims C.W. and Blackwell M., (1996), *Introductory mycology*. 4 th ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 868

Andersson H., Asp N., Bruce A., Roos S., Wadstrom T. and Wold A.E., (2001), Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Nutrition*, Vol. 45, pp. 58-75

Arjona R., Garcia A. and Ollero P., (1999), The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering*, Vol. 41, pp. 229-234

- Bano Z. and Rajarathnam S., (1988), Pleurotus mushrooms. Part II, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.27, pp. 87–158
- Boh B., Berovic M., Zhang J. and Zhi-Bin L., (2007), *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, Vol. 13, pp. 1387-2656
- Borja R, Rincon B., Raposo F., Alba J. and Martin A., (2003), Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 15, pp. 139-145
- Borja R., Sanchez E., Raposo F., Rincon B., Jimenez A.M. and Martin A., (2006), A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in an evaporation pond. *Waste Management*, Vol. 26, pp. 447-486
- Bourbonnais R. and Paice M.G., (1990), Oxidation of non-phenolic substrates . An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, Vol.267, pp.99-102
- Briante R., Patumi M., Febbraio F. and Nucci R., (2004), Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, Vol. 111, pp. 67-77
- Brozzoli V., Bartocci S., Terramoccia S, Conto G., Federici F., D'Annibale A. and Petruccioli M., (2010), Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.46, pp.223-228
- Cardoso S.M., Coimbra M.A. and Lopes Da Silva J.A., (2003), Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 52, pp.125-133
- Caputo A.C., Scacchia F. and Pelagagge P., (2003), Disposal of by-products in olive oil industry: waste to energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, Vol. 23, pp. 197-214
- Cayuela M.L., Sánchez-Monedero M.A. and Roig A., (2006) Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry*, Vol 41, pp. 616-623
- Celma A.R., Rojas S. and Lopez-Rodriguez F., (2007), Waste to energy possibilities for industrial olive and grape by-products in Extremadura. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 31, pp. 522-534

- Chatzipavlidis, J., Antonakou, M., Demou, D., Flouri, F. and Balis, C., (1996), Bio-fertilization of olive oil mills liquid wastes. The pilot plant in Messinia, Greece. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 38, 183-187.
- Chou W.T., Sheih I.C. and Fang T.J., (2013), The Applications of Polysaccharides from Various Mushroom Wastes as Prebiotics in Different Systems. *Journal of Food Science*, Vol. 00, pp. M1-M8
- Conde E., Cara C., Moure A., Ruiz E., Castro E. and Dominguez H., (2009), Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, Vol. 114, pp. 806-812
- D'Aimmo M., R., Modesto M., Biavati B., (2007), Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products.
- Deacon J., (2006), *Fungal biology*. Blackwell, Oxford - United Kingdom, pp. 371
- De Man J.C., Rogosa M. and Sharpe M.E., (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 23, pp. 130-135
- Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsou M., Mari I., Balis C., (1999), Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 301-311.
- Ehaliotis, C., Zervakis, G., Anoliefo, O., Papadopoulou, K and Kardimaki, A. (2003). The capacity of agricultural soils to auto-regulate bioremediation of olive-mill waste water. In *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*, pp. 353-358. Edited by V. Sasek, J.A. Glaser & P. Baveye (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ei N. S. and Karakaya Sibel, (2009), Olive tree (*Olea europea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, Vol. 67, pp. 632-638
- Fadiloglu S., Ciftci O.N. and Gogus F., (2003), Reduction of free fatty acid content of olive-pomace oil by enzymatic glycerolysis. *Food Science and Technology International*, Vol. 9, pp. 11-15
- Fan L., Pandey A., Mohan R. and Soccol C.R., (2000), Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Acta Biotechnologica*, Vol. 20, pp. 41-52

- Fan L., Pandey A. and Soccol C.R., (2001), Production of *Flammumina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 44
- Fan L, Soccol C.R, Pandey A., (2008), Mushroom production. In: Current developments in solid-state fermentation. Springer Science and Business Media, New York, pp 253–274
- Flood J., Bridge B.D. and Holderness M., (2000), Ganoderma diseases of Perennial Crops. Wallingford United Kingdom, pp.279
- Gao S., Lai C.K.M and Cheung P.C.K., (2009), Nondigestible Carbohydrates Isolated from Medicinal Mushrooms *Sclerotia* as Novel Prebiotics. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, Vol. 11, pp. 1-8
- Gonzalez-Matute R., Figla D., Devalis R., Delmastro S. and Curvetto N., (2002), Sunflower seed hulls as a main nutrient source cultivating *Ganoderma lucidum*. *Mycologia Aplicada International*, Vol. 14, pp. 19-24
- Giannoutsou E.P., Katsifas E.A., Geli A. and Karagouni A.D., (2012), Protein increase and lysine production by a *Paecilomyces variotii* strain grown on two-phase olive mill waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.28, pp. 849-856
- Gibson G.R. and Roberfroid M. B., (1995), Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Vol. 125, pp. 1401-1412
- Gibson G.R. Probert H.M., Van Loo J., and Roberfroid M.B., (2004), Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, Vol. 17, pp. 259-275
- Gregori A., Svagelj M. and Pohleven J., (2007), Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 45, pp. 238-249
- Gregoriou C., (2001), Olives and olive oil in Cyprus. In Proceedings of the *Mediterranean Conference for Agricultural Research Cooperation*, pp. 437-445. B. Hervieu, N. Maraveyas, S. Vizantinopoulos. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα.
- Haddadin M.S., Al-Natour R., Al-Qsous S. and Robinson R.K., (2002), Biodegradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of basidiomycete. *Bioresource Technology*, Vol. 82, pp. 131-137
- Hattaka A., (1994), Lignin- modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 13, pp. 125-135

Henneberg W. and Stohmann F., (1864), Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer I & II. Braunschweig.

Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. and Schillinger U., (2001), Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, pp. 365S-373S

Hsieh C. and Yang F.C., (2004), Reusing soy residue for the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, Vol. 91, pp. 105-109

Joffraud J.J., Leroi F., Roy C. and Berdague J.L.,(2001), Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 66, pp.175-184

Jurado F., Cano A. and Caprio J., (2003), Modelling of combined cycle power plants using biomass. *Renewable Energy*, Vol. 28, pp. 743-753

Kalmis E. and Sargin S., (2004), Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat substrates containing olive waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 53, pp. 43-47

Kalmis E., Azbar N., Yildiz H. and Kalyoncu F., (2008), Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology*, Vol. 99, pp. 164-169

Kirk T. K., Farrell R.L., (1987), Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 41, pp. 465-505

Klaenhammer TR, Kullen M.,(1999), Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.50, pp.45-57.

Kotsou M., Mari I., Lazaridi K., Chatzipavlidis I., Balis C. and Kyriacou A., (2004), The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, Vol. 26, pp. 113-121.

Kues U. and Liu Y., (2000), Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 54, pp. 141-152

Krokida M. K, Maroulis Z. B. and Kremalis C., (2002), Process design of rotary dryers for olive cake. *Drying Technology*, Vol. 20, pp. 771-787

- Lagioudanaki E., Manios T., Geniatakis M., Frantzeskaki N. and Manios V., (2003), Odor control in evaporation ponds treating olive mill wastewater through the use of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. *Journal of Environmental Science and Health*, Vol. A38, pp. 2537-2547
- Lakhtar H., Mustapha I.A., Philippoussis A., Perraud-Gaime I. and Roussos S., (2010), Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Vol. 64, pp. 167-172
- Lopez-Pineiro A., Albarran A., Rato – Nunes J.M. and Baretto C., (2008), Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid mediterranean conditions. *Bioresource Technology*, Vol. 99, pp. 7982-7987
- Loumou A. and Giourga C., (2003), Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean”, *Agriculture and Human Values*. Vol.20, pp. 87-95
- Macfarlane S., Macfarlane G.T. and Cummings H., (2006), Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 24, pp. 701-714
- Mane V.P., Patil S.S., Syed A.A. and Baig M.M.V., (2007), Bioconversion of low quality lignocellulosic agricultural waste into edible protein by *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Vol. 8, pp.745-751
- Mendil, D., Uluozlu, O.D., Hasdemir, E., and Caglar, A., (2004), Determination of trace elements of some wild edible mushroom samples from Kastanomou, Turkey. *Food Chemistry*, Vol.88, pp.281-285
- Michelakis N., (2001), Trends, problems and perspectives in olive oil production, consumption and marketing in Greece. In Proceedings of the *Mediterranean Conference for Agricultural Research Cooperation*, pp. 463-475. B. Hervieu, N. Maraveyas, S. Vizantinopoulos., Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα.
- Mohd Hamim H.M., Shuhaimi M., Yazid A.M., Alli A.M., Anas O.M., Asilah A.T., Wahab M. N. and Sukor M. Y. A., (2010), Growth of probiotic bacteria in trypticase phytone yeast medium supplemented with crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol. 6, pp. 47-56

- Nasini L., Gigliotti G., Balduccini M.A., Federici E., Cenci G. and Proietti P., (2013), Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 164, pp.292-297
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautová, V. and Zervakis, G.I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88, 620-626.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. and Stockmann R., (2005), Bioactivity and analysis of biophenols recovered of olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 823-837
- Ouzounidou, G., Zervakis, G.I. and Gaitis, F. (2010). Raw and microbiologically detoxified olive mill waste and their impact on plant growth. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology* 4, 21-38.
- Pagnanelli F., Mainelli S., Veglio F. and Toro L., (2003), Heavy metal removal by olive pomace: biosorbent characterization and equilibrium modelling. *Chemical Engineering Science*, Vol. 58, pp. 4709-4717
- Peksen A. and Yakupoglu G., (2009), Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.25, pp. 611-618
- Philippoussis A., Zervakis G. and Diamantopoulou P., (2001), Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 17, pp. 191-200
- Pointing S.P., (2001), Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 57, pp.20-33
- Rajaratnam S., Bano Z. and Miles P.G., (1987), *Pleurotus* mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 22, pp. 157-223
- Reverberi M., Di Mario F. and Tomati U., (2004), β -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbial and Cell Biology*, Vol. 66, pp. 217-225
- Rinaldi M., Rana G. and Introna M., (2003), Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research*, Vol. 84, pp. 319-326

- Roberfroid M., (2007), Prebiotics: The concept revisited. *The Journal of Nutrition*, pp. 831-837
- Roig A., Cayuela M.L. and Sanchez-Monedero M.A., (2006), An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, Vol. 26, pp. 960-969
- Rop O., Mlcek J. and Jurikova T., (2009), Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, Vol. 67, pp. 624-631
- Ruiz-Rodriguez A., Soler-Rivas C., Polonia I. and Wichers H.J., (2010), Effect of olive mill waste (OMW) supplementation to Oyster mushrooms substrates on the cultivation parameters and fruiting bodies quality. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 64, pp. 638-645
- Salmones D., Mata G. and Waliszewski K.N., (2005), Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, Vol.96, pp. 537-544
- Sampedro I., Marinari S., D'Annibale A., Grego S., Ocampo J.A. and Garcia-Romera I., (2007), Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by waste colonized by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 60, pp. 116-125
- Schezenmeir J. and Verese M., (2001), Probiotics, Prebiotics, Synbiotics - Approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, pp. 361S-364S
- Shell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwalen M.C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R.D. and Arigoni F., (2002), The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, Vol. 99, pp. 14422-14427
- Skoulou V. and Zabaniotou A., (2007), Investigation of agriculture and animal wastes in Greece and their allocation to potential application for energy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 11., pp.1698-1719
- Spinelli R. and Picchi G.,(2010), Industrial harvesting of olive tree pruning residue for energy biomass. *Biosource Technology*, Vol.101, pp.730-735
- Stamets P., (2000), Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. USA, pp. 386
- Synytsya A., Mickova K., Synytsya A., Jablonsky I., Spevacek J., Erban V., Kovarikova E. and Copikova J., (2009), Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus*

- ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 76, pp. 548-556
- Terral J. and Genevieve A., (1996), Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Research*, Vol.46, pp. 176-185
- Thompson R.B. and Nogales R., (1999), Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermicomposted and unprocessed dry olive cake (orujo seco) produced from two stage centrifugation for olive oil extraction. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, Vol. 34, pp.917-928
- Tien M. and Kirk K., (1984), Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂- requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy Sciences*, Vol. 81, pp. 2280-2284
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. and Aggelis G., (2002), Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, Vol. 84, pp. 251-257
- Tong H., Xia F., Feng K., Sun G., Gao X., Sun L., Jiang R., Tian D. and Sun X., (2009), Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 1682-1686
- Wang Y., (2009), Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, Vol. 42, pp. 8-12
- Waterman P.G and Mole S., (1994), Analysis of phenolic plant metabolites. Lawton JH, *Methods in ecology*, Oxford, pp 83–85
- Volman J.J., Helsper J.P.F.G., Wei S., Baars J.J.P., Van Griensven L.J.L.D., Sonnenberg A.S.M., Mensink R.P. and Plat J., (2009), Effects of mushroom-derived of β -glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor- κ B transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure? *Molecular Nutrition and Food Research*, Vol. 53, pp.1-9
- Yamin S., Shuhaimi M., Arbakariya A., Fatimah A.B., Khalilah A.K., Anas O. and Yazid A. M., (2012), Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *Bifidobacterium* spp. as assessed using Real-time PCR. *International Food Research Journal*, Vol. 19, pp. 1199-1205

- Yesilada O., Sik S. and Sam M.,(1999), Treatment of olive oil mill wastewater with Fungi. *Turkish Journal of Biology*, Vol 23, pp. 231-240
- Zervakis, G. and Balis, C. (1996a). Bioremediation of olive oil mill wastes through the production of fungal biomass. In *Proceedings of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, pp. 311-323. Edited by D. Royse. Pennsylvania.
- Zervakis G. and Balis C., (1996b), A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research*, Vol. 100, pp. 717-731
- Zervakis G., Yiatras P. and Balis C., (1996), Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, pp. 237-243
- Zervakis G., Philippoussis A., Ioannidou S. and Diamantopoulou P., (2001), Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, Vol.46, pp. 231-234
- Zervakis, G.I., Ntougias, S., Ouzounidou, G. and Gaitis, F. (2011). Treatment of two-phase olive mill wastes through commercial-scale composting and evaluation of the end-product for agricultural use. In *Proceedings of the 12th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST2011)*, pp. A2083-A2089. Global NEST. Rhodes, Greece.
- Zhao J. and Cheung C.K., (2011), Fermentation of β -Glucans derived from different sources by Bifidobacteria: Evaluation of their bifidogenic effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, pp. 5986-5992
- Zhao J. and Cheung C.K., (2013), Comparative Proteome Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp.*infantis* Grown on β -Glucans from Different Sources and a Model for Their Utilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 61, pp. 4360-4370
- Zucconi F, Peta A, Forte M, De Bertoldi M., (1981), Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*, Vol. 22, pp.54–57

Παράρτημα

Παράρτημα

Πίνακας 1: Σύνολο καλλιεργούμενης έκτασης ελιών παραγωγής ελαιολάδου ανά 1000 εκτάρια σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Eurostat, 2013

Χώρες	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Ελλάδα	713,3	712,7	712,8	712,8	712,8		750,9	808,3	
Ισπανία	2293,5	2298,5	2313,9	2299,3			2309,5	2330,4	
Ιταλία							1141,4	1134,9	
Κύπρος	10,6	11,5	13	6,7	8,2	9,4	9,3	8,7	8,7
Τουρκία	482	491	518,2	545,9	562			576	

Πίνακας 2: Διακύμανση της παραγωγής ελαιολάδου σε μερικές χώρες της Ευρώπης από το 2008-2013 σε 1000 tn, Πηγή: <http://www.internationaloliveoil.org>

Περίοδος	Ισπανία	Ιταλία	Ελλάδα	Πορτογαλία	Κύπρος
2003-2004	1412	685	308	31,2	7
2004-2005	989,8	879	435	41,2	7,5
2005-2006	825,9	636,5	420	29,1	7,2
2006-2007	1111,4	490	370	47,5	8,3
2007-2008	1236,1	510	327,2	36,3	4
2008-2009	1030	540	305	53,4	2,8
2009-2010	1401,5	430	320	62,5	4,2
2010-2011	1391,9	440	301	62,9	6,5
2011-2012	1613,4	450	295	76,2	5,6
2012-2013	820	490	350	68,6	5,6

Πίνακας 3: Διακύμανση της κατανάλωσης ελαιολάδου σε μερικές χώρες της Ευρώπης από το 2009-2013 σε 1000 tn, Πηγή: <http://www.internationaloliveoil.org>

Χώρες Ε.Ε	2009-2010	2010-2011	2011-2012	2012-2013
Κύπρος	5	6,5	6,3	6,3
Ισπανία	539,4	554,2	582,1	550
Γαλλία	114,8	112,8	111,2	112,5
Ελλάδα	228,5	227,5	212,5	208
Ιταλία	675,7	660	724,5	695
Πορτογαλία	87,8	82	73,8	73,8
Σλοβενία	2	2,1	2,1	2,6
Γερμανία	50,1	58,8	55,9	59
Αυστρία	8,9	8,7	8,7	8,7
Βέλγιο	12,3	13,7	14,3	13,4
Ολλανδία	27,2	16,3	16,5	16,8
Ηνωμένο Βασίλειο	55,3	69,5	57,7	57,7

Παράρτημα

Πίνακας 4: Γεωγραφική κατανομή των ελαιοτριβείων στον Ελλαδικό χώρο, Ελαιόλαδο-Πυρηνέλαιο, Κλαδική μελέτη ICAP, 2007, Αθήνα

Νομός	Αριθμός επιχειρήσεων	Νομός	Αριθμός επιχειρήσεων
Αιτωλοακαρνανίας	54	Δράμας	1
Αργολίδας	49	Θεσσαλονίκης	1
Αρκαδίας	16	Καβάλας	8
Αχαΐας	78	Πέλλας	1
Ηλείας	113	Φθιώτιδας	45
Κορινθίας	64	Περίας	2
Λακωνίας	63	Σερρών	5
Μεσσηνίας	192	Χαλκιδικής	30
Ζακύνθου	47	Φωκίδας	5
Κέρκυρας	68	Έβρου	4
Κεφαλληνίας	11	Ξάνθης	1
Λευκάδας	11	Δωδεκανήσου	16
Βοιωτίας	22	Κυκλάδων	15
Άρτας	5	Λέσβου	20
Θεσπρωτίας	22	Σάμου	9
Πρέβεζας	33	Χίου	12
Εύβοιας	54	Ηρακλείου	114
Λάρισας	14	Λασιθίου	42
Μαγνησίας	29	Ρεθύμνης	41
Τρικάλων	3	Χανίων	72
Ευρυτανίας	1	Αττικής	31

Πίνακας 5: Κύρια χημικά χαρακτηριστικά των διφασικών αποβλήτων, Roig *et al.*, 2006

Παράμετροι	Περιεκτικότητα
Σχετική υγρασία (%)	61,8
pH	4,9
Ηλεκτρική αγωγιμότητα ($dS\ m^{-1}$)	1,78
C/N	53
Φαινόλες (%)	0,54

Παράρτημα

Πίνακας 6: Κύρια χημικά χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων τριφασικού ελαιοτριβείου, Azbar *et al.*, 2004 και Ntougias *et al.*, 2012

Παράμετροι	Περιεκτικότητα
<i>Ολικά στερεά (gr/l)</i>	1-102,5
<i>Οργανικά ολικά στερεά (gr/l)</i>	16,7-81,6
<i>pH</i>	3-5,9
<i>Λίπη (gr/l)</i>	1-23
<i>Πολυφαινόλες (gr/l)</i>	0,0002-80
<i>Ολικό άζωτο (gr/l)</i>	0,3-1,2
<i>COD (gr/l)</i>	40-220
<i>BOD₅ (gr/l)</i>	23-100
<i>TOC (gr/L)</i>	23
<i>P₂O₅ (gr/L)</i>	0.26
<i>K₂O (gr/L)</i>	1.98

Πίνακας 7: Επιλεγμένα είδη βασιδιομυκήτων τα οποία περιέχουν βιολογικά ενεργές β-γλυκάνες, Otakar *et al.*, 2009

Βασιδιομύκητας	Όνομα β-γλυκάνης
<i>Pleurotus spp.</i>	Pleuran
<i>Lentinus edodes</i>	Lentinan
<i>Schizophyllum commune</i>	Schizophylan
<i>Ganoderma lucidum</i>	Gl-1
<i>Trametes versicolor</i>	Krestin
<i>Grifola fondosa</i>	Grifolan
<i>Flammulina velutipes</i>	Flammulin

Πίνακας 8: Μικροοργανισμοί που θεωρούνται προβιοτικοί, Holzzapfel et al., 2001

Είδη του γένους Lactobacillus	Είδη του γένους Bifidobacterium	Άλλα βακτήρια γαλακτικού οξέος	Βακτήρια μη γαλακτικού οξέος
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain <i>nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus</i> <i>inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			