

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

**ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή
του ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Μελέτη της παραγωγής μυκηλιακής μάζας, ενζύμων
και βιολογικών ενεργών μεταβολικών προϊόντων κατά
την αύξηση μυκήτων σε υπολείμματα και παραπροϊόντα
της βιομηχανίας τροφίμων»*

Επιβλέπων:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

Αικατερίνη Κ. Παπαδάκη

ΑΘΗΝΑ 2013

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής μυκηλιακής μάζας, ενζύμων και βιολογικών ενεργών μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση μυκήτων σε υπολείμματα και παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων»

Εξεταστική Επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολος, Λέκτορας
Παπανικολάου Σεραφείμ, Επίκουρος Καθηγητής
Φιλιπούσης Αντώνης, Τακτικός Ερευνητής

Επιβλέπων:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

Αικατερίνη Κ. Παπαδάκη

ΑΘΗΝΑ 2013

*Στους γονείς μου, Κωστή & Φωτεινή
στα αδέρφια μου, Μαρία & Γιάννη
στον παππού μου, Παναγιώτη*

«Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έγινε στο πλαίσιο της υλοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών Ι.Κ.Υ. με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ. έτους 2011-2012 » από πόρους του Ε.Π. «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ, του 2007-2013»

Ευχαριστίες

Με αφορμή την παρούσα μελέτη μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ με δύο εξαιρετικές ερευνητικές ομάδες, αυτήν του εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων στον ΕΛ.ΓΟ.-ΔΗΜΗΤΡΑ και του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων σε συνεργασία με το εργαστήριο Μηχανικής και Συντήρησης Τροφίμων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Επίκουρο Καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε και δείχνει στο πρόσωπό μου, αλλά κυρίως για τη συνεχή στήριξή του καθ' όλη την μελέτη. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Τακτικό Ερευνητή Δρ. Αντώνη Φιλιππούση και την Ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα Δρ. Σάντη Διαμαντοπούλου για την καθοδήγηση και την αμέριστη υποστήριξή τους κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, μα πάνω από όλα για όλα όσα μου δίδαξαν έως τώρα για την έρευνα. Δε θα μπορούσα να παραλείψω τον Λέκτορα Αποστόλη Κουτίνα που από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας με εμπιστεύθηκε και πίστεψε σε εμένα και στις δυνατότητές μου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ελευθέριο Δροσινό για όλες εκείνες τις προσπάθειες που κάνει για να στηρίζει τα όνειρα των «μικρών» ερευνητών. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Νικόλαο Κοψαχείλη για την βοήθειά του αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Τους υποψήφιους διδάκτορες Βάσω Καχριμανίδου και Βαγγέλη Ξενόπουλο για την άριστη συνεργασία μας στον εργαστηριακό χώρο. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την συμπαράστασή τους και στον Ιγνάτιο για την ανιδιοτελή υποστήριξη που μου προσφέρει κάθε ημέρα της ζωής μου.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη διαφόρων υπολειμμάτων και υποπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων ως υποστρώματα για την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ειδικότερα, διερευνήθηκαν οι προοπτικές αξιοποίησης των στερεών υπολειμμάτων από την βιομηχανική οινοποίηση -στέμφυλα και οινολάσπη- και του τυρογάλακτος, μέσω της χρήσης μυκήτων του γένους *Pleurotus*, *Aspergillus* και *Mortierella* για την παραγωγή χρήσιμων ενζύμων και υψηλής αξίας μικροβιακού λίπους.

Αρχικά, μελετήθηκαν δύο είδη του γένους *Pleurotus*, τα *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* σε ζυμώσεις στερεής, ημι-στερεής και υγρής κατάστασης με υπόστρωμα τα στέμφυλα οινοποίησης. Η συγκριτική τους αξιολόγηση βασίστηκε στην ικανότητά τους να αξιοποιούν το υπόστρωμα αποδομώντας τα φαινολικά συστατικά, στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας και στην παραγωγή των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση. Οι μετρήσεις των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος έδειξαν ότι αυτοί οι μύκητες είναι ικανοί να διασπάσουν έως και το 80% των φαινολικών, ανεξαρτήτως του είδους του μύκητα και τις συνθήκες καλλιέργειας. Αντιθέτως, η παραγωγή της βιομάζας έδειξε ότι επηρεάζεται τόσο από το είδος του μύκητα όσο κι από το είδος της καλλιέργειας, καθώς οι μέγιστες τιμές (*P. pulmonarius*: 0,54 g/g ξ. υπ. και *P. ostreatus*: 0,50 g/g) σημειώθηκαν κατά την υγρή καλλιέργεια. Παρομοίως επηρεάστηκε και η παραγωγή των ενζύμων, καθώς η λακκάση έλαβε την μέγιστη τιμή της, περίπου 26.000 U/g, κατά την στερεή καλλιέργεια του *P. ostreatus* και η μεγαλύτερη ενεργότητα ενδογλυκανάσης, 96U/g, καταγράφηκε κατά την υγρή καλλιέργεια του ίδιου μύκητα. Στο τελευταίο πείραμα που αφορά στην αξιοποίηση των στεμφύλων πραγματοποιήθηκε στερεή καλλιέργεια των δύο μυκήτων προς παραγωγή μανιταριών με ικανοποιητική απόδοση που έφθασε το 14% για τον *P. pulmonarius*.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις στερεής κατάστασης με τον μύκητα *Aspergillus oryzae* για να αξιοποιηθεί το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών σε συνδυασμό με οινολάσπη, ως πλούσια πηγή αζώτου. Κατόπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών ζύμωσης διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων (~ 138 U/g) του εν λόγω μύκητα, επισυνέβη σε υπόστρωμα με αναλογία εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών:οινολάσπης 50:50, με αρχική υγρασία υποστρώματος 65% και στις 66 h ώρες ζύμωσης. Η

ικανότητα των πρωτεολυτικών αυτών ενζύμων μελετήθηκε πραγματοποιώντας ενζυμική υδρόλυση της οινολάσπης, με στόχο την παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN). Η μέγιστη παραγωγή FAN που επιτεύχθηκε ήταν 236 mg/L.

Στο τελευταίο πειραματικό στάδιο αυτής της μελέτης, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του υδρολύματος ως πηγή αζώτου σε συνδυασμό με μία χαμηλού κόστους πηγή άνθρακα, όπως είναι τα απόβλητα τυρογάλακτος μέσω υγρής ζύμωσης του μύκητα *Mortierella ramanniana*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δύο υγρές καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση 80 g/L λακτόζη και με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις FAN (160 και 200 mg/L). Η ζύμωση κατευθύνθηκε προς την παραγωγή λιπιδίων σημειώνοντας σημαντική συσσώρευση λίπους, ήτοι 8,2-8,6 g/L με περιεκτικότητα 0,29-0,35 g/g βιομάζας. Τέλος, από την πραγματοποίηση του ίδιου πειράματος σε βιοαντιδραστήρα το μικροβιακό λίπος και η περιεκτικότητά της βιομάζας ήταν 9,2-9,5 g/L και 0,30-0,36 g/g αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: μύκητες, στέμφυλα, οινολάσπη, τυρόγαλα, ένζυμα, μικροβιακό λίπος

Abstract

The aim of the present thesis was the study of various wastes derived from food industry as substrates for fungal growth and the production of high-added value products. In particular, the study was focused on the potential evaluation of solid winery wastes -grape pomace and wine lees- through the microbial fermentation by *Pleurotus*, *Aspergillus* and *Mortierella* species in order to produce enzymes and microbial oil.

At first, two *Pleurotus* species, *P. ostreatus* and *P. pulmonarius*, were studied during their solid-, semi solid-state and submerged fermentation on grape pomace as a substrate. The comparative evaluation between the species and the different fermentations was based on their ability to exploit the substrate via the consumption of phenolic compounds, the production of mycelia mass and enzyme production. Phenolic components measurements showed that these fungi was able to break up to 80%, regardless of the fungi species and culture conditions. Conversely, the production of biomass showed influenced of both species and culture conditions and the maximum values occurred (*P. pulmonarius*: 0.54 g/g d.b. and *P. ostreatus*: 0.50 g/g) in the submerged fermentation. The production of enzymes was similarly affected, laccase reached a maximum activity of 26.000U/g during the solid state fermentation of *P. ostreatus* and high endoglucanase activity was recorded at the submerged fermentation of the same fungi. In the last experiment, concerning the utilization of grape pomace, a solid state fermentation for mushroom production was conducted recording satisfactory yields (14% for *P. pulmonarius*).

In the following experiments solid state fermentations by *Aspergillus oryzae* were carried out in order to utilize the spent mushroom substrate in combination with wine lees, as a rich source of nitrogen. After optimization of fermentation conditions established that the maximum production of proteolytic enzymes (~138 U/g) occurred when the substrate ratio of spent mushroom substrate:wine lees was 50:50, at initial moisture 65% in 66 hours of the fermentation. The ability of these proteolytic enzymes was studied by performing enzymatic hydrolysis of wine lees, with the aim of producing a rich in free amino nitrogen (FAN) hydrolyzate. The highest production was 236 mg/L FAN.

In the last experimental phase of the present study, we investigated the possibility of utilize the hydrolyzate as nitrogen source in combination with a low cost

carbon source, such as waste of cheese whey performing submerged fermentation by *Mortierella ramanniana* fungi. Fermentations were conducted in shake flaks at an initial concentration of 80 g/L lactose and with different concentrations of FAN (160 and 200 mg/L). Fermentation was directed toward the lipid biosynthesis recording significant oil accumulation, that is 8.2 and 8.6 g/L and the intracellular content was 0.29 and 0.35 g/g biomass. Finally, the same culture conditions were applied in a bioreactor and the microbial oil was 9.2 and 9.5 g/L and the concentration of biomass in lipids was 0.30 and 0.36 g/g.

Key words: fungi, grape pomace, wine lees, cheese whey, enzymes, microbial oil

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αγροτο-βιομηχανικά υπολείμματα οινοποιίας	1
1.2 Αξιοποίηση στερεών υπολειμμάτων οινοποιίας.....	4
1.2.1 Προοπτικές αξιοποίησης στερεών υπολειμμάτων οινοποιίας από τους μύκητες	6
1.3 Ενζυμικό σύστημα των μυκήτων <i>Pleurotus</i>	10
1.3.1 Λιγνινολυτικά ένζυμα.....	12
1.3.2 Κυτταρινολυτικά ένζυμα	14
1.4 Ενζυμικό σύστημα του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i>	16
1.4.1 Πρωτεολυτικά ένζυμα	16
1.5 Αξιοποίηση τυρογάλακτος.....	19
1.5.1 Παραγωγή μικροβιακού λίπους και ο ρόλος του Ζυγομύκητα <i>Mortierella</i>	20
ΣΚΟΠΟΣ	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Αξιοποίηση στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας στην καλλιέργεια μανιταριών <i>Pleurotus</i>	24
2.1.1 Βιολογικό υλικό και παρασκευή υγρού εμβολίου	24
2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας.....	25
2.1.3 Καλλιέργεια των μυκήτων <i>Pleurotus</i> σε υδρόλυμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας	26
2.1.3.1 Συλλογή και προσδιορισμός βιομάζας	26
2.1.3.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της βιομάζας σε γλυκοζαμίνη.....	27
2.1.3.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων	28
2.1.4 Καλλιέργειες στερεής, ημι-στερεής και υγρής κατάστασης των μυκήτων <i>Pleurotus</i> σε στερεά υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.....	29
2.1.4.1 Εκτίμηση παραγόμενης βιομάζας	30
2.1.4.2 Εκχύλιση και προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	30
2.1.4.3 Παραλαβή ακατέργαστου ενζύμου	31
2.1.4.4 Ενζυμικός προσδιορισμός λακκάσης	31
2.1.4.5 Ενζυμικός προσδιορισμός ενδογλυκανάσης	32
2.1.5 Παραγωγή μανιταριών <i>Pleurotus</i> σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας	32
2.1.5.1 Προσδιορισμός αριθμού και βάρους καρποφοριών	33
2.1.5.2 Προσδιορισμός απόδοσης και βιολογικής αποδοτικότητας	33
2.2 Αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών <i>Pleurotus</i> μέσω της ατόλυσης.....	33
2.2.1.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis).....	34
2.3 Αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών <i>Pleurotus</i> σε συνδυασμό με οινολάσπη	35
2.3.1 Βιολογικό υλικό.....	35

2.3.2	Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας.....	36
2.3.3	Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i> σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπη.....	38
2.3.3.1	Παραλαβή ακατέργαστου ενζύμου	38
2.3.3.1	Προσδιορισμός ενεργότητας πρωτεολυτικών ενζύμων.....	39
2.3.3.1	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis).....	39
2.3.4	Υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κατάλληλο για μικροβιακές ζυμώσεις.....	39
2.3.4.1	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis).....	40
2.4	Αξιοποίηση υδρολύματος οινολάσπης και τυρογάλακτος προς παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	41
2.4.1	Βιολογικό υλικό και παρασκευή υγρού εμβολίου	41
2.4.2	Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας.....	41
2.4.3	Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα <i>Mortierella ramanniana</i> σε κωνικές φιάλες ...	42
2.4.4	Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα <i>Mortierella ramanniana</i> σε βιοαντιδραστήρα	42
2.4.5	Χημικές αναλύσεις	43
2.4.5.1	Εκχύλιση και προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	43
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
3.1	Καλλιέργεια στερεής, ημι-στερεής και υγρής κατάστασης των μυκήτων <i>Pleurotus</i> σε υπολείμματα στεμφύλων οينوποιίας.....	44
3.1.1	Έμμεσος προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας.....	44
3.1.2	Κατανάλωση φαινολικών συστατικών	46
3.1.3	Προσδιορισμός ενεργότητας των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση	48
3.1.4	Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής της βιομάζας, των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών	50
3.2	Αξιολόγηση παραγωγής μανιταριών <i>Pleurotus</i> σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οينوποιίας	54
3.3	Αυτόλυση του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών	56
3.4	Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i> σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών σε συνδυασμό με οινολάσπη προς παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων	57
3.4.1	Επίδραση της σύστασης του υποστρώματος	58
3.4.2	Επίδραση της υγρασίας	59
3.4.3	Επίδραση του χρόνου ζύμωσης	60
3.5	Αξιοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας	61
3.6	Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα <i>Mortierella ramanniana</i> σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα μίγματος υδρολύματος-τυρογάλακτος	62
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αγροτο-βιομηχανικά υπολείμματα οινοποιίας

Ο τομέας της γεωργίας παράγει μεγάλες ποσότητες υπολειμμάτων τα οποία δεν είναι εγγενώς επικίνδυνα για το περιβάλλον, όμως δημιουργούν πιθανά προβλήματα ρύπανσης. Τα κύρια αίτια που τέτοιου είδους υπολείμματα αποτελούν περιβαλλοντική επιβάρυνση, είναι οι αυξημένες ποσότητες παραγωγής τους, η υψηλή περιεκτικότητά τους σε οργανική ουσία, καθώς και το γεγονός ότι η παραγωγή τους εντοπίζεται σε συγκεκριμένες περιόδους του έτους, οδηγώντας σε αυξημένη εναπόθεση σε σύντομο χρονικό διάστημα. Από τις ποσότητες των υπολειμμάτων ένα μεγάλο μέρος χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία ως ζωοτροφές, αν και δεν είναι υψηλής διαιτητικής αξίας διότι έχουν υψηλό ποσοστό ινών και χαμηλό σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και άλατα. Σημαντικές είναι οι ποσότητες των υπολειμμάτων που ενσωματώνονται στους αγρούς, ενώ μεγάλο μέρος τους καίγεται προκαλώντας περιβαλλοντικά προβλήματα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει τα τελευταία χρόνια για την αξιοποίηση των αγροτο-βιομηχανικών υπολειμμάτων, όχι μόνο για να ελαχιστοποιηθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις αλλά και για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Kuhad et al. 1993, Philippoussis et al. 2001, Martínéz et al. 2005, Ragauskas et al. 2006).

Η βιομηχανία οινοποιίας αποτελεί σημαντικό μέρος της οικονομίας σε διάφορες περιοχές του κόσμου και τα σταφύλια είναι από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες φρούτων, με παραγωγή που ξεπερνά τους 48 εκατομμύρια τόνους ετησίως (FAO 2005), ενώ περίπου το 68% των σταφυλιών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή 29 εκατομμυρίων τόνων οίνου (Patil et al. 1995). Η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός οίνου παγκοσμίως. Με 3,5 εκατομμύρια εκτάρια αμπελώνων, η Ε.Ε. παράγει κατά την αμπελουργική περίοδο 2007-2008 σχεδόν 160 εκατομμύρια εκατόλιτρα οίνου, τα οποία αντιστοιχούν στο 60% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής οίνου (www.eurlex.europa.eu). Η Ελλάδα παράγει ετησίως περίπου 1,6 εκατομμύρια τόνους σταφυλιών και 5 εκατομμύρια εκατόλιτρα οίνου. Το τελευταίο ποσό αντιπροσωπεύει το 3,35% της συνολικής παραγωγής οίνου στην Ευρώπη (Vlyssides et al. 2005).

Η διαδικασία της οινοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τόσο στερεών όσο και υγρών αποβλήτων. Τα στερεά απόβλητα οινοποιίας που αποτέλεσαν και το θέμα της παρούσας μελέτης, είναι κυρίως λιγνινοκυτταρινούχα υπολείμματα, τα οποία συχνά καλούνται πομάσα ή υπολείμματα στεμφύλων σταφυλιών (Εικόνα 1.1-1). Βάσει του Καν. (ΕΚ) 479/2008, ως στέμφυλα σταφυλιών ορίζονται τα υπολείμματα που προκύπτουν από την πίεση των νωπών σταφυλιών, είτε έχουν υποστεί ζύμωση είτε όχι. Τα υπολείμματα στεμφύλων απαρτίζονται κυρίως από φλοιούς, γίγαρτα και λίγους βόστρυχους και αποτελούν το 16% του αρχικού σταφυλιού. Η ετήσια παραγωγή αυτού του λιγνινοκυτταρινούχου υποπροϊόντος της Ισπανίας, της Ιταλίας και της Γαλλίας είναι περίπου 240 εκατομμύρια κιλά ετησίως (Sánchez et al. 2002). Γενικά, θεωρείται ότι από 100 κιλά σταφυλιών που προορίζονται για οινοποίηση, το 27% είναι νωπά στέμφυλα.

Ένα άλλο στερεό απόβλητο της διαδικασίας της οινοποίησης είναι η οινολάσπη (Εικόνα 1.1-2). Ως οινολάσπη ορίζεται: α) το υπόλειμμα που συσσωρεύεται στον πυθμένα των δοχείων που περιέχουν οίνο, μετά τη ζύμωση, κατά την αποθήκευση ή μετά από επιτρεπόμενες επεξεργασίες, β) το υπόλειμμα που συσσωρεύεται στα δοχεία τα οποία περιέχουν γλεύκος και γ) το υπόλειμμα που μένει μετά από φιλτράρισμα ή φυγοκέντριση του προϊόντος της περίπτωσης α και β (Καν. (ΕΚ) 479/2008). Υπολογίζεται ότι η παραγόμενη ποσότητα οινολάσπης μπορεί να φθάσει έως και το 8,5% της αρχικής μάζας του σταφυλιού (Nerantzis & Tataridis 2006) ή το 6% της συνολικής ποσότητας του παραγόμενου οίνου (Zhihui et al. 2008). Συνίσταται κυρίως από ζυμομύκητες, είναι πλούσια σε τρυγικό οξύ ενώ σε μικρότερες ποσότητες περιέχει λίπος και ανόργανα συστατικά. Η ποσοστιαία αναλογία των επιμέρους συστατικών της οινολάσπης ποικίλει και είναι ανάλογη της χημικής σύστασης του οίνου από τον οποίο προήλθε, καθώς και από την περίοδο εκβλάστησης των αμπελώνων (Farkaš 1988, Pérez-Serradilla & Luque de Castro 2008). Η σύσταση τόσο των στεμφύλων οινοποιίας όσο και της οινολάσπης παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1-1.

Πίνακας 1.1-1: Σύνθεση στεμφύλων οινοποιίας και οινολάσπης, προερχόμενα από ερυθρή οινοποίηση (Zhihui et al. 2008)

Παράμετρος	Ζυμωμένα στεμφύλα οινοποιίας	Οινολάσπη
Συνολικοί υδατάνθρακες (% w/w)	2,5	5,6*
Ινώδεις ουσίες (% w/w)	45,7	-
Τέφρα (% w/w)	7,9	-
Άζωτο (Kjeldahl) (mg/L)	8,87	41,3
Αμμωνιακό άζωτο(mg/L)	-	31,8
Συνολικός φώσφορος (g/L)	-	48,5
Συνολικά στερεά (g/L)	-	85,0
COD (g/L)	-	102,6
BOD (g/L)	-	70,3

* % w/v



Εικόνα 1.1-1: Στερεά υπολείμματα στεμφύλων σταφυλιών (αριστερά). Συνήθης πρακτική είναι η εναπόθεσή τους στην ύπαιθρο (δεξιά).



Εικόνα 1.1-2: Εναπομείνουσα οινολάσπη ερυθρής οινοποίησης στον πυθμένα του δοχείου ζύμωσης του οίνου (www.chelseawinevault.com, commons.wikimedia.org).

1.2 Αξιοποίηση στερεών υπολειμμάτων οиноποιίας

Στην εποχή μας, το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των υπολειμμάτων που προέρχονται από την βιομηχανία οиноποιίας ολοένα αυξάνεται. Η βιομηχανική διαδικασία της οиноποίησης παράγει ένα μεγάλο αριθμό αποβλήτων συμπεριλαμβανομένου βόστρυχους και λασπώδη ιζήματα. Η κομποστοποίηση αυτών των υλικών είναι χρήσιμη για τη λίπανση του εδάφους, καθώς αυξάνει την οργανική ουσία, τα θρεπτικά συστατικά, τη μικροβιακή συγκέντρωση και βελτιώνει τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους όπως τον αερισμό και την ικανότητα προσρόφησης του νερού. (Bertran et al. 2004). Έχει παρατηρηθεί όμως ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών στα υποπροϊόντα αυτά αποτελούν πρόβλημα για την παραγωγή λιπασμάτων, για το λόγο ότι παρεμποδίζουν τη βλαστική ικανότητα των φυτών. Μία εναλλακτική λύση είναι η παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες θεωρούνται απολύτως ασφαλής εν σχέση με τις συνθετικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα ή ακόμα και στην παραγωγή φυτοχημικών (Alonso et al. 2002, Negro et al. 2003, Gonzalez-Paramas et al. 2004, Arvanitogiannis et al. 2006).

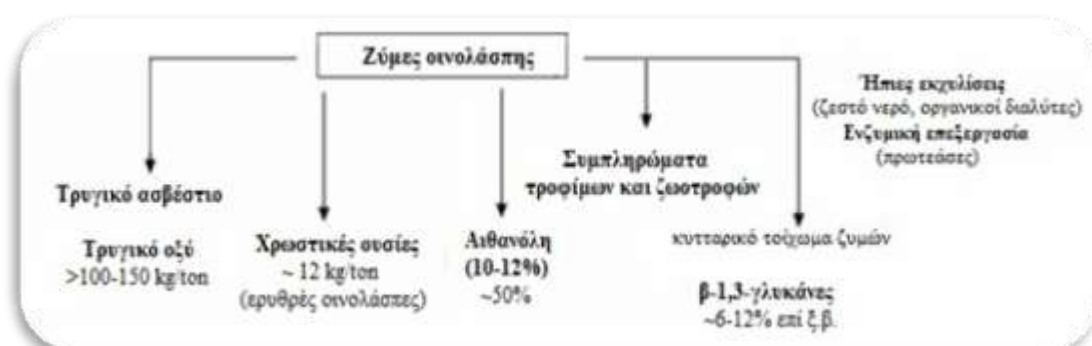
Μία άλλη χρήση των υπολειμμάτων στεμφύλων οиноποιίας που έχει προταθεί είναι η αξιοποίησή τους ως ζωοτροφή ιδιαίτερα σε περιόδους ξηρασίας που τα βοσκοτόπια είναι λιγοστά. Η χρήση της όμως περιορίζεται μόνο στο 30% των ζωοτροφών των μηρυκαστικών, λόγω της χαμηλής θρεπτικής αξίας και των αντιθρεπτικών παραγόντων όπως φαινολικά συστατικά, που παρεμποδίζουν τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στον προστόμαχο (Sánchez et al. 2002). Λόγω των διαφόρων προβλημάτων που προκύπτουν η συνηθέστερη κατάληξη αυτών των υπολειμμάτων είναι η εναπόθεσή τους στο περιβάλλον. Δεδομένης της κατάστασης κρίνεται αναγκαίο η ανακάλυψη νέων διεργασιών που θα μπορέσουν να εξαλείψουν τα υπολείμματα αυτά ή ακόμα καλύτερα να επαναχρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο.

Έρευνες έχουν εστιάσει στην ανάκτηση προϊόντων από τα στέμφυλα οиноποιίας και την οινολάσπη, όπως τρυγικό οξύ, β-γλυκάνες, γιγαρτέλαιο και αντιοξειδωτικές ουσίες, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά τροφίμων και διατροφφαρμακευτικές ουσίες, αλλά και ως λειτουργικά τρόφιμα. Ακόμη, τα εκχυλίσματα αυτών των υποπροϊόντων έχει βρεθεί ότι έχουν σημαντικές

αντιβακτηριακές ιδιότητες, συναντώντας έτσι εφαρμογή και στην ασφάλεια των τροφίμων ενάντια στη βακτηριακή μόλυνση (Nerantzis & Tataridis 2006).

Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές βιοδιεργασίες για την αξιοποίηση των στεμφύλων οινοποιίας προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω της καλλιέργειας στερεής κατάστασης, όπως η παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Nicolini et al. 1993), αιθανόλης (Hang et al. 1986, Tataridis et al. 2005), γλυκονικού οξέος (Buzzini et al. 1993), καροτενοειδών (Buzzini & Martini 2000), ξανθάνης (Stredonsky & Conti 1999), κιτρικού οξέος (Hang & Woodams 1985) ακόμα και βακτηριακής κυτταρίνης (Tataridis et al. 2006). Ειδικότερα στην Ελλάδα, η παραγωγή αιθανόλης παράγεται αποκλειστικά μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης, χρησιμοποιώντας πλήθος αγροτικών και αγροτο-βιομηχανικών προϊόντων και υποπροϊόντων. Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται είναι η μελάσσα, προερχόμενη κυρίως από τεύτλα (περίπου 64%), ζαχαροκάλαμα (9%), σταφίδες (14%), σύκα (4%), οίνο (4%) και οινολάσπη (5%) (Danilatos 1986).

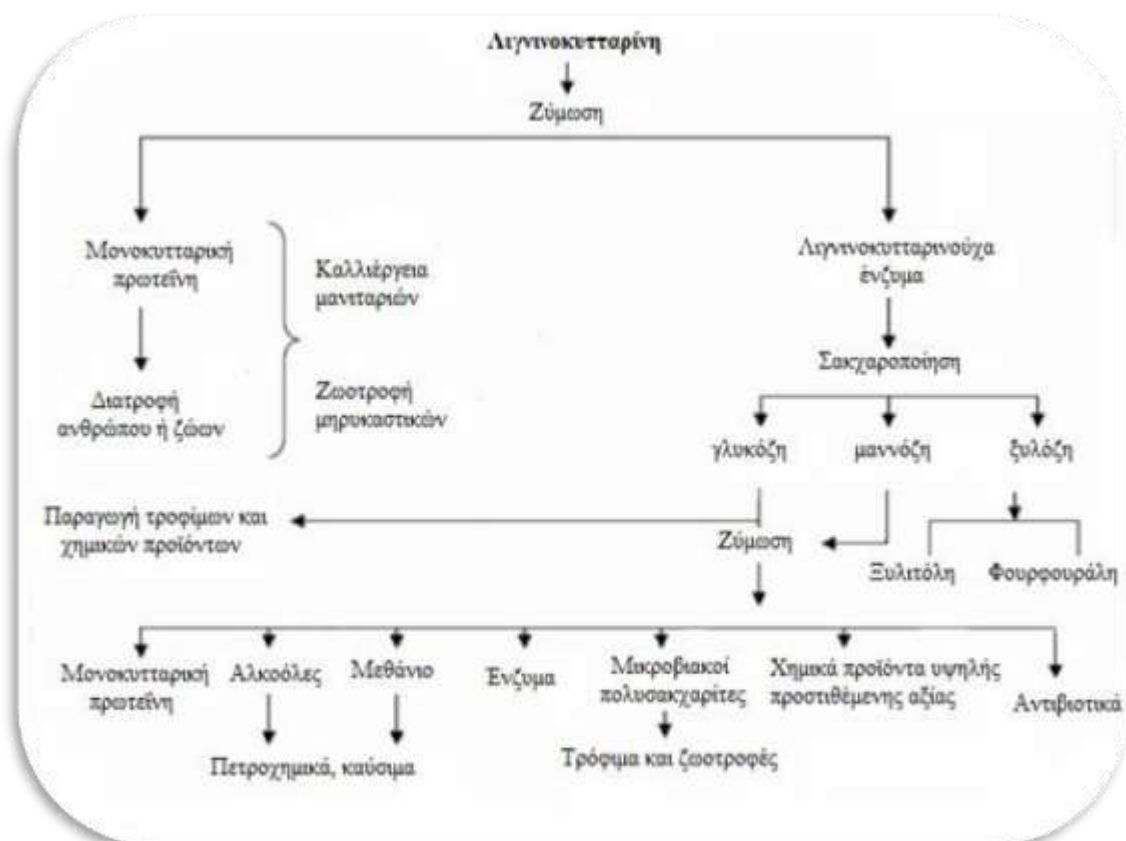
Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως προβιοτικό συμπλήρωμα σε ψάρια (Lara-Flores et al. 2003) και σε ζωοτροφές, καθώς είναι πλούσιες σε πρωτεΐνη, υδατάνθρακες και βιταμίνες. Επίσης, το 30-60% του τοιχώματος των ζυμών αποτελείται από 1,3-γλυκάνη, η οποία έχει αναφερθεί ότι διεγείρει την ανοσοποιητική απόκριση έναντι μολυσματικών ασθενειών, ιών κ.α. καθώς δρα ως ενεργοποιητής των μικροφάγων (λευκά αιμοσφαίρια) (Kogan 2000, Perpler 1983). Δεδομένου αυτού, έχει ήδη αναπτυχθεί μία μέθοδος απομόνωσης της 1,3-γλυκάνης από ζυμομύκητες οινολάσπης (Freimund et al. 2003). Στην Εικόνα 1.2-1 παρουσιάζεται συνοπτικά η παραγωγή προϊόντων από ζυμομύκητες οινολάσπης.



Εικόνα 1.2-1: Παραγωγή προϊόντων από ζυμομύκητες οινολάσπης (Nerantzis & Tataridis 2006).

1.2.1 Προοπτικές αξιοποίησης στερεών υπολειμμάτων οινοποιίας από τους μύκητες

Η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα, που συσσωρεύεται λόγω της γεωργο-βιομηχανικής δραστηριότητας, μπορεί να αποτελέσει την πρώτη ύλη για την παραγωγή πολλών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω της μικροβιακής ζύμωσης (Εικόνα 1.2-2). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων οινοποιίας παρουσιάζεται στον τομέα της παραγωγής ενζύμων μέσω της στερεής και της υγρής καλλιέργειας ορισμένων μυκήτων. Βέβαια, η στερεή καλλιέργεια παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της υγρής, όπως: η επίτευξη μεγαλύτερων ποσοτήτων ενζύμων και υψηλότερων αποδόσεων, η απαίτηση βιοαντιδραστήρων μικρότερου μεγέθους, ο χαμηλός κίνδυνος επιμόλυνσης και ο μειωμένος όγκος των υγρών αποβλήτων που απορρέουν από τη ζύμωση (Vinięgra-González 1998, Pandey et al. 1999, Nerantzis & Tataridis 2006).



Εικόνα 1.2-2: Σχηματική απεικόνιση των παραγόμενων προϊόντων μέσω της ζύμωσης της λιγνινοκυτταρίνης (Sánchez 2009).

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που ασχολούνται με την παραγωγή ενζύμων από λιγνινοκυτταρινούχα απόβλητα, όμως μικρό μέρος αυτών διερευνούν τη δυνατότητα αξιοποίησης των στεμφύλων οινοποιίας. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στην παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων μέσω της καλλιέργειας των βασιδιομυκήτων και ιδιαίτερα με τους *Pleurotus* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinula edodes*, *Trametes* sp. κ.α. Επίσης, υπάρχουν αναφορές, κυρίως την τελευταία δεκαετία, και για την παραγωγή κυτταρινολυτικών και πηκτινολυτικών ενζύμων από στέμφυλα οινοποιίας με τη χρήση μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Τέλος, είναι αξιόλογο ότι δεν έχουν γίνει αναφορές για την αξιοποίηση της οινολάσπης προς την παραγωγή χρήσιμων ενζύμων.

Μία άλλη προοπτική είναι η παραγωγή μανιταριών, η οποία αποτελεί μια παραγωγική δραστηριότητα με μεγάλες δυνατότητες αξιοποίησης σημαντικών ποσοτήτων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών (Philippoussis 2009). Έτσι, η αξιοποίηση των στεμφύλων οινοποιίας μέσω της στερεής καλλιέργειας μακρομυκήτων προς παραγωγή καρποφοριών αποτελεί μία δυναμική προοπτική.

Τα καλλιεργούμενα μανιτάρια έχουν ανάγκη από ενέργεια για να αναπτυχθούν κι αυτή προσλαμβάνεται μέσω του άνθρακα. Κύριες πηγές άνθρακα αποτελούν τα κυτταρινούχα υλικά (πηγές γλυκόζης) (Leatham 1986), ενώ η αναλογία κυτταρίνης/λιγνίνης έχει σημαντικό ρόλο για τις τελικές αποδόσεις των μανιταριών. Η φύση και η συγκέντρωση των πηγών αζώτου αποτελούν εκείνους τους θρεπτικούς παράγοντες, που ρυθμίζουν την ενζυμική παραγωγή των μυκήτων της λευκής σήψης. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η μυκηλιακή αύξηση των μυκήτων *Pleurotus* spp. συσχετίζεται θετικά με τον λόγο C/N (άνθρακα/άζωτο) (Philippoussis et al. 2001, 2003). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επαγωγή και την ωρίμανση των καρποσωμάτων είναι η συγκέντρωση του CO₂, η υγρασία και η συγκέντρωση αλάτων. Η συγκέντρωση του CO₂ επιδρά στην μυκηλιακή αύξηση, στην επαγωγή και στην μετέπειτα ανάπτυξη των καρποσωμάτων. Γενικά, οι υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. 0,5-1% v/v αέρα) προάγουν την μυκηλιακή αύξηση και παρεμποδίζουν την έναρξη της καρποφορίας. Ακόμη, η καρποφορία απαιτεί υψηλό ποσοστό ατμοσφαιρικής υγρασίας, περίπου 90-95%, ενώ η άριστη υγρασία των ξυλωδών υποστρωμάτων είναι 35-60% (Philippoussis 2009). Όσον αφορά στις συγκεντρώσεις αλάτων, θεωρείται γενικά ότι οι βασιδιομύκητες αντέχουν υψηλά επίπεδα κατά την μυκηλιακή αύξηση αλλά είναι ευαίσθητοι στη φάση της καρποφορίας. Η επίδραση της αλατότητας και του πορώδους του μέσου ανάπτυξης στην αύξηση του μυκηλίου μανιταριών λευκής

σήψης έχει καταγραφεί σε διάφορες δημοσιεύσεις (Philippoussis et al. 2001, 2002, 2003, Diamantopoulou et al. 2001).

Τα γεωργικά και αγροτο-βιομηχανικά υπολείμματα, που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα ανάπτυξης για τους εδώδιμους μύκητες, είναι αδιάλυτα στο νερό και η βασική τους χημική σύσταση αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη, ενώ σε μικρότερο βαθμό υπάρχουν πηκτίνες, άμυλο και άλλοι πολυσακχαρίτες. Το άχυρο σίτου είναι το κύριο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των μανιταριών *Pleurotus* (Εικόνα 1.2-3). Εντούτοις, ικανοποιητική παραγωγή μπορεί να επιτευχθεί αν προσθέσουμε στο άχυρο κάποια συστατικά εμπλουτισμού (πίτουρο, σογιάλευρο, σπάδικες καλαμποκιού, άχυρο μηδικής κ.α. (Φιλιπούσης 2003). Εναλλακτικά υποστρώματα που αξιοποιούνται προς την παραγωγή μανιταριών αναφέρονται στον Πίνακα 1.2-1, μαζί με τη χημική τους σύσταση. Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση βρέθηκαν ελάχιστες μελέτες που να διερευνούν τη δυνατότητα καλλιέργειας μανιταριών σε στέμφυλα οينوποιίας.



Εικόνα 1.2-3: Καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus* σε άχυρο.

Πίνακας 1.2-1: Χημική σύσταση αγροτο-βιομηχανικών υπολειμμάτων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια μανιταριών (Philippoussis 2009).

Αγρο-βιομηχανικά υπολείμματα	Κυτταρίνη (%)	Ημικυτταρίνη (%)	Λιγνίνη (%)	Κυτταρίνη/Λιγνίνη	Τέφρα (%)	N (%)	C/N
<i>Υπολείμματα γεωργικής παραγωγής</i>							
Φύλλα μπανάνας	24.2-29.5	15.9-21.8	11.7-26.2	1.8-2.2	4.7-14.2	1.2-1.4	31.2-31.6
Στελέχη καλαμποκιού	36.4-40.0	25.0-29.0	13.0-21.0	2.1-2.3	3.6-7.0	0.6-0.9	55.8-77.3
Χόρτα (διάφορα)	25.0-40.0	13.0-38.0	6.4-17.6	2.4-3.9	4.2-6.2	1.3-2.5	28.0-42.0
Στελέχη καλαμιών (διάφορα)	34.4-42.6	28.4-30.6	17.1-19.7	1.7-2.0	4.3-4.9	0.3-0.5	150.0-170.0
Άχυρο ρυζιού	22.8-38.4	17.7-28.5	6.4-18.0	3.6-5.9	8.3-17.8	0.5-1.1	51.4-57.8
Βλαστοί αμπελιών	34.0-60.8	17.0-21.0	20-22.9	2.0-2.8	ΜΔ*	ΜΔ	ΜΔ
Άχυρο σιταριού	31.5-39.5	21.2-29.0	5.6-15.0	2.2-5.3	5.6-8.0	0.4-0.8	48.8-59.6
<i>Υπολείμματα βιομηχανικής επεξεργασίας</i>							
Υπολείμματα ζυθοποιίας	16.0-18.0	26.4-30.4	27.5-28.1	0.6-0.8	4.6-5.0	4.1-4.5	11.6-12.2
Φλοιός καρύδας	21.0-36.0	12.0-22.7	41.0-48.0	0.6-1.3	2.7-10.2	0.4-1.1	77.6-124.2
Σπάδικες καλαμποκιού	28.0-45.0	35.0-43.0	11.0-17.0	2.5-2.7	4.4-4.8	0.4-1.1	64.2-71.6
Πούλπα/φλοιοί καφέ	23.0-29.1	15.1-17.1	13.0-26.0	0.89-0.94	4.5-6.3/ 1.0-6.0	1.4-1.9/ 0.9-1.0	53.5-59.4
Υπολείμματα εκκοκισμού βαμβακιού	52.0-90.0	5.0-20.0	4.0-12.0	5.0-11.2	2.6-8.4	0.3-1.4	40.0-59.0
Βόστρυχοι σταφυλιών	16.5-22.9	34.0-36.7	22.9-39.3	0.5-0.7	ΜΔ	1.1-1.5	32.0-40.0
Κέλυφος αράπικων φιστικιών	22.0-30.0	17.6-30.0	10.0-20.0	1.2-2.2	3.38-7.1	1.0-1.2	28.3-34.0
Κέλυφος φουντουκιών	24.5-37.5	20.6-24.9	29.6-35.1	0.7-1.2	8.2-8.7	0.8-0.9	50.6-58.6
Υπολείμματα χαρτιού	54.3-70.0	12.4-25.0	11.3-29.7	3.0-6.0	ΜΔ	ΜΔ	ΜΔ
Φλοιοί ρυζιού	28.0-43.0	17.5-20.6	21.5-22.5	1.3-1.9	16.7-21.4	0.3-0.4	100.0-136.0
Πριονίδι (μαλακό ξύλο)	37.7-49.5	10.7-25.0	26.1-29.5	1.4-1.7	0.4-0.5	0.1-0.1	310.0-520.0
Πριονίδι (σκληρό ξύλο)	42.9-45.1	22.0-33.0	24.0-26.0	1.7-2.0	0.2-0.3	0.1-0.2	150.0-450.0
Φλοιοί σπόρων ηλιανθου	31.3-42.7	24.0-25.2	23.2-28.7	1.1-1.8	3.0-3.3	0.6-0.9	60.0-72.4
Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	26.6-40.0	19.0-30.0	19.0-23.3	1.4-2.2	1.5-5.0	0.2-0.8	120.0-190.0

*ΜΔ: Μη διαθέσιμα δεδομένα.

1.3 Ενζυμικό σύστημα των μυκήτων *Pleurotus*

Λόγω της σύστασής τους τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποδομούνται εξαιρετικά δύσκολα και μόνο από οργανισμούς όπως τα βακτήρια και οι μύκητες (Gadd 2001). Οι μύκητες μέσω της αποδόμησης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών εξασφαλίζουν τις ποσότητες άνθρακα και αζώτου που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Σύμφωνα με τους Cooke και Rayner (1984) οι βασιδιομύκητες και ορισμένοι ασκομύκητες ευθύνονται για την αποδόμηση 100 γιγατόνων λιγνοκυτταρινούχων υλικών εκ των οποίων το 20% είναι λιγνίνη (Kirk & Farrell 1987, Gadd 2001).

Οι μύκητες είναι οι πλέον αποτελεσματικοί μικροοργανισμοί στην αποδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, καθώς από τα υλικά αυτά λαμβάνουν όλες τις απαραίτητες ουσίες που χρειάζονται για να εξασφαλίσουν την αύξηση της βιομάζας τους (Evans et al. 2001). Οι μύκητες που μας ενδιαφέρουν ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες, στους μύκητες αποδόμησης ξύλου (wood decomposing fungi, WDF) και στους μύκητες αποδόμησης χούμου (litter-decomposing fungi, LDF).

Οι LDFs είναι εκείνοι οι βασιδιομύκητες και ασκομύκητες, που μαζί με τα βακτήρια, άλλους μύκητες και ζώα λαμβάνουν μέρος στην αποσύνθεση της νεκρής φυτικής ύλης προς παραγωγή CO₂ και χούμους (Τζάμος 2004). Οι LDFs βασιδιομύκητες ανήκουν στις οικογένειες *Agaricaceae*, *Bolbitiaceae*, *Coprinaceae*, *Strophariaceae* και *Tricholomataceae*. Στην ομάδα των WDFs ανήκουν κυρίως βασιδιομύκητες και χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, της λευκής σήψης και της φαιάς σήψης (Martínez et al. 2005). Ως λευκή σήψη, αναφέρεται η σήψη του ξύλου λόγω ενζυμικής δράσης των μικροοργανισμών, που εστιάζονται στη αποδόμηση της λιγνίνης μέσω των πολυφαινολοξειδασών, ώστε να παραμείνει ως κατάλοιπο της αποδιοργανώσεως του ξύλου η λευκή κυτταρίνη. Ως φαιά σήψη, αναφέρεται η σήψη του ξύλου από μυκητολογικές προσβολές κατά τις οποίες η ενζυμική δράση εντοπίζεται στη διάσπαση της κυτταρίνης μέσω των κυτταρινασών, ώστε να παραμείνει η καστανή λιγνίνη (Τζάμος 2004).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι μύκητες της λευκής σήψεως καθώς πραγματοποιούν την πιο γρήγορη και αποτελεσματική αποικοδόμηση της λιγνίνης (Mansur et al. 2003). Έρευνες αναφέρουν ότι είναι η μόνη ομάδα μικροοργανισμών που είναι ικανή να αποδομεί όλα τα βασικά πολυμερή του ξύλου, παράγοντας

υδρολυτικά και μοναδικά οξειδωτικά εξωκυτταρικά ένζυμα (Balrdian & Šnajdr 2006, Pérez et al. 2002, Philippoussis 2009, Sánchez 2008). Η αποδόμηση της λιγνίνης φαίνεται να συμβαίνει υπό περιορισμό αζώτου, με αποτέλεσμα τα παραγόμενα ένζυμα να είναι δευτερογενείς μεταβολίτες (Lankinen 2004). Στην αποικοδόμηση της λιγνινο-κυτταρίνης λαμβάνουν μέρος τα εξής δύο εξωκυτταρικά ενζυμικά συστήματα:

A) *Υδρολυτικό*, κατά το οποίο παράγονται υδρολάσες που αποικοδομούν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Τέτοια υδρολυτικά ένζυμα της κυτταρίνης είναι οι ενδογλυκανάσες, οι β-γλυκοζιδάσες και οι κελλοβιοϋδρολάσες, ενώ της ημικυτταρίνης τα κυριότερα ένζυμα, είναι οι ενδοξυλανάσες και οι ενδομαννανάσες.

B) *Οξειδωτικό*, το οποίο διασπά τους φαινολικούς δακτυλίους της λιγνίνης με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της. Το λιγνινολυτικό σύστημα περιλαμβάνει κυρίως υπεροξειδάσες, όπως η υπεροξειδάση του μαγγανίου (Manganese peroxidase, MnP), η υπεροξειδάση της λιγνίνης ή αλλιώς λιγνινάση (Lignin peroxidase, LiP) και οι πολυφαινολοξειδάσες, όπως είναι η λακκάση (Laccase, EC-1.10.3.2). Τόσο το υδρολυτικό όσο και το οξειδωτικό ενζυμικό σύστημα αναφέρονται λεπτομερώς παρακάτω.

Οι πιο σημαντικοί μύκητες της λευκής σήψευς που έχουν μελετηθεί διεξοδικά για τα λιγνινολυτικά ένζυμα, που παράγουν είναι οι: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes* και *Phanerochaete chrysosporium* (Evans et al. 2001). Χαρακτηριστικό των μυκήτων του γένους *Pleurotus* είναι η ικανότητά τους να αποδομούν πλήθος λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων σε λιγότερο χρονικό διάστημα από ότι τα άλλα είδη μανιταριών. Επίσης, αναφέρεται ότι είναι από τους πιο ενεργούς μικροοργανισμούς στην αποδόμηση της λιγνίνης (Kirk & Farrell 1987). Αυτή η ιδιότητά τους να αποδομούν τη λιγνίνη, οφείλεται στο γεγονός ότι παράγουν ένζυμα όπως οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης και του μαγγανίου και η λακκάση. Εξ' αυτών των ενζύμων, η λακκάση παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι έχει τη δυνατότητα να οξειδώνει τόσο φαινολικές όσο και μη-φαινολικές ουσίες, καθώς και ουσίες που μολύνουν σημαντικά το περιβάλλον. Η λακκάση παρουσιάζει δυνατότητες βιοεξυγίανσης των βιομηχανικών υγρών αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων, ενώ άλλες εφαρμογές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι η απολιγνιτοποίηση στη βιομηχανία χαρτοπολτού, η παραγωγή αιθανόλης, οι βιοαισθητήρες, η αποικοδόμηση των τριχλωροφαινολών και των αλκενίων και η χρησιμοποίηση ως διαγνωστικά εργαλεία στην ιατρική. Δεδομένου της σημαντικής

βιοτεχνολογικής εφαρμογής που βρίσκει η λακκάση και της ολοένα και μεγαλύτερης ζήτησής της, είναι πλέον απαραίτητη η παραγωγή της σε μεγάλες ποσότητες και με χαμηλό κόστος (Strong & Burgess 2008, Isikhuemhen & Mikiashvilli 2009, Lettera et al. 2011).

1.3.1 Λιγνινολυτικά ένζυμα

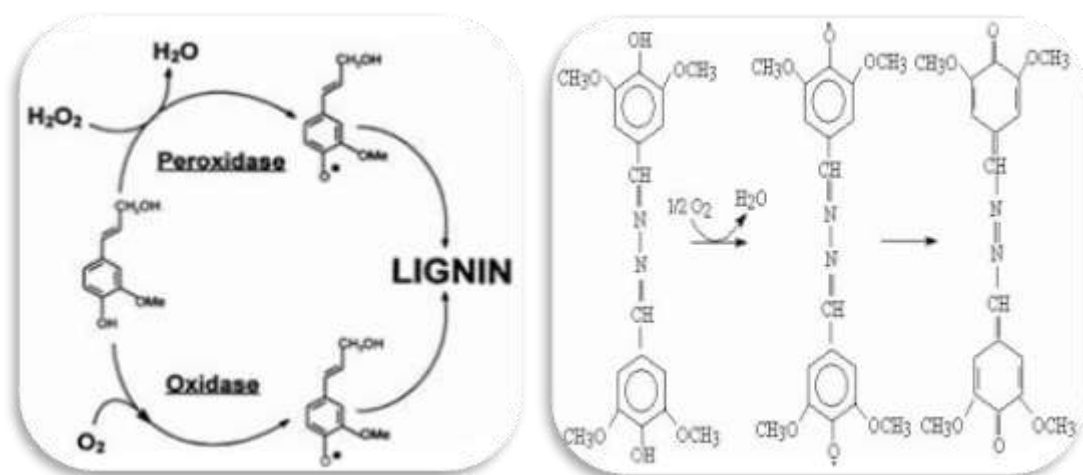
Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP), η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) και η λακκάση είναι από τα πιο γνωστά λιγνολιτικά ένζυμα. Οι LiP και MnP είναι γλυκοπρωτεΐνες η οποίες περιέχουν αίμη (Fe) και χρησιμοποιούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ως οξειδωτικό (Εικόνα 1.3-1). Οι LiP οξειδώνουν τις μη φαινολικές λιγνινικές δομές, οι οποίες αποτελούν έως και το 90% του πολυμερούς, με το να αποσπών ένα ηλεκτρόνιο παράγοντας κατιόντα, τα οποία αποσυντίθενται έπειτα χημικά. Οι MnP οξειδώνουν το Mn(II) σε Mn(III), το οποίο μετά οξειδώνει τα φαινολικά συστατικά σε φαινολοξυ-ρίζες. Αυτό οδηγεί στην αποικοδόμηση της λιγνίνης (www.enzymeindia.com). Πιο πρόσφατα έχει βρεθεί η ύπαρξη της versatile υπεροξειδάσης (VP), ως μία τρίτου τύπου λιγνινολυτικής υπεροξειδάσης, που έχει βρεθεί στα *Pleurotus* και σε ορισμένους άλλους μύκητες, η οποία συνδυάζει τις καταλυτικές ιδιότητες των LiP και MnP (Gadd 2001).

Η λακκάση είναι μέλος μίας ομάδας ενζύμων γνωστών ως κυανών οξειδασών του χαλκού. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει τέσσερα ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) στο μόριό της και τα οποία κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: τύπος 1 (T1), τύπος 2 (T2) και τύπος 3 (T3). Η λακκάση είναι μία βιολογική μπαταρία, καθώς καταλύει την οξείδωση ενός ηλεκτρονίου διαφόρων υποστρωμάτων, παράλληλα με την αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων του οξυγόνου σε νερό (τα ηλεκτρόνια αποθηκεύονται από συνεχείς οξειδώσεις πριν την απελευθέρωση τους για τον σχηματισμό των 2 μορίων H_2O από 1 μόριο O_2). Η απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου καταλύεται από τη λακκάση και οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελεύθερης οργανικής ρίζας. Αυτός ο τύπος είναι γενικά ασταθής και υπόκεινται σε παραπέρα αντιδράσεις, είτε αυθόρμητες (για παράδειγμα πολυμερισμός ή διάσπαση) ή ενζυμικά καταλυόμενες (αναγωγή ή οξείδωση σε κινόνη). Παρόλο που η λακκάση κατηγοριοποιείται ως μια διφαινολική οξειδάση, η ποικιλία υποστρωμάτων *in vitro* είναι μεγάλη, περιλαμβάνοντας τις μονολιγνίνες και τις διαμίνες (Thurston 1994, Shradha et al. 2011). Η λακκάση που θα εκκρίνει ένας μύκητας για να αποδομήσει την λιγνίνη εξαρτάται από το είδος του

μύκητα, τη φύση του υποστρώματος, το είδος της καλλιέργειας (στερεής ή υγρής κατάστασης), τον λόγο C/N, τη θερμοκρασία επώασης, το pH του θρεπτικού μέσου, την ανακίνηση και την παρουσία παράγοντα επαύξησης της παραγωγής (Shraddha et al. 2011).

Η συρινγκαλδαζίνη (syringaldazine) ή αλλιώς 4,4'-[azinobis (methanylylidene)]bis (2,6-dimethoxyphenol) χρησιμοποιείται ευρέως ως υπόστρωμα για την μέτρηση της ενεργότητας της λακκάσης σε διάφορες μικροβιακές καλλιέργειες (Εικόνα 1.3-1). Σε πρόσφατη μελέτη που συνέκρινε διάφορα υποστρώματα όπως συρινγκαλδαζίνη, υδροκινόνη, βανιλινικό οξύ και ταννικό οξύ φάνηκε ότι η πρώτη υπερέχει των άλλων. Το άριστο pH δράσης βρέθηκε ότι είναι το 5 στους 25 °C (Manole et al. 2008).

Η ενζυμική δραστηριότητα των οξειδωτικών ενζύμων των μυκήτων του γένους *Pleurotus* έχουν μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα υποστρώματα τα τελευταία χρόνια, όπως πίτουρο σίτου, πούλπα καφέ, κατσίγαρο, φλούδες μανταρινιών κ.α. (Tsioulpas et al. 2002, Velázquez-Cedeño et al. 2002, Elisashvili et al. 2005, Prasad et al. 2005, de Souza et al. 2006). Ωστόσο, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λιγιστές μελέτες που διερευνούν την παραγωγή του πιο σημαντικού τους οξειδωτικού ενζύμου, της λακκάσης, σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης (Stajić et al. 2006, Elisashvili et al. 2009, Akpınar & Ozuturk Urek 2012)



Εικόνα 1.3-1: Μηχανισμός δράσης των λιγνινολυτικών ενζύμων (αριστερά) και οξείδωση συρινγκαλδαζίνης προς την αντίστοιχη κινόνη από το ένζυμο λακκάση (δεξιά) (Sanchez-Amat & Solano 1997, Richardson & McDougall 1998).

1.3.2 Κυτταρινολυτικά ένζυμα

Οι κυτταρινάσες είναι τα ένζυμα που χρησιμοποιούν οι μύκητες για να διασπάσουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης και οι δομικές μονάδες είναι ενωμένες με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το μόριο της κυτταρίνης αποτελείται από κρυσταλλικές περιοχές, με χαρακτηριστικό την παράλληλη διάταξη των αλυσίδων και άμορφες περιοχές όπου οι αλυσίδες δεν είναι παράλληλες. Οι μύκητες δεν παράγουν ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες κυτταρινασών, όμως είναι τόσο δραστικά ένζυμα όπου ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις είναι ικανά να αποδομήσουν την κυτταρίνη. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται τα εξής ένζυμα:

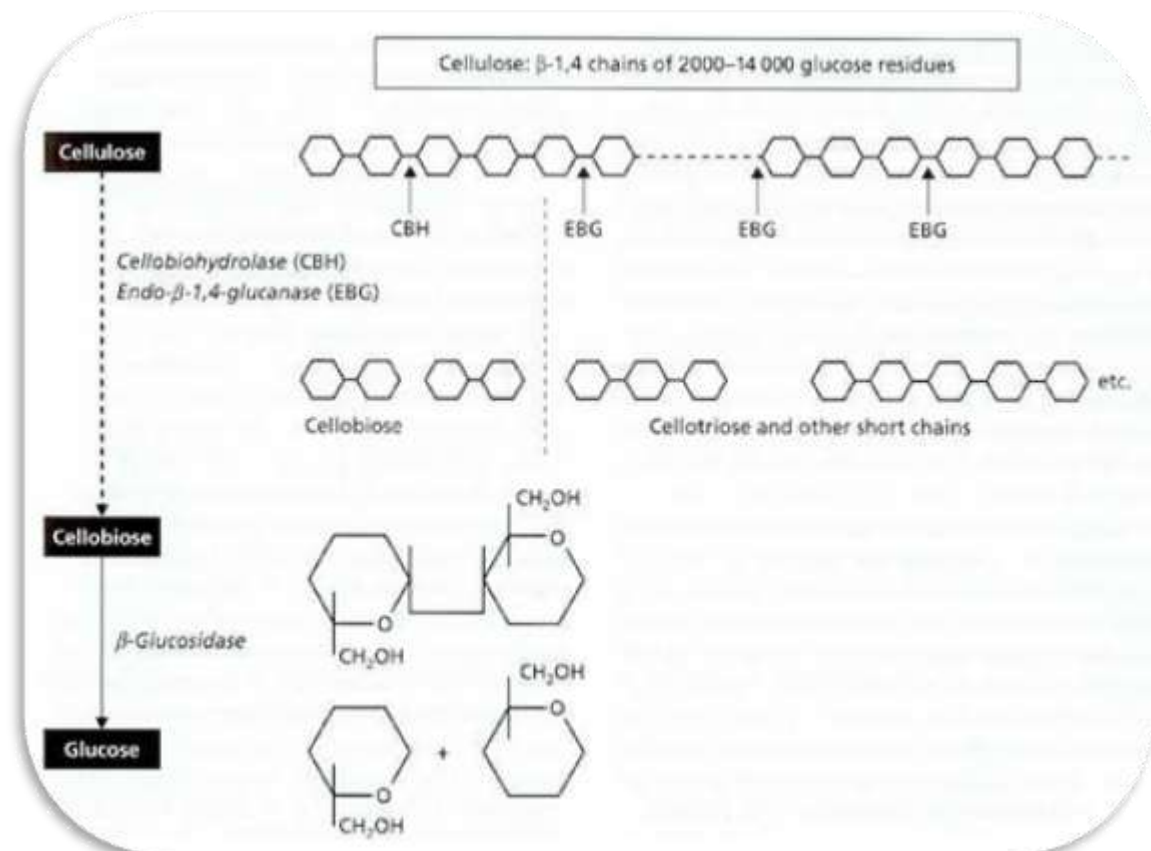
- α) ενδογλυκανάση (1,4-β-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC-3.2.1.4, CMCase),
- β) κελλοβιοϋδρολάση (1,4-β- D-glucan 4-cellobiohydrolase, EC-3.2.1.91) και
- γ) β-1,4-γλυκοζιδάση (β-D-glucoside glucohydrolase EC-3.2.1.21).

Τα υδρολυτικά αυτά ένζυμα έχουν την ιδιότητα να δρουν είτε ταυτόχρονα είτε το ένα μετά το άλλο. Αναλυτικότερα, η ενδογλυκανάση υδρολύει τους εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης τυχαία. Το ένζυμο αυτό δεν δρα στην κρυσταλλική κυτταρίνη αλλά στα παράγωγα της κυτταρίνης (καρβοξυμεθυλο- και υδροξυμεθυλο- κυτταρίνη) στις κυτταρινοδεξτρίνες και δεν δρα στην κελλοβιόζη (Εικόνα 1.3-2). Μερικές μόνο ενδογλυκανάσες δρουν στην κρυσταλλική κυτταρίνη και οι περισσότερες από αυτές είναι γλυκοπρωτεΐνες με διαφορετικό ποσοστό πολυσακχαριτών το οποίο σε αρκετές δεν έχει προσδιοριστεί. Οι ενδογλυκανάσες έχουν άριστο pH μεταξύ 4,5 και 6,5 και παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στη θερμοκρασία. Σε πολλά από αυτά τα ένζυμα η άριστη θερμοκρασία δράσης φθάνει και στους 60 °C.

Η κελλοβιοϋδρολάση ή αλλιώς εξωγλυκανάση δρα στην κρυσταλλική κυτταρίνη και κυρίως μετά τη δράση της ενδογλυκανάσης πάνω στα νέα άκρα των αλυσίδων (σύγχρονη δράση των δύο ενζύμων). Η κελλοβιοϋδρολάση υδρολύει τους εξωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς, στο μη αναγωγικό άκρο της κυτταρίνης και απελευθερώνει κελλοβιόζη (Εικόνα 1.3-2). Δεν δρα στα παράγωγα της κυτταρίνης και παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση από εκείνη της ενδογλυκανάσης.

Τέλος, η β -1,4-γλυκοζιδάση συμπληρώνει τη δράση υδρολύοντας την κελλοβιόζη και κυτταρινο-ολισακχαρίτες (μέχρι 4 μόρια γλυκόζης και γλυκοζίτες) παράγοντας γλυκόζη (Εικόνα 1.3-2). Χαρακτηριστικό του ενζύμου είναι ότι δεν δρα στην κυτταρίνη και σε μεγαλύτερες κυτταρινοδεξτρίνες (Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006). Η εύκολα αφομοιώσιμη, πλέον, γλυκόζη προσλαμβάνεται από τους μύκητες εξασφαλίζοντας τις ανάγκες τους σε άνθρακα (Gadd 2001).

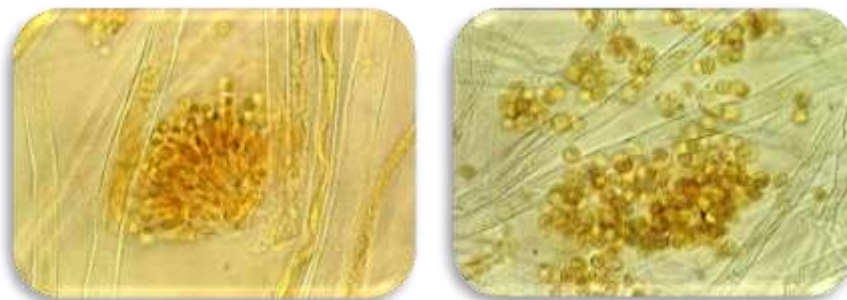
Επειδή η δομή του υποστρώματος στο οποίο δρουν τα κυτταρινολυτικά ένζυμα, δηλαδή η φυσική κυτταρίνη, δεν είναι τελείως γνωστή και επειδή παρουσιάζεται πολυπλοκότητα στα ένζυμα αυτά, για τον προσδιορισμό τους έχουν δοθεί πολλές μέθοδοι από τους διάφορους ερευνητές. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για τον προσδιορισμό της ενδογλυκανάσης, η οποία και μελετήθηκε στη παρούσα μελέτη, είναι: η καρβοξυ-μέθυλο-κυτταρίνη (CMC), η υδροξυ-αιθυλο-κυτταρίνη και η κρυσταλλική κυτταρίνη (Avicel).



Εικόνα 1.3-2: Ενζυμική διάσπασης της κυτταρίνης με τη δράση των κυτταρινολυτικών ενζύμων.

1.4 Ενζυμικό σύστημα του μύκητα *Aspergillus oryzae*

Ο μύκητας *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn είναι ένας ασκομύκητας που ανήκει στην οικογένεια *Trichocomaceae* (www.indexfungorum.org). Χρησιμοποιείται κυρίως στην Ασία για την ζύμωση σάλτσας σόγιας, καθώς και για την ζύμωση ρυζιού, οσπρίων και πατάτας προς παραγωγή αλκοολούχων ποτών όπως το ιαπωνέζικο σάκε (sake). Ο μύκητας αυτός έχει την ιδιότητα να παράγει μεγάλες ποσότητες υδρολυτικών ενζύμων, όπως πρωτεάσες, αμυλάσες, γλουταμινάσες και μεταλλοπεπτιδάσες (Liang et al. 2009). Στην παρούσα μελέτη, η έρευνα εστιάστηκε στην παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του εν λόγω μύκητα, μέσω της στερεής καλλιέργειάς του σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας και οινολάσπης.



Εικόνα : *Aspergillus oryzae*.
(www.foodprocessing-technology.com, microfungi.truman.edu)

1.4.1 Πρωτεολυτικά ένζυμα

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και είναι γνωστά ως πρωτεάσες. Εκτιμάται ότι η αξία των πωλήσεων πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται βιομηχανικά παγκοσμίως είναι 1 δισεκατομμύριο δολάρια, με αποτέλεσμα να είναι τα πιο εμπορικά ένζυμα. Οι πρωτεάσες αντιπροσωπεύουν μία εκ των τριών μεγαλύτερων ομάδων βιομηχανικών ενζύμων και υπολογίζεται ότι αποτελούν το 60% της συνολικής παγκόσμιας πώλησης των ενζύμων (Rao et al. 1998, Negi & Benerjee 2006).

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα παράγονται κυρίως από τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Rhizopus*, ενώ βρίσκουν ένα πλήθος εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες, όπως για παράδειγμα: στην τεχνολογία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων, στην παραγωγή μύρας, στην

τρυφεροποίηση του κρέατος, στη βελτίωση του ψωμιού και των προϊόντων ζαχαροπλαστικής, στη σύνθεση ασπαρτάμης αλλά και στη βιομηχανία παραγωγής απορρυπαντικών, στην επεξεργασία δέρματος κ.α. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει περισσότερο ενδιαφέρον στην θεραπευτική δράση των πρωτεασών ενάντια σε νόσους όπως ο καρκίνος, η μαλάρια και το AIDS. Τέλος, η λήψη δια της στοματικής οδού των πρωτεασών του *A. oryzae* έχουν χρησιμοποιηθεί ως βοήθημα πέψης έτσι ώστε να συμβάλλει θετικά σε σύνδρομα ανεπάρκειας συγκεκριμένων λυτικών ενζύμων (Poldermans 1990, Oner & Akar 1993, Rao et al. 1998, Fadyloglu 2001, Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006, Negi & Benerjee 2006).

Όσον αφορά στην παραγωγή πρωτεασών από μύκητες έχει αναφερθεί ότι η στερεή καλλιέργεια είναι ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος, λόγω της χαμηλής απαίτησής τους σε νερό σε σχέση με τα βακτήρια. Επίσης, η καλλιέργεια στερεής κατάστασης προσφέρει υψηλές αποδόσεις ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα είναι απλή και χαμηλού κόστους και τα ένζυμα που παράγονται είναι πιο συμπυκνωμένα σε σύγκριση με την καλλιέργεια υγρής κατάστασης. Ωστόσο, και η στερεή καλλιέργεια παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η ατελής αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος λόγω της χαμηλής παροχής οξυγόνου (Chutmanop et al. 2008).

Πρόκειται για υδρολυτικά ένζυμα που δρουν στους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Αποτελούν μία μεγάλη ομάδα ενζύμων με αρκετές διαφορές στις φυσικοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες. Παράγονται τόσο εξωκυτταρικά όσο και εσωκυτταρικά και παίζουν σπουδαίο ρόλο στον μεταβολισμό των κυττάρων και στις διεργασίες τους. Η διάκριση των πρωτεολυτικών ενζύμων γίνεται ανάλογα με τη θέση των πεπτιδικών δεσμών που υδρολύουν. Έτσι, υπάρχουν οι ενδοπεπτιδάσες ή πρωτεϊνάσες, οι οποίες δρουν στους εσωτερικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και οι εξωπεπτιδάσες, οι οποίες δρουν στους τελευταίους δεσμούς των πρωτεϊνών (Belitz & Grosch 1986, Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006). Επίσης, τα πρωτεολυτικά ένζυμα διαχωρίζονται και με βάση την περιοχή pH στην οποία δρουν σε: όξινες (ή καρβοξυπεπτιδάσες) (pH 2-6), ουδέτερες (ή μεταλλοπρωτεάσες) (pH ελαφρώς όξινο έως ελαφρώς ουδέτερο) και αλκαλικές (pH 8-13) οι οποίες έχουν στο ενεργό κέντρο τους τη σερίνη. Η κυριότερη πηγή μικροβιακών πρωτεασών από τους μύκητες είναι τα γένη *Aspergillus* και *Rhizomucor* και από τα βακτήρια το γένος *Bacillus* (Rao et al. 1998, Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006).

Ενδοπεπτιδάσες

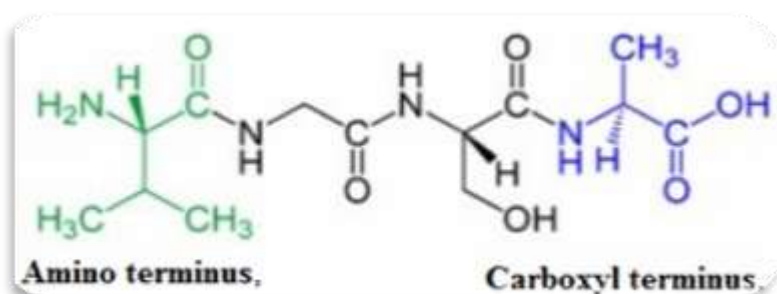
Οι ενδοπεπτιδάσες υδρολύουν τους εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς και παράγουν μικρότερα πολυπεπτίδια και πεπτίδια. Η διάκρισή τους βασίζεται στους διαφορετικούς μηχανισμούς που ακολουθούν κατά την αντίδραση με το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι εξής τέσσερις κατηγορίες: α) σερινικές-, β) κυστεϊνικές-, γ) ασπαρτικές- και δ) μεταλλο-πρωτεϊνάσες (Frost & Mos 1987). Η πιο γνωστή ενδοπεπτιδάση είναι η Subtilisin η οποία παράγεται από το βακτήριο *Bacillus*, ενώ από το γένος *Aspergillus* παράγονται ασπαρτικές- και αλκαλικές σερινικές-πρωτεϊνάσες (Rao et al. 1998).

Εξωπεπτιδάσες

Οι εξωπεπτιδάσες ή εξωπρωτεάσες δρουν στον ακραίο πεπτιδικό δεσμό και ελευθερώνουν ένα αμινοξύ. Η κατηγοριοποίηση αυτών των ενζύμων γίνεται ανάλογα με τη θέση στην οποία πραγματοποιείται η υδρόλυση κι έτσι διακρίνονται:

- α) η αμινοπεπτιδάση, όταν η υδρόλυση γίνεται στο αμινικό άκρο
- β) η καρβοξυπεπτιδάση, όταν η υδρόλυση γίνεται στο καρβοξυλικό άκρο και
- γ) η διπεπτιδάση, όταν δρα σε διπεπτίδιο

Οι αμινοπεπτιδάσες απαντώνται κυρίως σε βακτήρια και μύκητες και γενικά θεωρούνται εσωκυτταρικά ένζυμα. Παρόλα αυτά μία μελέτη με τον μύκητα *A. oryzae* έχει δείξει ότι παράγεται και εξωκυτταρική αμινοπεπτιδάση. Οι καρβοξυπεπτιδάσες μπορούν να διακριθούν σε σερινικές-, κυστεϊνικές- και μεταλλο-καρβοξυπεπτιδάσες, βάσει της φύσης του αμινοξέος που απομένει στην ενεργή θέση του ενζύμου (Rao et al. 1998, Γαλιώτου-Παναγιώτου 2006).



Εικόνα 1.4-1: Θέσεις υδρόλυσης των εξωπρωτεασών στο αμινικό και το καρβοξυλικό άκρο.

1.5 Αξιοποίηση τυρογάλακτος

Κατά την τυροκόμηση παράγονται μεγάλες ποσότητες τυρογάλακτος και αιωρούμενα στερεά (τυρόπηγμα), που χαρακτηρίζονται από υψηλό οργανικό φορτίο, άζωτο και φώσφορο. Το τυρόγαλα είναι ένα πρασινοκίτρινο υγρό που περιέχει σημαντικό ποσοστό των στερεών συστατικών του γάλακτος. Συγκεκριμένα κατά την τυροκόμηση το περίπου το 40-50% των στερεών συστατικών του γάλακτος μεταφέρονται στο τυρόγαλα. Κατά τους Fox et al. (2004) μόνο το 50% από τα στερεά που υπάρχουν στο γάλα ενσωματώνονται στο τυρί. Τα υπόλοιπα (90% της λακτόζης, 20% των πρωτεϊνών και το 10% του λίπους) παραμένουν στο τυρόγαλο. Οι Mishra et al. (2000) αναφέρουν ότι το τυρόγαλα αποτελείται από λακτόζη 4,5-5% w/v, διαλυτές πρωτεΐνες 0,6-0,8% w/v, λιπίδια 0,4-0,5% w/v και μεταλλικά άλατα 8-10% του ξηρού εκχυλίσματος.

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή γαλακτοκομικών και τυροκομικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή παραγωγή τυρογάλακτος. Σύμφωνα με τον Castillo (1990), παράγονται 145×10^6 τόνοι τυρογάλου ετησίως, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 6×10^6 τόνους λακτόζης. Στην Ελλάδα την περίοδο από το 1990 έως το 1995, η εξαγωγή Φέτας και πρόβειων τυριών ήταν τέτοια που αντιστοιχούσαν σε παραγωγή 600.000 τόνων τυρογάλου το χρόνο (Philippopoulos & Papadakis 2001).

Κατά την παρασκευή 1kg τυριού παράγονται 9kg τυρογάλου (Gonzalez Siso 1996), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι παραγόμενες ποσότητες είναι ένας σοβαρός παράγοντας που προκαλεί πρόβλημα στη διαχείρισή του. Το τυρόγαλα είναι υψηλής περιεκτικότητας σε οργανική ύλη. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα είναι ο μεγάλος βαθμός ρυπάνσεως του τυρογάλακτος και το υψηλό BOD₅ (35.000 – 55.000 mg O₂/L τυρογάλακτος), δηλαδή η ποσότητα (mg) οξυγόνου που χρειάζεται για την αποσύνθεσή του, με βιολογική οξείδωση του οργανικού φορτίου που έχει ένα λίτρο τυρογάλακτος σε διάρκεια 5 ημερών. Επίσης, το τυρόγαλα χαρακτηρίζεται από υψηλό COD (60.000-100.000 mg O₂ /L τυρογάλακτος) για χημική οξείδωση της οργανικής ύλης (Gonzalez Siso 1996, Ανυφαντάκης 2004). Τα παραπάνω καθιστούν την απόρριψη του αποβλήτου σε λίμνες, ποτάμια και θάλασσες, μεγάλο οικολογικό πρόβλημα γιατί επιφέρει ασφυξία στα ψάρια τα οποία πεθαίνουν μαζικά (Marwaha & Kennedy 1988, Ανυφαντάκης 2004). Ως εκ τούτου, η ανεξέλεγκτη απόρριψή τους στο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα ρύπανσης και διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας του περιβάλλοντος (Βαβουράκη 2010).

1.5.1 Παραγωγή μικροβιακού λίπους και ο ρόλος του *Zygomύκτητα Mortierella*

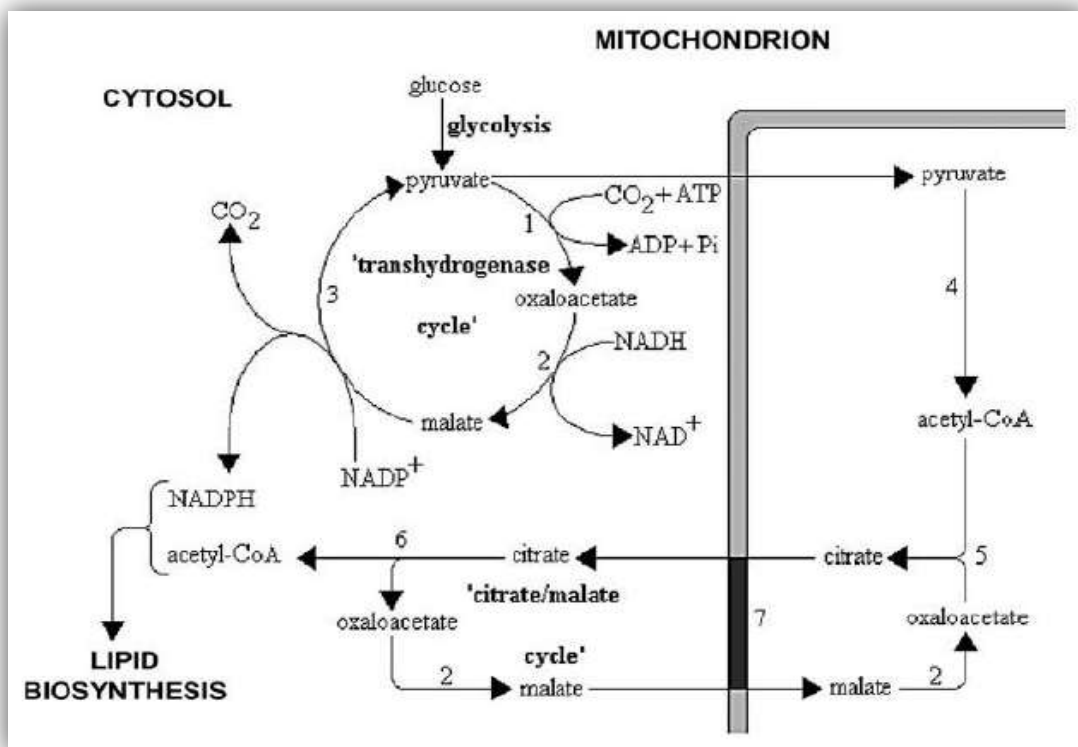
Τα τελευταία έτη πραγματοποιούνται όλο και περισσότερες έρευνες που αφορούν στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, το επονομαζόμενο και ως έλαιο μονοκύτταρων μικροοργανισμών (single cell oil, SCO). Τα μικροβιακά λιπίδια παράγονται από τους λεγόμενους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορεί να είναι ζύμες, μύκητες, σε μικρότερο βαθμό βακτήρια και αυτότροφα φωτοσυνθέτοντα μικροφύκη, που έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύουν λίπος σε ποσότητες μεγαλύτερες από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας (Ratledge & Wynn 2002, Papanikolaou & Aggelis 2011a, b).

Τα μικροβιακά λίπη δεν είναι ανταγωνιστικά σε οικονομικό επίπεδο των συμβατικών φυτικών ή ζωικών λιπών, έχουν όμως σημαντικό βιομηχανικό και οικολογικό ενδιαφέρον, λόγω της δυνατότητας των ελαιογόνων μικροοργανισμών να βιομετατρέπουν γεωργο-βιομηχανικά παρα- και υπο-προϊόντα σε λίπος ιδιαίτερης δομής και σύστασης. Παράγουν λίπη με υψηλή περιεκτικότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids- PUFA) σπάνια ευρισκόμενων στο φυτικό ή ζωικό βασίλειο (αραχιδονικό οξύ, γ- λινολενικό οξύ) ή λίπη υποκατάστατα εξωτικών λιπών (π.χ. λίπος κακάου) (Davies & Holdsworth 1992, Ratledge 1994, Koutinas & Papanikolaou 2011, Papanikolaou & Aggelis 2010, 2011a, b).

Η συσσώρευση του λίπους εντός των κυττάρων των μικροοργανισμών είναι μία αναβολική διεργασία η οποία λαμβάνει μέρος όταν στο περιβάλλον ανάπτυξης υπάρχει περίσσεια πηγής άνθρακα και εξάντληση κάποιου απαραίτητου θρεπτικού συστατικού, συνήθως του αζώτου. Στις συνθήκες αυτές ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να αναπτυχθεί περαιτέρω, αφού το άζωτο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Ωστόσο, η εναπομείνασα πηγή άνθρακα συνεχίζει να αφομοιώνεται από τον μικροοργανισμό με αποτέλεσμα τη σύνθεση λιπιδίων.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5-1, στη βιοσυνθετική οδό των λιπαρών οξέων των περισσοτέρων ελαιογόνων μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο το ακετυλο-CoA. Για το σχηματισμό ακετυλο-CoA είναι απαραίτητο το κιτρικό οξύ να είναι άμεσα διαθέσιμο στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Αρχικά, το κιτρικό οξύ συντίθεται μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle) στο μιτοχόνδριο του κυττάρου και εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα μετά την εξάντληση της πηγής αζώτου. Ουσιαστικά, υπό

συνθήκες έλλειψης αζώτου παρατηρείται διακοπή του κύκλου του Krebs γεγονός που οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, το οποίο καταλύει την διάσπαση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP). Έτσι παρατηρείται ταχεία μείωση της AMP προκειμένου το κύτταρο να εξοικονομήσει άζωτο, συστατικό απαραίτητο για περαιτέρω αύξηση, και ταυτόχρονη παρεμπόδιση του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge 1994, Papanikolaou et al. 2004). Αποτέλεσμα αυτής της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση του κιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου και όταν αυτό υπερβεί την συγκέντρωση ανοχής εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα πλέον και παρουσία της ATP-κιτρική λυάσης το κιτρικό οξύ διασπάται προς ακετυλο-CoA που χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ απαιτείται και η παρουσία NADPH, συνένζυμα τα οποία απορροφώνται σε μεγάλες ποσότητες κατά την αναβολική διεργασία σύνθεσης λιπαρών οξέων. Τα παραγόμενα λιπαρά οξέα τελικά εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge 1994).



Εικόνα 1.5-1: Συνεισφορά του κύκλου του Krebs και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος στην παροχή ακετυλοσυνένζυμου A και NADPH στη βιοσύνθεση λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (Ratledge 2004).

Οι μύκητες έχουν προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και ιδιαίτερα οι Ζυγομύκητες της τάξης *Mucorales*. Ειδικότερα τα είδη *Mortierella ramanniana* και *Mortierella isabelina* έχουν μελετηθεί σε πλήθος συνθετικών υποστρωμάτων (γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη) αλλά και σε σακχαρούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων όπως μελάσα, γλυκερόλη και τυρόγαλα με αξιοσημείωτα αποτελέσματα στην παραγωγή μικροβιακού λίπους (Papanikolaou et al. 2003, 2004, 2007, Chatzifragkou et al. 2010, Vamvakaki et al. 2010, Bellou et al. 2012, Demir et al. 2013, Gao et al. 2013). Η χρήση του τυρογάλακτος ως υπόστρωμα ζύμωσης έχει κάποιους περιορισμούς καθώς ο αριθμός των μικροοργανισμών που δύναται να το αποδομήσουν είναι σχετικά μικρός. Σε αυτούς τους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβάνονται ζύμες του γένους *Candida* sp. και *Cryptococcus* sp. (Davies & Holdsworth 1992) και μύκητες του γένους *Mortierella* sp. (Papanikolaou et al. 2007). Είδη τα οποία έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες λίπους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιοποίηση βιομηχανικών σακχαρούχων υπολειμμάτων μετατρέποντας αυτά τα υποστρώματα σε λίπος υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η αξιοποίηση του μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντήζελ 2^{ης} γενιάς (Chatzifragkou et al. 2010).

ΣΚΟΠΟΣ

Δοθέντος του γεγονότος ότι ελάχιστοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την αξιοποίηση των στεμφύλων οινοποιίας από μύκητες του γένους *Pleurotus*, ενώ δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα μελέτη που να εξετάζει τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε στερεή καλλιέργεια με υπόστρωμα οινολάσπης, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

- Η μελέτη των υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας ως υπόστρωμα για την στερεή, ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Pleurotus pulmonarius*.
- Η συγκριτική αξιολόγηση της ανάπτυξης των δύο ειδών *Pleurotus* μεταξύ των τριών ειδών καλλιέργειας, μέσω της εκτίμησης της παραγωγής βιομάζας, της ενεργότητας των ενζύμων λακκάσης και ενδογλυκανάσης και της κατανάλωσης των φαινολικών ουσιών του υποστρώματος.
- Η διερεύνηση τυχόν συσχετίσεων μεταξύ της βιομάζας, των παραγόμενων ενζύμων και της κατανάλωσης των φαινολικών ουσιών.
- Η διερεύνηση των προοπτικών αξιοποίησης των στεμφύλων προς παραγωγή καρποσωμάτων μανιταριών *Pleurotus*.
- Η περαιτέρω αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος των στεμφύλων οινοποιίας, που προκύπτει μετά τη συγκομιδή των μανιταριών, σε συνδυασμό με οινολάσπη μέσω της στερεής καλλιέργειας του *Aspergillus oryzae* προς παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων.
- Η βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων και η χρησιμοποίησή τους για την παραγωγή θρεπτικού υδρολύματος από οινολάσπη.

Επίσης, εξετάσθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους μέσω υγρής ζύμωσης του μύκητα *Mortierella ramanniana* στο θρεπτικό υδρόλυμα που παρήχθη από οινολάσπη, συνδυασμένο με το κυριότερο απόβλητο της τυροκόμησης, το τυρόγαλα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αξιοποίηση στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας στην καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus*

Στο πρώτο πειραματικό στάδιο που περιγράφεται σε αυτό το κεφάλαιο, μελετήθηκε η αύξηση δύο στελεχών του γένους *Pleurotus* σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας και σε συνθήκες υγρής, ημι-στερεής και στερεής κατάστασης.

2.1.1 Βιολογικό υλικό και παρασκευή υγρού εμβολίου

Καλλιεργήθηκαν δύο είδη του μύκητα *Pleurotus*, τα *P. ostreatus* AMRL 135 και *P. pulmonarius* AMRL 177. Οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών αυτών έχουν απομονωθεί και διατηρούνται στην τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του Ι.ΤΕ.ΓΕ.Π., ΕΛ.Γ.Ο.-ΔΗΜΗΤΡΑ, σε σωλήνες με Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) και παραφινέλαιο στους $2\pm 0,1$ °C.

Για την προετοιμασία του εμβολιαστικού υλικού, έγινε ανανέωση και ανάπτυξη των δύο στελεχών *Pleurotus* σε θρεπτικό υλικό PDA, στους 26 °C για περίπου επτά ημέρες. Στη συνέχεια, κωνικές φιάλες των 500 cc πληρώθηκαν με 150 mL θρεπτικό υλικό Glucose Yeast Supplements (GYS), με συγκέντρωση γλυκόζης (Alpha Aesar) 10 g/L, εκχυλίσματος ζύμης (Fluka) 1,5 g/L και μείγμα αλάτων η σύνθεση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 2.1-1. Οι κωνικές εμβολιάστηκαν με δύο ροδέλες Ø 7 mm από την ανανεωμένη καλλιέργεια σε PDA και επώαστηκαν για 12 ημέρες στους 26 ± 1 °C, υπό ανάδευση σε 140 ± 5 rpm (ZHICHENG ZHWY 211C, China). Ακολούθησε ομογενοποίηση της καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό (10% v/v) κωνικών φιαλών που περιείχαν GYS με συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L και εκχυλίσματος ζύμης 0,75 g/L (προκαλλιέργειες). Έπειτα από 6 ημέρες επώασης (26 ± 1 °C, 140 ± 5 rpm), οι προκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας.

Πίνακας 2.1-1: Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό υλικό Glucose Yeast Supplements (GYS).

GYS - Σύνθεση (g/L)		pH
CaCO ₃ (Sigma)	0,20	6,14
KH ₂ PO ₄	7,00	
K ₂ HPO ₄	2,50	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,30	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,15	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,04	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	

2.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Στην πρώτη πειραματική φάση χρησιμοποιήθηκαν στερεά υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας (grape pomace), τα οποία προέκυψαν από την ερυθρή οينوποίηση διαφόρων ποικιλιών στο Εργαστήριο Οиноποιίας του Ι.ΤΕ.ΓΕ.Π., ΕΛ.Γ.Ο.-ΔΗΜΗΤΡΑ. Τα νωπά υπολείμματα παραλήφθηκαν μετά την εξαγωγή τους από το μηχανικό πιεστήριο, ξηράθηκαν στους 80±1 °C και αλέσθηκαν σε μορφή σκόνης (<0,8 mm). Η ποσοστιαία αναλογία των υπολειμμάτων σε γίγαρτα, φλοιούς και βοστρύχους ήταν 49,5%, 47% και 3,5% (αναλογία 13:12:1) αντίστοιχα, ενώ τα χαρακτηριστικά τους όσον αφορά στη χημική τους σύσταση συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1-2.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε υγρή προκαλλιέργεια των μυκήτων σε υδρόλυμα προερχόμενο από τα υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας και στη συνέχεια υγρή, ημι-στερεή και στερεή ζύμωση των υπολειμμάτων. Για την χημική υδρόλυση των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: ξηρό δείγμα προστέθηκε σε αιθανόλη 95% υπό βρασμό (αναλογία στερεού:διαλύτη 1:5), ομογενοποιήθηκε και παρέμεινε σε βρασμό για 5 min.

Πίνακας 2.1-2: Χαρακτηριστικά των υπολειμμάτων στεμφύλων ερυθρής οиноποιίας.

Παράμετροι	Μετρήσεις(% w/w)
Ξηρά ουσία	36,0
Υγρασία	64,0
Τέφρα	10,2 ^a
Εκχυλίσμα σάκχαρα	20,0 ^{a,β}
Ολικές ινώδεις ουσίες	22,0 ^{a,γ}
Klason lignin	50,5 ^{a,δ}
Ολικές αζωτούχες ουσίες	14,2 ^{a,γ}
Εκχυλίσμα φαινολικά συστατικά	0,5 ^{a,ε}

^a Υπολογισμένα επί ξηρού βάρους, ^β Μέθοδος DNS (Miller 1959), ^γ Μέθοδος σύμφωνα με τον Καν. 152/2009, ^δ Saeman et al. 1954, ^ε Εκφρασμένα σε ισοδύμια γαλλικού οξέος.

Έπειτα, το μείγμα κρύωσε σε θερμοκρασία δωματίου, ομογενοποιήθηκε και μέσω διήθησης απομακρύνθηκε το υγρό κλάσμα. Το ίζημα που προέκυψε εκχυλίστηκε ξανά με την ίδια διαδικασία για άλλες δύο φορές, ενώ στο τέλος ξεπλύθηκε με απόλυτη αιθανόλη (Waldron & Selvendram 1990, Femenia et al 1998). Το ίζημα ξήρανε για 12 ώρες και ακολούθησε όξινη υδρόλυση με H_2SO_4 72% (αναλογία στερεού:οξέος 1:12,5) για 3 ώρες στους 20 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε απιονισμένο νερό ώστε να προκύψει διάλυμα H_2SO_4 1 M και ακολούθησε θέρμανση στους 100 °C για 2,5 ώρες. Το μητρικό υδρόλυμα προέκυψε με διήθηση μέσω ηθμού Whatman No. 3 και κατόπιν εξουδετέρωσης της περίσσειας του οξέος με κορεσμένο διάλυμα KOH (Saeman et al 1954, Hoebler et al 1989, Femenia et al 1998).

2.1.3 Καλλιέργεια των μυκήτων *Pleurotus* σε υδρόλυμα από υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας

Με την διαδικασία της χημικής υδρόλυσης των υπολειμμάτων στεμφύλων οиноποιίας, όπως αυτή περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο, παραλήφθηκε μητρικό υδρόλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των δύο μυκήτων *Pleurotus*. Σκοπός της υγρής ζύμωσης ήταν η δημιουργία καμπύλης αναφοράς της γλυκοζαμίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την έμμεση εκτίμηση της βιομάζας των δύο ειδών μυκήτων κατά την μετέπειτα καλλιέργειά τους στα ίδια στερεά υπολείμματα.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες σε υδρόλυμα από υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας, εμπλουτισμένες με γλυκόζη (4 g/L), εκχύλισμα ζύμης (0,73 g/L) και άλατα σε σύσταση ανάλογη του πίνακα 2.1-1, με τελικό pH πριν την αποστείρωση 6,4. Κωνικές φιάλες των 500 cc για κάθε μύκητα πληρώθηκαν με 200 mL εμπλουτισμένου υδρολύματος, εμβολιάστηκαν με 60 mL υγρό εμβόλιο και επώαστηκαν στους 26 ± 1 °C, υπό ανάδευση (140 ± 5 rpm) για 6 ημέρες.

2.1.3.1 Συλλογή και προσδιορισμός βιομάζας

Η συλλογή της βιομάζας έγινε με διήθηση υπό κενό μέσω ηθμού Whatman No. 1, ακολουθώντας τριπλή έκπλυση της βιομάζας με απιονισμένο νερό. Το διήθημα αποθηκεύτηκε σε συνθήκες κατάψυξης (-20 ± 1 °C), ενώ το νωπό μυκήλιο τοποθετήθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και μετρήθηκε το βάρος του σε

ζυγαριά ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern). Στη συνέχεια, το μυκήλιο ξηράνθηκε στους 60 ± 1 °C μέχρι απόκτησης σταθερού βάρους (περίπου 3 ημέρες).

2.1.3.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας της βιομάζας σε γλυκοζαμίνη

Ο προσδιορισμός έγινε σε δείγματα ξηρής βιομάζας, τα οποία τεμαχίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια έτσι ώστε να υπάρχει διαβάθμιση βάρους δειγμάτων για κάθε μύκητα από 5-1000 mg.

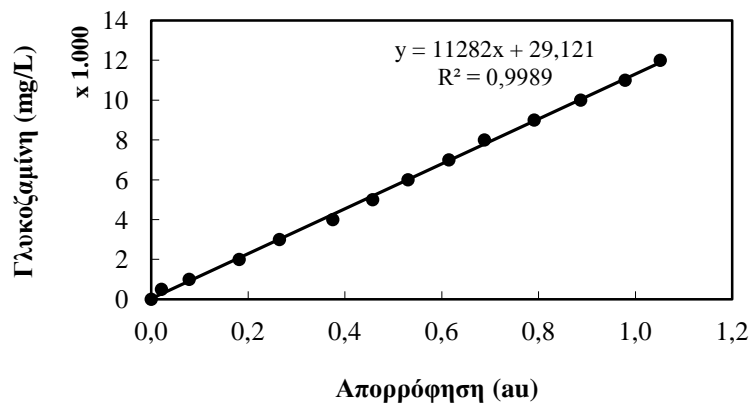
Εφαρμογή της μεθόδου

1^ο στάδιο (υδρόλυση χιτίνης): Σε γνωστή ποσότητα (g) ξηρού δείγματος βιομάζας προστέθηκαν 10 mL H₂SO₄ 72% και ακολούθησε επώαση για 30 min σε 130 ± 5 rpm. Στη συνέχεια το μίγμα αραιώθηκε με 54 mL απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκε για 2 ώρες στους 121 ± 1 °C. Μετά την αποστείρωση, έγινε ουδετεροποίηση σε pH 7 με 10 M NaOH και στη συνέχεια με 0,5 M NaOH.

2^ο στάδιο (φωτομετρικός προσδιορισμός): Παραλήφθηκαν 3mL από το ουδετεροποιημένο μίγμα, όπου προστέθηκαν 3 mL NaNO₂ (Merck) 5% και 3 mL KHSO₄ (Merck) 5%. Το μίγμα ανακινήθηκε για 15 min και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε σε 1500 rpm (Hettich Micro22R) στους 2 °C για 2 min. Σε 3 mL, αυτού του μίγματος, προστέθηκε 1 mL NH₄SO₃NH₂ 12,5% και ανακινήθηκαν για 5 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL MBTH 0,5% και το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο με βραστό νερό, για 3 min. Αφού κρύωσε σε θερμοκρασία δωματίου έγινε προσθήκη 1 mL FeCl₃. Μετά από μισή ώρα ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 650 nm σε φωτόμετρο τύπου JASCO, V-530 UV/VIS. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού δείγματος (blank) αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων της ξηρής βιομάζας.

Καμπύλη αναφοράς καθαρής γλυκοζαμίνης

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της καθαρής γλυκοζαμίνης παρασκευάστηκαν 12 διαλύματα γλυκοζαμίνης συγκέντρωσης 500-12.000 ppm σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια έγινε φωτομετρικός προσδιορισμός (2^ο στάδιο μεθόδου) και οι απορροφήσεις που προέκυψαν έδωσαν την καμπύλη αναφοράς όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2.1-1.



Διάγραμμα 2.1-1: Καμπύλη αναφοράς καθαρής γλυκοζαμίνης (mg/L).

Τέλος, με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 2.1-1) και τις βιομάζες που προσδιορίστηκαν κατά την καλλιέργεια των *Pleurotus* στο εμπλουτισμένο υδρόλυμα, προσδιορίστηκαν οι σχέσεις βιομάζας-γλυκοζαμίνης όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.1-3.

Πίνακας 2.1-3: Εξισώσεις των σχέσεων γλυκοζαμίνης προς βιομάζα για τα είδη *P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177, κατά την καλλιέργεια υγρής κατάστασης σε εμπλουτισμένο υδρόλυμα στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας.

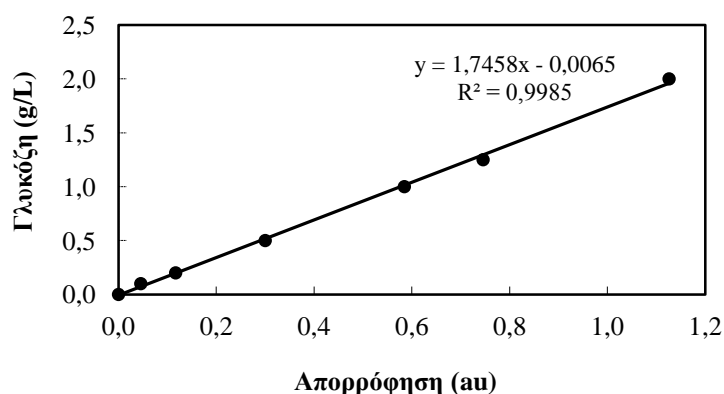
Μύκητας	Εξίσωση γλυκοζαμίνης mg (x) /βιομάζας g (y)	R ²
<i>P. ostreatus</i> 135	$y = 0,0529x - 0,0735$	0,9808
<i>P. pulmonarius</i> 177	$y = 0,0578x - 0,0715$	0,9889

2.1.3.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του DNS προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου

Σε 0,5 mL εκχυλίσματος καλλιέργειας προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS ακολουθώντας ανάδευση και θέρμανση στους 100 °C για 5 min ακριβώς και ψύξη αμέσως με H₂O (20 °C). Έπειτα, προστέθηκαν 5 mL απιονισμένο H₂O, αναδεύτηκαν και οι απορροφήσεις φωτομετρήθηκαν στα 540 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς του Διαγράμματος 2.1-2, εκφρασμένη σε g/L γλυκόζης.



Διάγραμμα 2.1-2: Καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης (g/L) με την μέθοδο DNS.

2.1.4 Καλλιέργειες στερεής, ημι-στερεής και υγρής κατάστασης των μυκήτων *Pleurotus* σε στερεά υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας

Οι καλλιέργειες αυτού του πειράματος πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 cc που περιείχαν 4 g στερεού υπολείμματος στεμφύλων οινοποιίας και αφού αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο για 20 min στους 121 ± 1 °C, εμβολιάστηκαν με 10 mL υγρού εμβολίου από τον κάθε μύκητα. Έπειτα, προστέθηκε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό στις φιάλες που προοριζόταν για ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια, έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 0,2 g/mL και 0,04 g/mL αντίστοιχα (Couto et al 1999, Elisashvili et al 2009) (Πίνακας 2.1-4). Ακολούθησε επώαση στους 26 ± 1 °C και υπό ανάδευση σε 140 ± 5 rpm για 20 ημέρες.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες (9^η, 15^η και 20^η ημέρα καλλιέργειας), από τρεις επαναλήψεις για κάθε στέλεχος και είδος καλλιέργειας του μύκητα *Pleurotus*. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, μέρος του νωπού δείγματος προορίστηκε για μέτρηση φαινολικών συστατικών και υγρασίας, ενώ το υπόλοιπο δείγμα καταψύχθηκε για περίπου 10 ημέρες, αποξηράνθηκε με λυοφυλίωση (Heto LyoLab 3000 freeze-dryer) και αλέσθηκε για να προσδιοριστούν η γλυκοζαμίνη και οι ενζυμικές ενεργότητες της λακκάσης και της ενδογλυκανάσης.

Πίνακας 2.1-4: Συνοπτική παρουσίαση της σύστασης της στερεής, ημι-στερεής και υγρής καλλιέργειας και των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Είδος καλλιέργειας	Σ.Υ.Σ* (g)	Εμβόλιο (mL)	Προσθήκη νερού (mL)	Αναλύσεις
Στερεή	4	10	-	- Φαινολικά συστατικά
Ημι-στερεή	4	10	10	- Γλυκοζαμίνη
Υγρή	4	10	90	- Λακκάση
				- Ενδογλυκανάση

*Σ.Υ.Σ.: Στερεό υπόλειμμα στεμφύλων

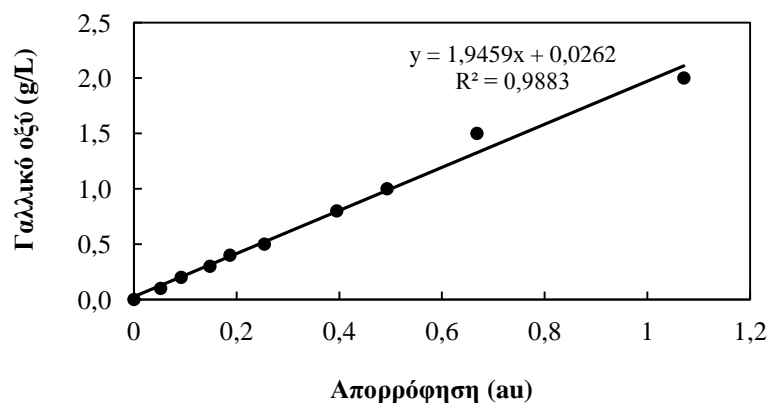
2.1.4.1 Εκτίμηση παραγόμενης βιομάζας

Η παραγόμενη βιομάζα στις διάφορες καλλιέργειες που μελετήθηκαν σε αυτό το πειραματικό στάδιο, εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης, η οποία έχει περιγραφεί στο κεφ. 2.1.1.2. Για την μετατροπή της μετρούμενης γλυκοζαμίνης (mg) σε βιομάζα (g) χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις του Πίνακα 2.1-3 οι οποίες περιγράφουν τη σχέση γλυκοζαμίνης-βιομάζας κατά την υγρή ζύμωση των δύο ειδών *Pleurotus* σε υδρόλυμα από στερεά υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης.

2.1.4.2 Εκχύλιση και προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Η διαδικασία εκχύλισης των φαινολικών συστατικών από το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε ως εξής: σε κωνική φιάλη συλλέχθηκαν 5 g νωπού δείγματος, με γνωστό ξηρό βάρος, προστέθηκαν 20 mL μεθανόλης και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (Puoçi et al. 2011) για 1 ώρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα μέσω διηθητικού χαρτιού (προσθήκη Na_2SO_4 στον ηθμό) και συλλογή του εκχυλίσματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές με 10 mL μεθανόλης για 30 min και 5 mL μεθανόλης για 30 min. Τα διηθήματα από τις τρεις εκχυλίσεις συλλέχθηκαν όλα μαζί σε σφαιρικές φιάλες και συμπυκνώθηκαν πλήρως στους 40 ± 1 °C με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (Mishra et al. 2010). Τέλος, τα φαινολικά συστατικά επανεκχυλίστηκαν σε 15 mL μεθανόλης, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια McCartney και αποθηκεύτηκαν στους -20 ± 1 °C.

Τα ολικά εκχυλίσματα φαινολικά συστατικά προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σε 0,2 mL δείγματος προστίθενται 10,8 mL απιονισμένου νερού, 8 mL διαλύματος Na_2CO_3 (75 g/L) και 1 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (με τη σειρά που αναφέρονται). Το μείγμα παρέμεινε σε ηρεμία και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες, ακολουθώντας φωτομέτρηση στα 750 nm. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών εκφράστηκε σε ανάλογα γαλλικού οξέος (g/L και mmol/L) με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος (Διάγραμμα 2.1-3). Για την παρασκευή του τυφλού ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με 0,2 mL απιονισμένο νερό αντί για δείγμα.



Διάγραμμα 2.1-3: Καμπύλες αναφοράς γαλλικού οξέος (g/L) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteau.

2.1.4.3 Παραλαβή ακατέργαστου ενζύμου

Η παραλαβή του ακατέργαστου ενζύμου καθώς και ο προσδιορισμός των ενζυμικών ενεργοτήτων που περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Philippoussis et al. (2011). Λυοφυλιωμένο δείγμα βάρους 2 g τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 cc μαζί με 20 mL ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (0,05 M, pH=5,0) και αναδεύτηκαν (100±5 rpm) για 1 ώρα στους 25±1 °C. Στην συνέχεια, έγινε διήθηση υπό κενό μέσω φίλτρου Whatman No. 2 και μετρήθηκαν ο όγκος και το pH του υγρού. Ακολούθησε φυγοκέντριση (10.500 rpm για 15 min στους 4±0,1 °C) και το εκχύλισμα που προέκυψε αποτέλεσε το ακατέργαστο ένζυμο, το οποίο αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια υπό κατάψυξη (-20±1 °C) έως ότου μετρηθούν οι ενζυμικές ενεργότητες.

2.1.4.4 Ενζυμικός προσδιορισμός λακκάσης

Για τον προσδιορισμό της λακκάσης αναμείχθηκαν 0,2 mL δείγματος ακατέργαστου ενζύμου και 1,7 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού οξέος (0,1 M, pH=6,8), αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 10 min στους 30±1 °C. Έπειτα, προστέθηκε 0,1 mL διαλύματος syrigaldazine (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydeazine 1 mM w/v σε απόλυτη αιθανόλη, Sigma) και αμέσως ακολούθησε μέτρηση στο φωτόμετρο για 10 min στα 525 nm. Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου λακκάσης ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να προκληθεί αλλαγή στην απορρόφηση κατά 0,001/ min στις παρούσες συνθήκες του πειράματος.

2.1.4.5 Ενζυμικός προσδιορισμός ενδογλυκανάσης

Για τον ενζυμικό προσδιορισμό της ενδογλυκανάσης σε 0,5 mL δείγματος ακατέργαστου ενζύμου προστέθηκε 0,5 mL CMC (carboxymethylcellulose sodium salt, Sigma) 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (0,05 M, pH 4,8) αναδεύτηκαν και επώαστηκαν για 30 min στους 50 ± 1 °C. Στην συνέχεια, προστέθηκε 1 mL διαλύματος DNS και ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος όπως έχει περιγραφεί στο κεφ. 2.1.1.3. Μία μονάδα (U) ενεργότητας ενζύμου ενδογλυκανάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να παραχθεί 1 μmol γλυκόζης σε 1 min σε pH 4,8 σε θερμοκρασία 50 ± 1 °C και υπόστρωμα CMC 1% w/v. Για τον υπολογισμό της ποσότητας της ενδογλυκανάσης χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τη μέθοδο DNS (Διάγραμμα 2.1-2).

2.1.5 Παραγωγή μανιταριών *Pleurotus* σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας

Στο τελευταίο πείραμα, που αφορά στην αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μανιταριών *Pleurotus* ενώ στη συνέχεια αξιολογήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος που προκύπτει μετά την συγκομιδή μανιταριών.

Στερεά υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας, ίδιας σύστασης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα του κεφ. 2.1, χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την καλλιέργεια μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Pleurotus pulmonarius*. Τα υπολείμματα αρχικά διαβρέχτηκαν για 12 ώρες, έπειτα στράγγιξαν και εμπλουτίστηκαν με 5% πίτυρο σίτου, 5% σογιάλευρο και 1% CaCO_3 . Η τελική υγρασία του υποστρώματος, πριν την αποστείρωση, ήταν 52% και το pH 6,5.

Για κάθε είδος μύκητα, πληρώθηκαν 8 υάλινοι περιέκτες χωρητικότητας 600 cc με το υπόστρωμα και αποστειρώθηκαν για 1,5 ώρες σε αυτόκλειστο στους 121 ± 1 °C. Ακολούθησε εμβολιασμός με υγρό εμβόλιο και επώαση στους 26 ± 1 °C, έως ότου το μυκήλιο αποικήσει σε όλο το υπόστρωμα. Στη συνέχεια, η καρποφορία των μανιταριών πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 17 ± 1 °C με την εφαρμογή φωτός (~150-200 lux) για 12 ώρες/ημέρα. Μετά την συλλογή των μανιταριών και με το πέρας της καλλιέργειας, το εξαντλημένο υπόστρωμα που προέκυψε ξηράνθηκε στους 60 ± 1 °C μέχρι σταθερού βάρους και αποθηκεύτηκε για να εξεταστεί σε επόμενα πειράματα.

2.1.5.1 Προσδιορισμός αριθμού και βάρους καρποφοριών

Σε κάθε κύμα καρποφορίας γινόταν καταγραφή του συνολικού αριθμού των καρποφοριών και το νωπό βάρος τους (g) μετρήθηκε σε ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων (Bell Engineering).

2.1.5.2 Προσδιορισμός απόδοσης και βιολογικής αποδοτικότητας

Ο υπολογισμός της απόδοσης (ΑΠ) καθώς και της βιολογικής αποδοτικότητας (ΒΑ) των παραγόμενων μανιταριών πραγματοποιήθηκε από τις παρακάτω εξισώσεις, αντίστοιχα:

$$ΑΠ \% = (\text{νωπό β. καρποφοριών} / \text{νωπό β. υποστρώματος}) \times 100$$

$$ΒΑ \% = (\text{νωπό β. καρποφοριών} / \xi. \beta. \text{ υποστρώματος}) \times 100$$

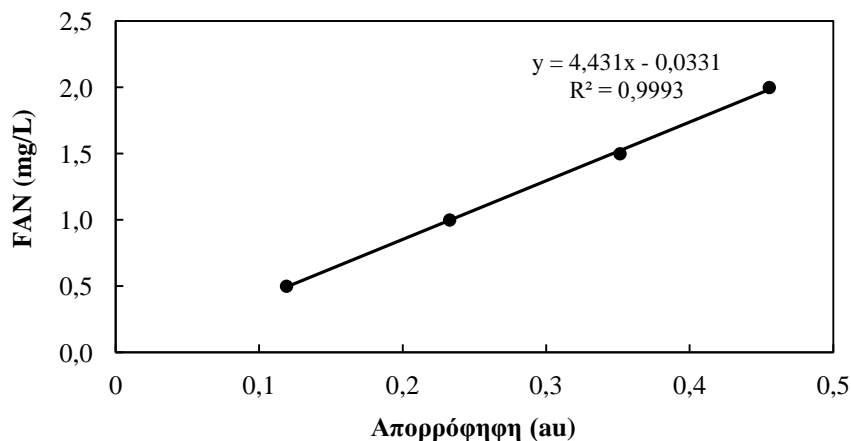
2.2 Αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus* μέσω της αυτόλυσης

Σε αυτό το κεφάλαιο, μελετήθηκε η αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus* (*spent mushroom substrate, SMS*), που προέκυψε από το προηγούμενο πείραμα. Σε πρώτη φάση αξιολογήθηκε η δυνατότητα της αυτόλυσης του SMS ως εναλλακτική μέθοδο για την παραγωγή υδατικού μέσου πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Σκοπός της παραγωγής ενός τέτοιου θρεπτικού μέσου είναι η χρησιμοποίησή του σε μικροβιακές ζυμώσεις.

Για την πραγματοποίηση του παρόντος, παραλήφθηκε ξηρό SMS από τα δύο είδη *Pleurotus* και μία ποσότητα αυτού αλέσθηκε σε μορφή σκόνης, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μορφής του υποστρώματος (αλεσμένου και μη SMS). Χρησιμοποιήθηκαν φιάλες Duran του 1 L οι οποίες πληρώθηκαν με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν στους 121 ± 1 °C για 20 min. Υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκε το SMS στις φιάλες Duran σε συγκέντρωση 50 g/L. Η διεργασία της αυτόλυσης πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στους 55 ± 1 °C, υπό ανάδευση για 48 ώρες και σε φυσικό pH. Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της αυτόλυσης και στα δείγματα προστέθηκε ίση ποσότητα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v για την αδρανοποίηση των ενζύμων.

2.2.1.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie 1973). Συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 ± 1 °C για 16 min, ακολουθώντας ψύξη των δειγμάτων μέσα σε νερό στους 20 °C (20 min). Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν μέχρι την αλλαγή χρώματος. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα περιείχε 1 mL νερό αντί για δείγμα, και η απορρόφησή του αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L FAN (Διάγραμμα 2.2-1). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.



Διάγραμμα 2.2-1: Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN.

2.3 Αξιοποίηση του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus* σε συνδυασμό με οινολάσπη

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών *Pleurotus* σε συνδυασμό με ένα άλλο στερεό απόβλητο της οινοποίησης, την οινολάσπη, δημιουργώντας ένα κατάλληλο υπόστρωμα στερεής καλλιέργειας για τον μύκητα *Aspergillus oryzae*. Στόχος ήταν η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, καθώς και η αριστοποίηση της διεργασίας, με απώτερο σκοπό την παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και κατάλληλο για μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

2.3.1 Βιολογικό υλικό

Για την καλλιέργεια στερεάς κατάστασης χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του μύκητα *Aspergillus oryzae* το οποίο προήλθε από εργοστάσιο παραγωγής σάλτσας σόγιας (Amoy Food Ltd., Hong Kong). Ο μύκητας φυλάσσεται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σε αφυδατωμένη κατάσταση, υπό μορφή σπορίων σε γυάλινα φιαλίδια με silica gel στους $4\pm 0,1$ °C (Wang et al. 2005). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων το στέλεχος ενυδατώθηκε, απομονώθηκε (με τη μέθοδο streaking) και αποθηκεύτηκε σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 2% w/v nutrient agar (Lab M), 2% w/v πίτυρο σίτου και 3% w/v ηλιόλευρο (ηλιόπιτα), στους $4\pm 0,1$ °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούταν ανανέωση του μύκητα, ώστε να διατηρηθεί η ζωτικότητα του.

Πριν από τον εμβολιασμό των στερεών υπολειμμάτων, κωνικές φιάλες των 250 cc πληρούνταν με θρεπτικό μέσο ίδιας σύνθεσης με αυτό των δοκιμαστικών σωλήνων, αποστειρώνονταν στους 121 ± 1 °C για 20 min και στη συνέχεια εμβολιάζονταν με 2 mL εναιωρήματος σπορίων. Το εναιώρημα παρασκευαζόταν με την προσθήκη 7 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, που περιείχε 1-2 σταγόνες γαλακτωματοποιητή Tween 80 (Sigma-Aldrich), στους κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με τον ανεπτυγμένο μύκητα. Ακολουθούσε επώαση στους 30 ± 1 °C για περίπου 4 ημέρες. Οι καλλιέργειες αυτές αποτελούσαν το εμβολιαστικό υλικό των στερεών υπολειμμάτων (Kachrimanidou et al. 2013).

2.3.2 Θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών (spent mushroom substrate, SMS)

Η παραγωγή του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών έχει ήδη περιγραφεί στο κεφ. 2.1.3.

Οινολάσπη (wine lees, WL)

Η προοπτική αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών μελετήθηκε σε συνδυασμό με οινολάσπη. Τα υπολείμματα της οινολάσπης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη προέκυψαν από ερυθρή οينوποίηση στεμφύλων ποικιλίας Merlot, και προτού χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα καλλιέργειας υπέστη επεξεργασία η οποία περιγράφεται στη συνέχεια.

Στην Εικόνα 2.3-1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα επιμέρους στάδια που πραγματοποιήθηκαν για την επεξεργασία της οινολάσπης. Αρχικά, παραλήφθηκε η οινολάσπη και φυγοκεντρήθηκε στις 9000 rpm (10 °C), προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και να επεξεργαστούν ξεχωριστά. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης είναι ένα αλκοολούχο διάλυμα, το οποίο αποστάχθηκε με σκοπό να παραληφθεί ένα θρεπτικό υγρό άνευ αλκοόλης. Επίσης, μέσω αυτής της διαδικασίας ανακτήθηκε η αιθανόλη, ένα προϊόν προστιθέμενης αξίας.

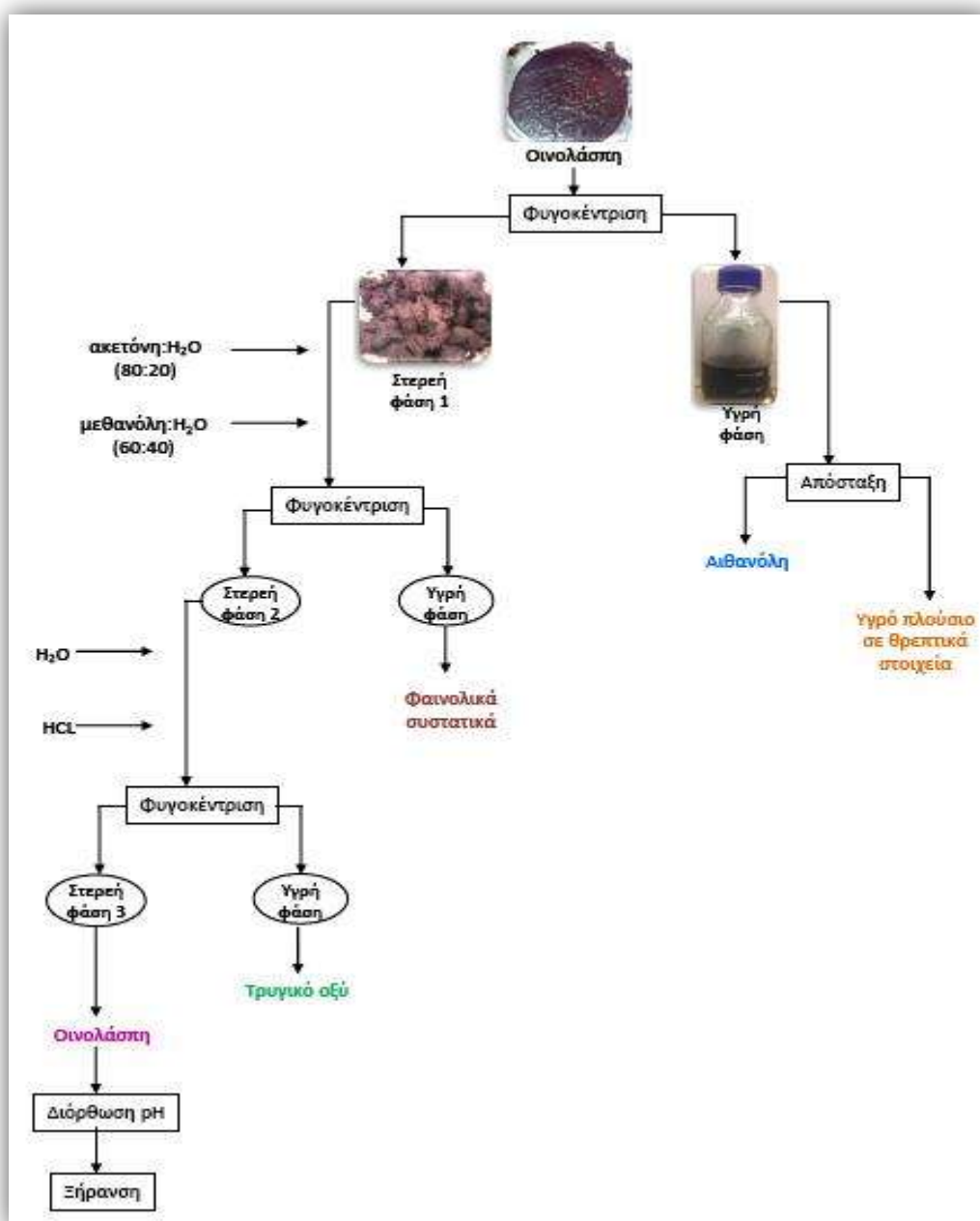
Το ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντριση αποτελεί την οινολάσπη, η οποία είναι πλούσια σε ζυμομύκητες και μπορεί να αποτελέσει σημαντική πηγή αζώτου για μικροβιακές ζυμώσεις. Η αξιοποίηση της οινολάσπης προς αυτή την κατεύθυνση ήταν εφικτή αφού πρώτα απομακρύνθηκαν τα αντιοξειδωτικά συστατικά και το τρυγικό οξύ. Τούτο, πραγματοποιήθηκε στα εξής δύο στάδια:

A) Απομάκρυνση φαινολικών συστατικών:

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε νωπή οινολάσπη (στερεή φάση 1) και προστέθηκε διάλυμα ακετόνης:H₂O (αναλογία 80:20) σε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 5,3 mL/g ξηρής οινολάσπης. Το μείγμα ανακινήθηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κι έπειτα φυγοκεντρήθηκε (9000 rpm, 5 °C). Στο νωπό ίζημα, που προέκυψε, προστέθηκε διάλυμα μεθανόλης:H₂O (αναλογία 60:40) σε ποσότητα ίση με 2,6 mL/g ξ. οινολάσπης, ακολουθώντας ανακίνηση για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντριση (9000 rpm, 5 °C) (Chira et al. 2009).

B) Απομάκρυνση τρυγικού οξέος:

Το νωπό ίζημα (στερεή φάση 2), που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο, επαναδιαλύθηκε σε 3,15 mL απιονισμένο νερό /g ξ. οινολάσπης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,361 mL π. HCL /g ξ. οινολάσπης, το μείγμα ανακινήθηκε για 10 min και φυγοκεντρίθηκε (9000 rpm, 5 °C) (Salgado et al. 2010). Τέλος, πραγματοποιήθηκε διόρθωση της τιμής του pH στο 5,5 με NaOH 10 M, ξήρανση στους 100±1 °C μέχρι σταθερού βάρους και αποθήκευση σε ξηρό μέρος.



Εικόνα 2.3-1: Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας της οινολάσπης.

2.3.3 Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπη

Η καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπης πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 cc, στις οποίες προστέθηκαν συνολικά 5 g στερεών υπολειμμάτων. Μετά την αποστείρωση των κωνικών φιαλών στους 121 ± 1 °C για 20 min, ακολουθούσε ο εμβολιασμός τους με εναιώρημα σπορίων του μύκητα. Τούτο γινόταν με προσθήκη απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού (που περιείχε 1-2 σταγόνες γαλακτωματοποιητή Tween 80), μέσα στις κωνικές φιάλες με τον ανεπτυγμένο μύκητα, ηλικίας περίπου 4 ημερών, ακολουθούμενη από έντονη ανάδευση με αποστειρωμένα μικρά γυάλινα σφαιρίδια, ώστε να απελευθερωθούν τα σπόρια του μύκητα. Το εναιώρημα αυτό, των σπορίων αποτελούσε το εμβόλιο για κάθε κωνική φιάλη με στερεά υπολείμματα, ενώ η ποσότητα του εμβολίου καθοριζόταν κάθε φορά από το ποσοστό της τελικής προς μελέτη υγρασίας. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 30 ± 1 °C.

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας των δύο υποστρωμάτων (εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπης), της υγρασίας και του χρόνου ζύμωσης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων σε πέντε διαφορετικές αναλογίες μεταξύ των υποστρωμάτων (70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70), σε ένα εύρος υγρασίας 50-75% και σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης.

2.3.3.1 Παραλαβή ακατέργαστου ενζύμου

Για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής ενεργότητας, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Wang et al. (2008) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα 2,5 g από την κωνική φιάλη ζύμωσης στερεάς κατάστασης αναμείχθηκαν με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος-όξινου φωσφορικού νατρίου σε μπλέντερ κουζίνας για ~5 min. Το μείγμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 30 min, στις 9000 rpm και στους 5 °C. Ακολούθησε φιλτράρισμα του υπερκείμενου με φιλτράκια Whatman 0,2 μm και το υγρό που προέκυψε αποτελούσε το ακατέργαστο ένζυμο.

2.3.3.1 Προσδιορισμός ενεργότητας πρωτεολυτικών ενζύμων

Παραλήφθηκαν 5 mL ακατέργαστου ενζύμου και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 5 mL καζεΐνης ($C_{\text{casein}}=7,5\text{g/L}$), μέσα σε υδατόλουτρο στους 55 ± 1 °C για 30 min. Δείγματα 0,8 mL ελήφθησαν στο χρόνο t_0 (πριν την υδρόλυση με καζεΐνη) και στον τελικό χρόνο t_{30} , μετά την υδρόλυση, στα οποία προστέθηκε ίση ποσότητα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v για την αδρανοποίηση των ενζύμων. Η πρωτεολυτική ενεργότητα προσδιορίστηκε μετρώντας το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και εκφράστηκε σε μονάδα ενεργότητας (U). Μία μονάδα (U) ορίστηκε ως η ποσότητα πρωτεασών που απαιτείται για την παραγωγή 1 μg FAN ανά min, στις παρούσες συνθήκες του πειράματος.

2.3.3.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.2.1.1.

2.3.4 Υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας κατάλληλο για μικροβιακές ζυμώσεις

Με τις βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών και οινολάσπη, το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα της ζύμωσης προστέθηκε σε εναιώρημα που περιείχε πρόσθετη ποσότητα ξηρής οινολάσπης και το υγρό που παραλήφθηκε από τη φυγοκέντριση της οινολάσπης και κατόπιν απόσταξης (βλ. κεφ. 2.3.2., εικόνα 2.3-1). Σκοπός του πειράματος ήταν να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες υδρόλυσης, έτσι ώστε να παραχθεί υδατικό μέσο καλλιέργειας, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (π.χ. πηγές αζώτου), τα οποία είναι απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα της ζύμωσης αναμείχθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε μπλέντερ κουζίνας μαζί με 500 mL αποστειρωμένου υγρού βινάσσας και μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L, που περιείχε διαφορετικές ποσότητες αποστειρωμένης ξηρής οινολάσπης. Για κάθε φιάλη Duran χρησιμοποιήθηκαν συνολικά δύο κωνικές φιάλες από τη ζύμωση στερεής κατάστασης του *A. oryzae*.

Στη συνέχεια η φιάλη Duran τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση και λήφθηκε δείγμα για τη χρονική στιγμή t_0 , ενώ δείγματα λαμβάνονταν και ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να παρακολουθείται η μεταβολή του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN). Στα δείγματα προστέθηκε ίση ποσότητα τριγλωροξικού οξέος (TCA) 5% w/v για την αδρανοποίηση των ενζύμων. Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης έλαβε χώρα στους 45 ± 1 °C, σε pH 5,5 για 50 ώρες περίπου και με αρχική συγκέντρωση ξηρής οινολάσπης 100 g/L. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

Η περαιτέρω αξιοποίηση του υδρολύματος, ως θρεπτικό υγρό μικροβιακής ζύμωσης, απαιτεί φιλτράρισμα με τουλπάνι για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα σωματίδια και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 10 min (9000 rpm, 5 °C). Το υπερκείμενο υγρό δύναται να αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.3.4.1 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.2.1.1.

2.4 Αξιοποίηση υδρολύματος οινολάσπης και τυρογάλακτος προς παραγωγή μικροβιακού λίπους

Το υδρόλυμα οινολάσπης που παρήχθη, όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.3.4, χρησιμοποιήθηκε μαζί με συμπυκνωμένο τυρόγαλα ως υπόστρωμα για την πραγματοποίηση μιας σειράς υγρών ζυμώσεων του ελαιογόνου μύκητα *Mortierella ramannianna*. Σκοπός ήταν να κατευθυνθεί η ζύμωση προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

2.4.1 Βιολογικό υλικό και παρασκευή υγρού εμβολίου

Ο Ζυγομύκητας που επιλέχθηκε για τις υγρές ζυμώσεις ήταν ο *Mortierella ramanniiana* MUCL 9235. Η καθαρή καλλιέργεια αυτού του στελέχους διατηρείται σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA) στους 4 °C. Πριν από κάθε εμβολιασμό γινόταν ανανέωση του στελέχους ως εξής: στους κεκλιμένους σωλήνες προστέθηκαν 5mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου γινόταν απελευθέρωση των σπορίων. Έπειτα, το εναιώρημα σπορίων χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό τρυβλίων 90 mm ακολουθώντας επώαση στους 28 ± 1 °C. Μετά από ικανοποιητική σποριογονία του μύκητα (μετά από 4 ημέρες επώαση) τα σπόρια ξεπλύθηκαν με την προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού στο τρυβλίο της καλλιέργειας. Η μέτρηση της περιεκτικότητας του εναιωρήματος σε σπόρια έγινε με αιματοκυττόμετρο τύπου Thoma (Fein-Optic, Bad Blankenburg, Germany). Το εναιώρημα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εμβολιαστικό υλικό για τις υγρές ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες, ενώ στην περίπτωση εμβολιασμού του βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια (10 g/L λακτόζη, 10 g/L πεπτόνη και 10 g/L εκχύλισμα ζύμης), η οποία εμβολιάστηκε με το προαναφερθέν εναιώρημα.

2.4.2 Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας

Το υδρόλυμα της οινολάσπης, που παρασκευάστηκε από το πείραμα του κεφ. 2.3.4, μαζί με τυρόγαλα χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή αζώτου και άνθρακα αντίστοιχα, για την υγρή ζύμωση του *Mortierella ramanniiana*. Το τυρόγαλα παραλήφθηκε από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α., φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 9000rpm,

στους 4°C και κατόπιν συμπυκνώθηκε με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αναμίξεις των δύο υποστρωμάτων ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση λακτόζης 80 g/L και συγκέντρωση FAN 160 και 200 mg/L. Τέλος το μίγμα υποστρωμάτων υπόκειντο σε διήθηση υπό κενό προκειμένου να αφαιρεθούν τυχόν στερεά σωματίδια.

2.4.3 Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε κωνικές φιάλες

Η υγρή ζύμωση του μύκητα *Mortierella ramanniana* στο μίγμα υδρολύματος-τυρογάλακτος πραγματοποιήθηκε αρχικά σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με 50 mL θρεπτικού μέσου. Οι φιάλες αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 20 min και κατόπιν εμβολιάστηκαν με εναιώρημα σπορίων σε συγκέντρωση 10^8 σπόρια/mL υποστρώματος, ακολουθώντας επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Zhicheng ZHWY-211C) σε θερμοκρασία 28 ± 1 °C, υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm. Το pH της καλλιέργειας ρυθμιζόταν καθ' όλη τη διάρκεια στη τιμή $6 \pm 0,2$ με την προσθήκη διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1 M. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

2.4.4 Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε βιοαντιδραστήρα

Η περαιτέρω μελέτη του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας ενεργού όγκου 1 L, με δυνατότητα on-line καταγραφής των φυσικο-χημικών παραμέτρων και πλήρους ελέγχου των συνθηκών αύξησης. Η αποστείρωση του δοχείου καλλιέργειας με το υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 120 min. Στη συνέχεια ο βιοαντιδραστήρας παρέμεινε, πριν τον εμβολιασμό, στους 28 °C για τουλάχιστον 24 h προκειμένου να επιβεβαιωθεί η απουσία επιμολύνσεων και να πολωθεί το ηλεκτρόδιο του οξυγόνου. Ακολούθησε εμβολιασμός του υποστρώματος με 10% v/v προκαλλιέργεια ηλικίας 72 h. Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν $28 \pm 0,1$ °C, σε 250 rpm και αερισμό (0,5-1,0 vvm) προκειμένου να εξασφαλιστούν αερόβιες συνθήκες, ενώ το pH ρυθμιζόταν αυτόματα στην τιμή $6 \pm 0,1$ με την προσθήκη διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 1 M.

2.4.5 Χημικές αναλύσεις

Η δυνατότητα αξιοποίησης του υποστρώματος από τον μύκητα *Mortierella ramanniana* κατά την υγρή καλλιέργειά του τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και στον βιοαντιδραστήρα αξιολογήθηκε προσδιορίζοντας τις εξής παραμέτρους: α) ξηρή βιομάζα, β) ανάγοντα σάκχαρα, γ) άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων, δ) ενδοκυτταρικό λίπος και ε) pH. Η μεθοδολογία μέτρησης των παραπάνω παραμέτρων, εκτός του ενδοκυτταρικού λίπους) έχει ήδη περιγραφεί στα προηγούμενα κεφάλαια. Όσον αφορά στη συλλογή της βιομάζας η μόνη διαφοροποίηση με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο κεφ. 2.1.3.1 είναι ότι ο διαχωρισμός των μυκηλιακών σφαιριδίων (pellets) με το υπόστρωμα γινόταν με εσχαρισμό αντί για διήθηση υπό κενό.

2.4.5.1 Εκχύλιση και προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Η συσσώρευση των λιπιδίων εντός των κυττάρων προσδιορίστηκε στην αποξηραμένη βιομάζα με την προσθήκη μίγματος διαλυτών χλωροφόρμιου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al. 1957). Έπειτα, το δείγμα της ξηρής βιομάζας με τον διαλύτη παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος, προς αποφυγή οξείδωσης των λιπαρών οξέων του λίπους, για τουλάχιστον 3 ημέρες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα προς απομάκρυνση των στερεών και το διήθημα παραλήφθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη εξάτμισης. Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (Buchi Waterbath B-480, Buchi Rotavapor R-114) και το λίπος που απέμεινε στη φιάλης ζυγίζόταν σε ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Το λίπος εκφράστηκε σε g/L θρεπτικού υποστρώματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καλλιέργεια στερεής, ημι-στερεής και υγρής κατάστασης των μυκήτων *Pleurotus* σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας

Η δυνατότητα αξιοποίησης των στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας από δύο είδη *Pleurotus* (*P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177), μελετήθηκε μέσω της στερεής (SSF), της ημιστερεής (Semi-SF) και της υγρής (SmF) καλλιέργειάς τους σε κωνικές φιάλες, στους 26 °C. Η συγκριτική αξιολόγηση τόσο μεταξύ των μυκήτων όσο και των τριών καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού της παραγόμενης βιομάζας, της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος και των ενζυμικών προσδιορισμών της λακκάσης και της ενδογλυκανάσης.

3.1.1 Έμμεσος προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας

Τα αποτελέσματα της παραγωγής της βιομάζας (g/g ξηρού υποστρώματος) των *P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177, όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης, παρουσιάζονται παρακάτω.

Από τον Πίνακα 3.1-1, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας παρήχθη στο τέλος της ζύμωσης, κατά την υγρή καλλιέργεια και των δύο ειδών μυκήτων, καθώς η παραγωγή βιομάζας του *P. pulmonarius* ήταν 0,54 g/g ξηρού υποστρώματος και του *P. ostreatus* ήταν λίγο χαμηλότερη, στα 0,50 g/g. Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας στη στερεή και στην ημι-στερεή καλλιέργεια διαπιστώνεται ότι οι τιμές που καταγράφηκαν δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο μυκήτων (0,42 g/g για τον *P. ostreatus* και 0,40 g/g για τον *P. pulmonarius* στη στερεή και

Πίνακας 3.1-1: Μέσες τιμές της παραγόμενης βιομάζας (g/g ξ. υποστρώματος) των μυκήτων *P. ostreatus* AMRL 135 και *P. pulmonarius* AMRL 177, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.

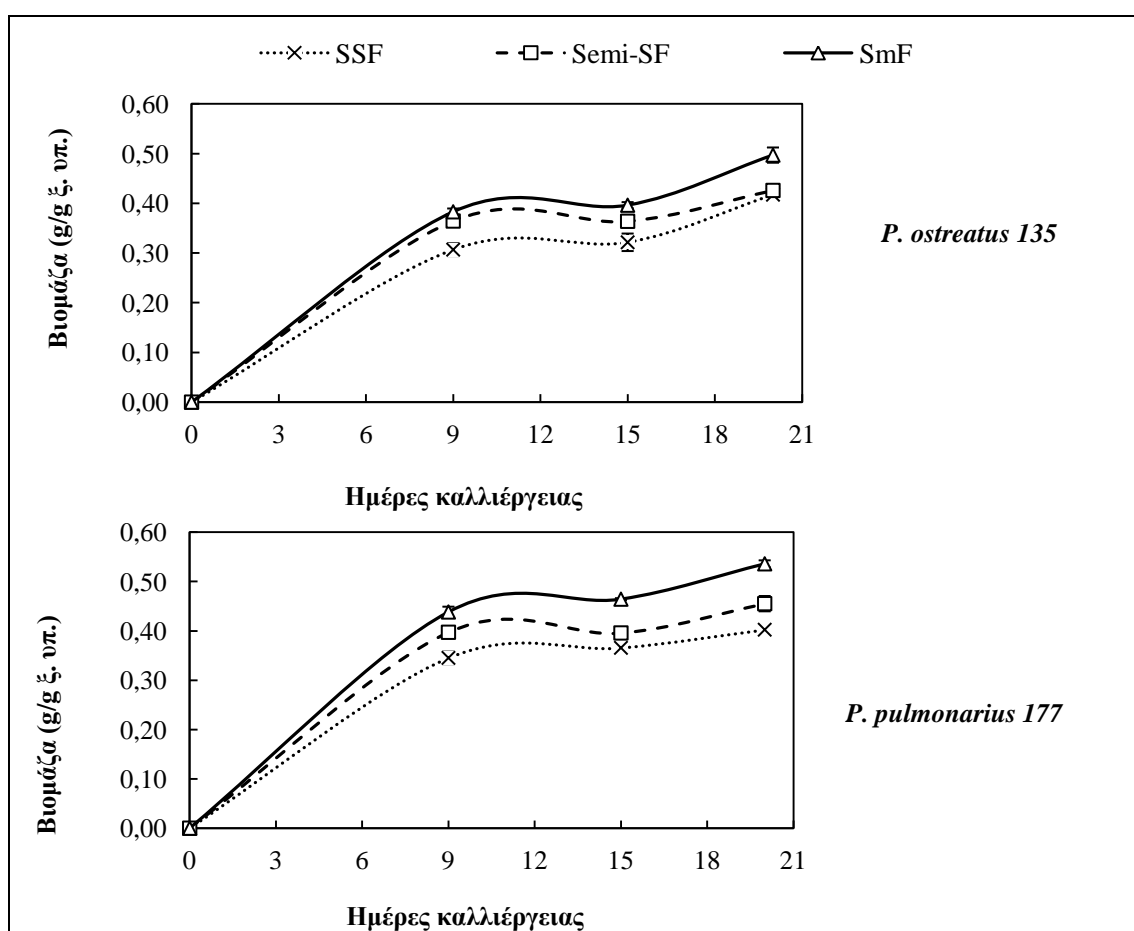
Ημέρα	<i>P. ostreatus</i> 135			<i>P. pulmonarius</i> 177		
	SSF	Semi-SF	SmF	SSF	Semi-SF	SmF
9 ^η	0,31 ± 0,01*	0,36 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,44 ± 0,01
15 ^η	0,32 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,46 ± 0,00
20 ^η	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,54 ± 0,01

*Τυπική απόκλιση

0,43 g/g για τον *P. ostreatus* και 0,45 g/g για τον *P. pulmonarius* στην ημι-στερεή καλλιέργεια).

Τέλος, η συγκριτική αξιολόγηση των διαφορετικών ειδών καλλιέργειας (Διάγραμμα 3.1-2) έδειξε ότι τα δύο είδη *Pleurotus* εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά αύξησης (σιγμοειδής καμπύλη). Αναλυτικότερα, η αύξηση της βιομάζας έδειξε να σταθεροποιείται μεταξύ 9^{ης} και 15^{ης} ημέρας, ενώ στο τέλος της καλλιέργειας παρήγαγαν τη μέγιστη τιμή βιομάζας.

Συνοψίζοντας τα ως άνω, συμπεραίνουμε ότι *P. pulmonarius* αξιοποιεί καλύτερα το υπόστρωμα στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποίησης σε σχέση με τον *P. ostreatus*. Ακόμη, η υγρή καλλιέργεια ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των δύο μυκήτων, ενώ ακολουθούν με φθίνουσα σειρά παραγόμενης βιομάζας η ημι-στερεή και η στερεή καλλιέργεια.



Διάγραμμα 3.1-2: Συγκριτική αξιολόγηση της πορείας παραγωγής βιομάζας (g/g ξ. υποστρώματος) των μυκήτων *P. ostreatus* AMRL 135 και *P. pulmonarius* AMRL 177, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <5%).

3.1.2 Κατανάλωση φαινολικών συστατικών

Τα συνολικά εκχυλίσματα φαινολικά συστατικά του υποστρώματος μετρήθηκαν κατά την διάρκεια της στερεής (SSF), της ημι-στερεής (Semi-SF) και της υγρής (SmF) καλλιέργειας των μυκήτων *Pleurotus* και τα αποτελέσματα αυτών δίνονται στους Πίνακες 3.1-1 και 3.1-2 και στο Διάγραμμα 3.1-3.

Πίνακας 3.1-1: Εναπομείναντα φαινολικά συστατικά (% w/w) και κατανάλωση των φαινολικών (%) του υποστρώματος από υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης κατά την στερεή (SSF), ημι-στερεή (Semi-SF) και υγρή (SmF) καλλιέργεια του μύκητα *P. ostreatus* 135.

Είδος καλλιέργειας	Ημέρα	Φαινολικά συστατικά	Κατανάλωση φαινολικών συστατικών
		(% w/w)	(%)
SSF	0	0,47 ± 0,04*	0
	9 ^η	0,35 ± 0,02	25,5
	15 ^η	0,19 ± 0,01	59,6
	20 ^η	0,13 ± 0,01	72,4
Semi-SF	0	0,47 ± 0,04	0
	9 ^η	0,28 ± 0,01	40,4
	15 ^η	0,22 ± 0,03	53,2
	20 ^η	0,14 ± 0,03	70,2
SmF	0	0,47 ± 0,04	0
	9 ^η	0,29 ± 0,01	38,3
	15 ^η	0,26 ± 0,02	44,7
	20 ^η	0,15 ± 0,01	68,1

*Τυπική απόκλιση

Πίνακας 3.1-2: Εναπομείναντα φαινολικά συστατικά (% w/w) και κατανάλωση των φαινολικών (%) του υποστρώματος από υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης, κατά την στερεή (SSF), ημι-στερεή (Semi-SF) και υγρή (SmF) καλλιέργεια του μύκητα *P. pulmonarius* 177.

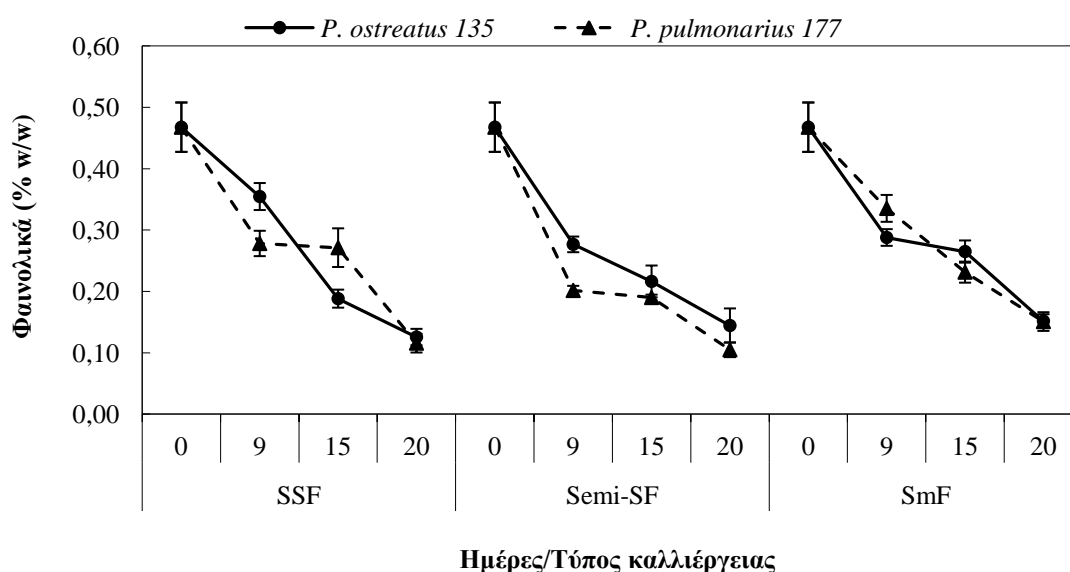
Καλλιέργεια	Ημέρα	Φαινολικά συστατικά	Κατανάλωση φαινολικών συστατικών
		(% w/w)	(%)
SSF	0	0,47 ± 0,04*	0
	9 ^η	0,28 ± 0,02	40,4
	15 ^η	0,27 ± 0,03	42,5
	20 ^η	0,12 ± 0,02	74,5
Semi-SF	0	0,47 ± 0,04	0
	9 ^η	0,20 ± 0,01	57,4
	15 ^η	0,19 ± 0,00	59,6
	20 ^η	0,10 ± 0,01	78,7
SmF	0	0,47 ± 0,04	0
	9 ^η	0,34 ± 0,02	27,6
	15 ^η	0,23 ± 0,02	51,1
	20 ^η	0,15 ± 0,02	68,1

*Τυπική απόκλιση

Από τους πίνακες διακρίνεται ότι η αρχική συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος ήταν περίπου 5 mg/g ξηρού υποστρώματος. Στη συνέχεια, παρατηρείται ότι μέχρι το τέλος της καλλιέργειας καταναλώθηκε μεγάλο ποσοστό των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος (~70-80%) τόσο από τον *P. ostreatus* όσο και από τον *P. pulmonarius*. Επίσης, διαπιστώνεται ότι οι συνθήκες της στερεής και της ημι-στερεής καλλιέργειας ευνόησαν περισσότερο την κατανάλωση των φαινολικών σε σύγκριση με την υγρή καλλιέργεια.

Από το Διάγραμμα 3.1-3 διαπιστώνεται ότι και οι δύο μύκητες επέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά κατά την κατανάλωση των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος (%w/w) χωρίς ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των τριών ειδών καλλιέργειας. Η παρόμοια αυτή τάση στην αποδόμηση των φαινολικών διερευνήθηκε περισσότερο και διαπιστώθηκε ότι ο συντελεστής συσχέτισής τους ήταν αρκετά υψηλός. Έτσι, το R^2 υπολογίστηκε 0,97 και 0,94 στην ημι-στερεή και στην υγρή καλλιέργειά τους αντίστοιχα.

Παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση των φαινολικών στο υπόστρωμα στο τέλος της καλλιέργειας ήταν σχεδόν ίδια (0,10-0,15% w/w), σε όλα τα είδη καλλιέργειας, ο ρυθμός αποδόμησης των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος έδειξε ότι επηρεάστηκε από το είδος του μύκητα *Pleurotus* και τις συνθήκες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 3.1-3: Πορεία κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών (% w/w) από τους μύκητες *P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <5%).

3.1.3 Προσδιορισμός ενεργότητας των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση

Στο πείραμα αυτό προδιορίσθηκε η ενεργότητα των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση που παρήχθησαν από τα είδη *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*, κατά την στερεή (SSF), την ημι-στερεή (Semi-SF) και την υγρή (SmF) καλλιέργεια σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.

Στον Πίνακα 3.1-3 παρουσιάζονται οι ενζυμικές ενεργότητες της λακκάσης για τα δύο είδη *Pleurotus* στα τρία διαφορετικά είδη καλλιέργειας, εκφρασμένες σε U/g ξηρού υποστρώματος. Αρχικά, παρατηρείται ότι η στερεή καλλιέργεια και των δύο μυκήτων ευνόησε σημαντικά την παραγωγή λακκάσης σε σχέση με τις άλλες δύο καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, κατά την στερεή καλλιέργεια ο *P. ostreatus* σημείωσε μέγιστη ενεργότητα 26.247 U/g (15^η ημέρα), ενώ για τον *P. pulmonarius* η μέγιστη παραγωγή λακκάσης έφθασε τα 15.273 U/g (20^η ημέρα).

Σημαντικά μικρότερες ενζυμικές ενεργότητες λακκάσης σημειώθηκαν στην ημι-στερεή καλλιέργεια σε σχέση με την στερεή. Ειδικότερα, οι μέγιστες τιμές που καταγράφηκαν ήταν 2.978 U/g και 7.945 U/g στην 9^η ημέρα καλλιέργειας του *P. ostreatus* και του *P. pulmonarius* αντίστοιχα.

Αναφορικά με την υγρή καλλιέργεια παρατηρείται ότι η μέγιστες τιμές και για τα δύο είδη καταγράφηκαν την 9^η ημέρα καλλιέργειας, όπως και στην ημι-στερεή καλλιέργεια. Ωστόσο, οι μέγιστες τιμές παραγωγής λακκάσης ήταν σαφώς υψηλότερες από τις αντίστοιχες της ημι-στερεής και κυμάνθηκαν στα 4.129 U/g για τον *P. ostreatus* και στα 12.174 U/g για τον *P. pulmonarius*.

Πίνακας 3.1-3: Μέσες τιμές της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση (U/g ξ. υποστρώματος) των μυκήτων *P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.

Καλλιέργεια	Ημέρα	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177
		U/g ξ. υποστρώματος	
SSF	9 ^η	4.622 ± 706*	10.892 ± 1.090
	15 ^η	26.247 ± 1.619	13.281 ± 1.311
	20 ^η	17.179 ± 188	15.273 ± 1518
Semi-SF	9 ^η	2.978 ± 84	7.945 ± 327
	15 ^η	1.238 ± 122	2.716 ± 236
	20 ^η	178 ± 24	352 ± 19
SmF	9 ^η	4.129 ± 156	12.174 ± 298
	15 ^η	4.447 ± 376	4.112 ± 109
	20 ^η	323 ± 74	7.663 ± 39

*Τυπική απόκλιση

Στον Πίνακα 3.1-4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην παραγωγή του ενζύμου ενδογλυκανάση. Παρατηρείται, λοιπόν, ότι η παραγωγή της ενδογλυκανάσης ευνοήθηκε περισσότερο από τις συνθήκες της υγρής καλλιέργειας, καθώς έλαβε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα άλλα είδη καλλιέργειας, ήτοι 0,96 και 0,53 U/g για τον *P. ostreatus* και τον *P. pulmonarius* αντίστοιχα.

Αρκετά χαμηλότερη παραγωγή ενδογλυκανάσης καταγράφηκε κατά την ημι-στερεή καλλιέργεια (μέγιστες τιμές: 0,19-0,20 U/g), ενώ πολύ μικρή ήταν η αντίστοιχη παραγωγή κατά τη στερεή καλλιέργεια, καθώς οι μέγιστες τιμές κυμάνθηκαν από 0,05 έως 0,07 U/g. Ακόμη, παρατηρείται ότι η μέγιστη ενεργότητα ενδογλυκανάσης σημειώνεται για τη δε υγρή καλλιέργεια την 20^η ημέρα, ενώ για την ημι-στερεή καλλιέργεια την 15^η ημέρα.

Συνοψίζοντας την επίδραση των δύο ενζύμων στην παραγωγή βιομάζας είναι φανερό ότι στην στερεή καλλιέργεια η λακκάση έχει βαρύνοντα ρόλο στην τροφοδοσία των μυκήτων *Pleurotus* με την απαραίτητη πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή τους, ενώ σε υγρό περιβάλλον ανάπτυξης (ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια) σημαντικότερο ρόλο διαδραματίζει η ενδογλυκανάση.

Πίνακας 3.1-4: Μέσες τιμές της ενεργότητας του ενζύμου ενδογλυκανάση (U/g ξ. υπ.) των μυκήτων *P. ostreatus* AMRL 135 και *P. pulmonarius* AMRL 177, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειά τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.

Καλλιέργεια	Ημέρα	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177
		U/g ξ. υποστρώματος	
SSF	9 ^η	0,07 ± 0,00*	0,04 ± 0,00
	15 ^η	0,07 ± 0,00	0,03 ± 0,00
	20 ^η	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Semi-SF	9 ^η	0,13 ± 0,11	0,03 ± 0,01
	15 ^η	0,18 ± 0,05	0,19 ± 0,03
	20 ^η	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,02
SmF	9 ^η	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,02
	15 ^η	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,06
	20 ^η	0,96 ± 0,07	0,53 ± 0,11

*Τυπική απόκλιση

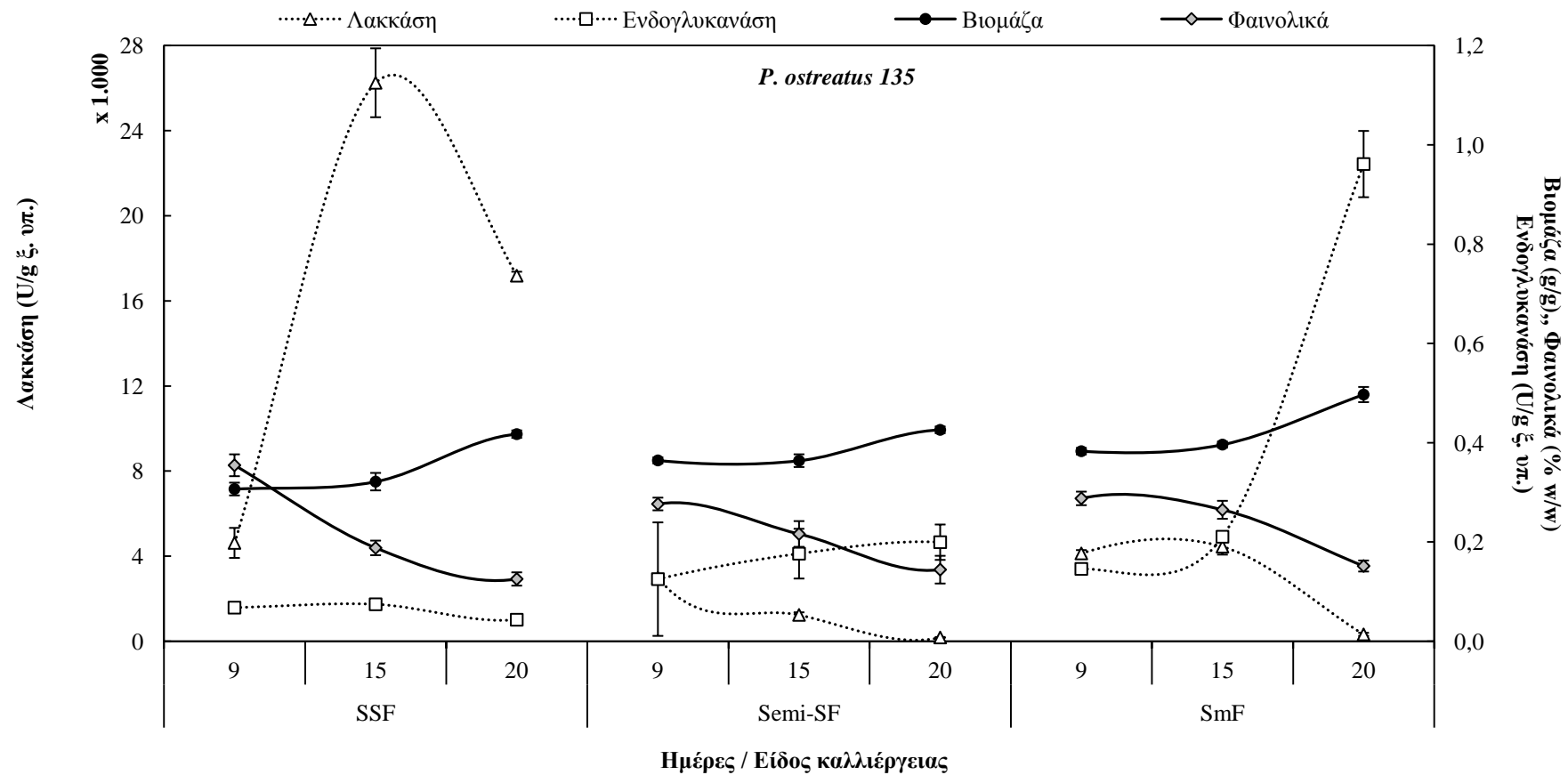
3.1.4 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής της βιομάζας, των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι πιθανές σχέσεις μεταξύ της παραγόμενης ποσότητας βιομάζας και ενζύμων καθώς και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.1-5 και 3.1-6, δείχνουν διαφορετική πορεία των τιμών αυτών των παραμέτρων στη στερεή καλλιέργεια σε σχέση με αυτών στην ημι-στερεή και υγρή.

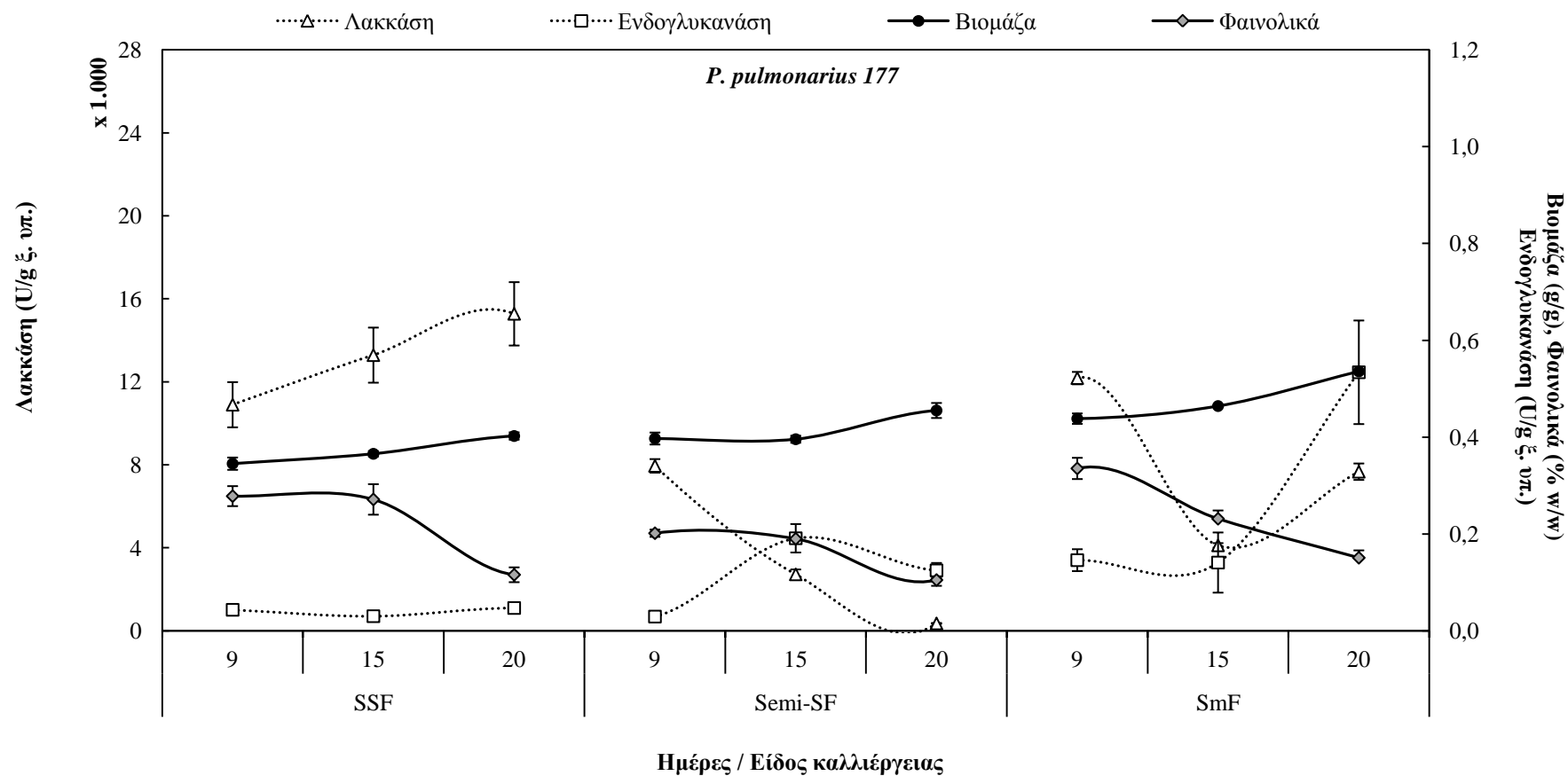
Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής βιομάζας και λακκάσης παρατηρείται ότι στην ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια η σταθερή αύξηση της τιμής της βιομάζας, συνοδεύεται από μείωση της τιμής της λακκάσης. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η συμπεριφορά του *P. pulmonarius* στην υγρή καλλιέργεια, κατά την οποία μέχρι την 15^η ημέρα μειώνεται η παραγωγή λακκάσης και στη συνέχεια αυξάνεται. Η πιο ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παραγόμενης βιομάζας και λακκάσης βρέθηκε για τον *P. ostreatus* κατά την υγρή καλλιέργεια με $R^2: 0,97$.

Διαφορετική τάση φαίνεται ότι ακολουθούν οι μύκητες κατά την αύξησή τους στην στερεή καλλιέργεια. Πιο αναλυτικά, ο *P. ostreatus* ενώ εμφανίζει μία υστέρηση στην παραγωγή βιομάζας μέχρι την 15^η ημέρα καλλιέργειας, η ενεργότητα της λακκάσης έχει φθάσει στη μέγιστη τιμή της (~26.000 U/g). Στη συνέχεια παρατηρείται ότι μειώνεται η ενεργότητα της λακκάσης με ταυτόχρονη αύξηση της τιμής της βιομάζας. Αντιθέτως, στη στερεή καλλιέργεια του *P. pulmonarius* διαπιστώνεται ταυτόχρονη αύξηση στην παραγωγή βιομάζας και λακκάσης, εμφανίζοντας ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ τους ($R^2: 0,95$).

Η παραγωγή βιομάζας και η ενεργότητα της ενδογλυκανάσης παρουσιάζουν σχεδόν σε όλες τις καλλιέργειες θετική συσχέτιση μεταξύ τους (με εξαίρεση την στερεή καλλιέργεια του *P. ostreatus*), εντούτοις οι πιο σημαντικές συσχετίσεις σημειώνονται στην υγρή καλλιέργεια τόσο του *P. ostreatus* ($R^2: 1$) όσο και του *P. pulmonarius* ($R^2: 0,93$).



Διάγραμμα 3.1-5: Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής λακκάσης και ενδογλυκανάσης (U/g ξ. υπ.), της παραγωγής βιομάζας (g/g ξ. υπ.) και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών (% w/w) του υποστρώματος από τον *P. ostreatus 135*, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς του σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <5%).



Διάγραμμα 3.1-6: Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής λακκάσης και ενδογλυκανάσης (U/g ξ. υπ.), της παραγωγής βιομάζας (g/g ξ. υπ.) και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών (% w/w) του υποστρώματος από τον *P. pulmonarius 177*, κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα της στερεής (SSF), ημι-στερεής (Semi-SF) και υγρής (SmF) καλλιέργειάς του σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι τριών επαναλήψεων (τυπική απόκλιση <5%).

Επίσης, παρατηρείται ότι όταν αυξάνει η παραγωγή της λακκάσης μειώνεται η παραγωγή της ενδογλυκανάσης στις συνθήκες της υγρής και της ημι-στερεής καλλιέργειας και οι πιο σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις αφορούν στον *P. ostreatus* (R^2 : 0,98-0,99). Αντίθετα, στη στερεή καλλιέργεια η συσχέτιση των δύο ενζύμων είναι θετική, αλλά όχι σημαντική.

Η διερεύνηση της σχέσης της βιομάζας με τα φαινολικά συστατικά δείχνει ότι όσο αποδομούνται τα φαινολικά τόσο αυξάνει η ποσότητα της βιομάζας. Η μεταξύ τους αρνητική συσχέτιση είναι εμφανής σε όλες τις καλλιέργειες των δύο ειδών *Pleurotus* και είναι σημαντική ως επί το πλείστον (Πίνακας 3.1-5).

Τέλος, από την αξιολόγηση της συσχέτισης των φαινολικών ουσιών με την παραγωγή της λακκάσης διαπιστώνεται ότι έχουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους μόνο στην στερεή καλλιέργεια των μυκήτων, ήτοι ο αυξημένος ρυθμός παραγωγής λακκάσης συνοδεύεται από τον αυξημένο ρυθμό αποδόμησης των φαινολικών. Αυτή η συσχέτιση είναι σημαντική μόνο για τον *P. pulmonarius* με R^2 : 0,82. Αντιθέτως, στην ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια παρουσιάζεται θετική σχέση μεταξύ των δύο παραμέτρων, δηλαδή παρατηρείται μείωση της τιμής της λακκάσης όσο καταναλώνονται τα φαινολικά. Ωστόσο παρατηρείται ότι ήταν σημαντική μόνο στις συνθήκες της ημι-στερεής (*P. ostreatus*- R^2 : 0,98 και *P. pulmonarius*- R^2 : 0,93).

Πίνακας 3.1-5: Βαθμός γραμμικής συσχέτισης (R^2) της παραγόμενης βιομάζας και της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών για τα είδη *P. ostreatus* 135 και *P. pulmonarius* 177, κατά τη στερεή (SSF), ημι-στερεή (Semi-SF) και υγρή (SmF) καλλιέργειά τους σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας.

Είδος καλλιέργειας	<i>P. ostreatus</i> 135	<i>P. pulmonarius</i> 177
	R^2	
SSF	0,63	0,90
Semi-SF	0,79	0,98
SmF	1	0,89

3.2 Αξιολόγηση παραγωγής μανιταριών *Pleurotus* σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας

Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης καρποφοριών των δύο ειδών *Pleurotus* σε στερεό υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οиноποιίας.

Από τον Πίνακα 3.2-1 φαίνεται ότι ο μύκητας *P. ostreatus* έδωσε μόνο ένα κύμα καρποφορίας, ενώ ο *P. pulmonarius* παρήγαγε μανιτάρια για 2-3 συνεχόμενα κύματα. Επίσης, η μεγαλύτερη ποσότητα μανιταριών καταγράφηκε για τον *P. pulmonarius* και ήταν συνολικά 402,4 g (μέσο όρο 50g/επανάληψη), ενώ ο *P. ostreatus* παρήγαγε μόλις 207,1 g (μέσο όρο 26g/επανάληψη). Η διαφορετική αξιοποίηση του υποστρώματος μεταξύ των δύο μυκήτων φαίνεται και από τις μέγιστες τιμές της απόδοσης (ΑΠ) και της βιολογικής αποδοτικότητας (ΒΑ), καθώς για τον *P. ostreatus* καταγράφηκε συνολική ΑΠ=7,4% και ΒΑ=16,2%, ενώ για τον *P. pulmonarius* οι αντίστοιχες τιμές ήταν διπλάσιες, ήτοι 14,4% και 31,4%.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι το χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων έως και το 1^ο κύμα καρποφορίας (πρωιμότητα) παρουσίασε σημαντικές διαφορές, καθώς ο *P. pulmonarius* εμφάνισε τις πρώτες καρποφορίες του 7 ημέρες νωρίτερα από τον *P. ostreatus*, με το 1^ο κύμα του *P. ostreatus* να ξεκινά μόλις τρεις ημέρες νωρίτερα από το 2^ο κύμα του *P. pulmonarius*.

Πίνακας 3.2-1: Παραγωγήμανιταριών *Pleurotus* σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποίησης.

Είδος	Κύματα	Αριθμός καρποφοριών ^α	Ημέρες έως καρποφόρηση ^γ	Νωπό βάρος (g)/ Επανάληψη								Μέσος όρος Νωπού βάρους (g)	ΑΠ ^δ %	ΒΑ ^ε %
				1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η			
<i>P. ostreatus</i> 135	1 ^ο	162 ± 3,7 ^β	42	24,5	24,8	25,0	26,7	26,4	25,6	30,9	23,2	25,9 ± 2,3	7,4	16,2
	2 ^ο	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	3 ^ο	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Σύνολο:				207,2								25,9	7,4
<i>P. pulmonarius</i> 177	1 ^ο	176 ± 9,5	35	23,0	23,7	25,8	26,5	22,4	25,0	24,1	21,2	24,0 ± 1,8	6,9	15,0
	2 ^ο	43 ± 3,1	45	12,5	13,0	14,6	15,9	12,8	15,5	15,9	15,3	14,4 ± 1,4	4,1	9,0
	3 ^ο	12 ± 2,6	55	-	-	13,6	-	11,5	-	10,7	-	11,9 ± 1,5	3,4	7,4
	Σύνολο:				402,4								50,3	14,4

^α Μέση τιμή από 8 επαναλήψεις.

^β Τυπική απόκλιση.

^γ Χρονικό διάστημα σε ημέρες από τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων έως το αντίστοιχο κύμα καρποφορίας.

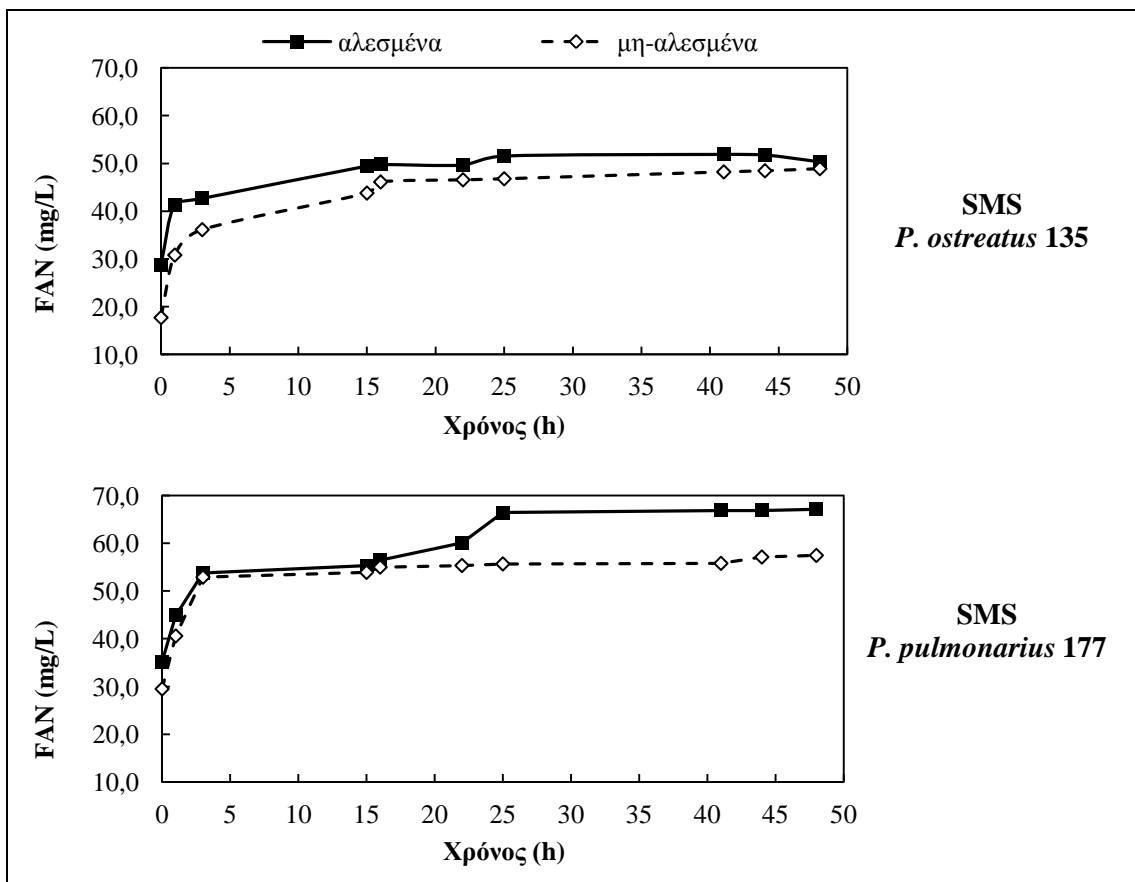
^δ ΑΠ (Απόδοση) % = (g νωπού β./ g νωπού β. υποστρώματος)*100.

^ε ΒΑ (Βιολογική Αποδοτικότητα) % = (g νωπού β./ g ξηρού β. υποστρώματος)*100 (βλ. κεφ. 2.1.5.2.).

3.3 Αυτόλυση του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών

Στη συνέχεια των πειραμάτων, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών (SMS) μέσω της μυκητικής αυτόλυσης. Χρησιμοποιήθηκε ξηρό αλεσμένο και μη αλεσμένο SMS (50 g/L) και η αυτόλυση έλαβε μέρος σε φιάλη Duran στους 55 ± 1 °C, υπό ανάδευση. Τα αποτελέσματα της αυτόλυσης εκφράζονται μέσω της μέτρησης του FAN (Διάγραμμα 3.3-1).

Διαπιστώνεται ότι όταν αλέσθηκε το SMS έδωσε λίγο μεγαλύτερες τιμές FAN συγκριτικά με τη μη αλεσμένη μορφή. Το γεγονός, αυτό παρατηρείται περισσότερο στο SMS του *P. pulmonarius*, αφού η αλεσμένη μορφή υποστρώματος έδωσε 67,09 mg/L FAN, ενώ η μη αλεσμένη 57,43 mg/L FAN. Κατά την αυτόλυση του SMS του *P. ostreatus*, οι μέγιστες συγκεντρώσεις FAN που επιτεύχθηκαν ήταν 48,89 mg/L (μη αλεσμένο) και 50,33 mg/L (αλεσμένο). Αναφορικά με το χρόνο ζύμωσης, διαπιστώνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις η παραγωγή FAN αυξάνεται μέχρι και τις 25 ώρες περίπου, ενώ μετέπειτα παραμένει σχεδόν σταθερή.



Διάγραμμα 3.3-1: Συγκριτική αξιολόγηση της πορείας παραγωγής αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L), μέσω της αυτόλυσης του εξαντλημένου υποστρώματος (SMS) των μυκήτων *P. ostreatus* AMRL 135 και *P. pulmonarius* AMRL 177.

3.4 Καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών σε συνδυασμό με οινολάσπη προς παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος και δεδομένου ότι με την αυτόλυση δεν δημιουργήθηκε ένα πλούσιο υγρό θρεπτικό μέσο, επιλέχθηκε να διερευνηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών (SMS) σε συνδυασμό με ένα άλλο στερεό υπόλειμμα της οينوποίησης, την οινολάσπη. Το υπόλειμμα αυτό είναι πλούσια πηγή αζώτου λόγω των κυττάρων των ζυμομυκήτων που απέμειναν από την διαδικασία παραγωγής οίνου.

Για την επίτευξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε αρχικά καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε εξαντλημένο υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών (spent mushroom substrate, SMS) και οινολάσπης (wine lees, WL). Συνολικά 5 g επί ξηρού στερεά υπολείμματα τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 cc και επώαστηκαν στους 30 ± 1 °C. Στόχος ήταν η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε επόμενα πειράματα. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διεργασία παραγωγής αυτών των ενζύμων, μελετήθηκε η επίδραση:

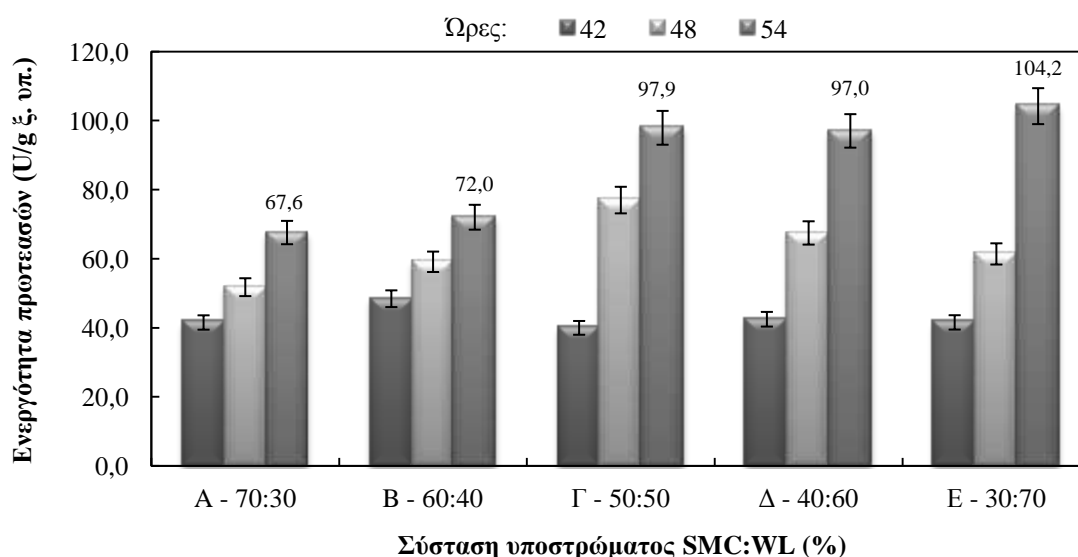
- α) της σύστασης του υποστρώματος όσον αφορά στην αναλογία SMS:WL,
- β) της υγρασίας του υποστρώματος και
- γ) του χρόνου καλλιέργειας

Σκοπός του πειράματος ήταν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής πρωτεολυτικών ενζύμων του εν λόγω μύκητα, έτσι ώστε να αξιοποιηθούν περαιτέρω για την υδρόλυση της οινολάσπης.

3.4.1 Επίδραση της σύστασης του υποστρώματος

Στο πρώτο πειραματικό στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του υποστρώματος όταν αυτό περιείχε διαφορετική σύσταση σε SMS και σε WL. Οι διαφορετικές αναλογίες SMS:WL που διερευνήθηκαν ήταν 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70. Ο χρόνος επώασης καθορίστηκε μεταξύ 42 και 54 h και η υγρασία 60%.

Στο Διάγραμμα 3.4.1 παρουσιάζεται η μεταβολή της ενεργότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων (εκφρασμένα σε U/g ξηρού υποστρώματος) κατά την διάρκεια της καλλιέργειας. Είναι εμφανές ότι η παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων ήταν χαμηλή στα υποστρώματα που είχαν 30-40% WL. Πιο αναλυτικά, η μέγιστη ενεργότητα πρωτεολυτικών ενζύμων που εμφάνισαν τα υποστρώματα με σύσταση SMS:WL 70:30 και 60:40 ήταν 67,6 U/g και 72 U/g αντίστοιχα. Υψηλότερη ενεργότητα καταγράφηκε στα υποστρώματα που είχαν 50-70% WL (SMS:WL 50:50, 40:60 και 30:70), με τις μέγιστες παραγόμενες ποσότητες πρωτεολυτικών ενζύμων να κυμαίνονται από 97 έως 104,2 U/g. Επίσης, διαπιστώνεται ότι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε WL άνω του 50% δεν επέφερε ανάλογη αύξηση της παραγωγής των πρωτεολυτικών ενζύμων.

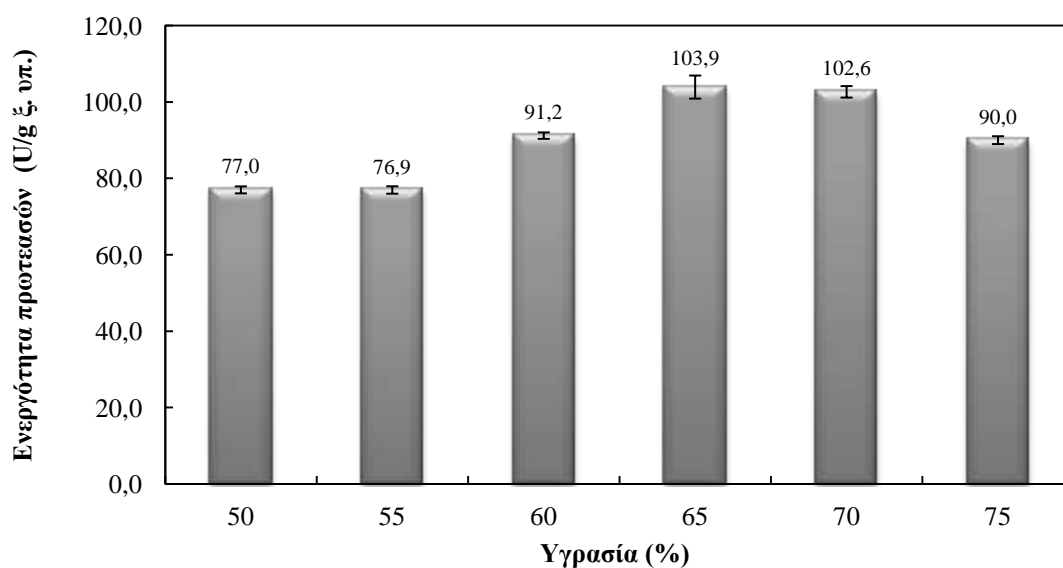


Διάγραμμα 3.4-1: Επίδραση της αναλογίας του εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών (SMS) και της οινολάσπης (WL) στην παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (U/g ξ. υπ.) του μύκητα *Aspergillus oryzae*, κατά την διάρκεια (42-54 h) της στερεής καλλιέργειας σε υγρασία 60%.

3.4.2 Επίδραση της υγρασίας

Λαμβάνοντας υπόψη το προηγούμενο πείραμα και του γεγονότος ότι τα υποστρώματα με ποσοστό σε WL άνω του 50% έδωσαν παρόμοια ενεργότητα πρωτεασών, επιλέχθηκε η αναλογία SMS:WL 50:50 έτσι ώστε να μελετηθεί η βέλτιστη ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων, που παράγονται κατά την διάρκεια της στερεής καλλιέργειας, όταν χρησιμοποιηθούν διαφορετικές αρχικές υγρασίες υποστρώματος (50%, 55%, 60%, 65%, 70% και 75%).

Οι ενεργότητες των πρωτεολυτικών ενζύμων που καταγράφηκαν στις 54 ώρες καλλιέργειας και στις διαφορετικές αρχικές υγρασίες υποστρώματος δίνονται στο Διάγραμμα 3.4-2. Είναι εμφανές ότι η μέγιστη ενεργότητα πρωτεολυτικών ενζύμων επιτεύχθηκε όταν η αρχική υγρασία του υποστρώματος κυμάνθηκε από 65 έως 70% και οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν 103,9 και 102,6 U/ g αντίστοιχα.

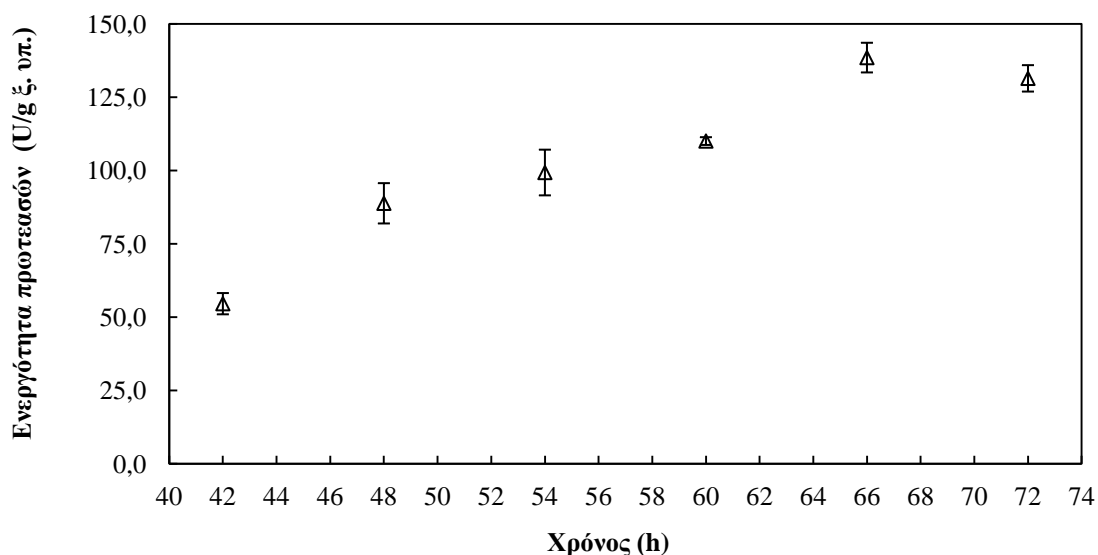


Διάγραμμα 3.4-2: Επίδραση της υγρασίας του υποστρώματος στην παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (U/g ξ. υπ.) του μύκητα *Aspergillus oryzae*, στις 54 h της στερεής καλλιέργειας και σε αναλογία 50:50 εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών:οινολάσπης (SMS:WL).

3.4.3 Επίδραση του χρόνου ζύμωσης

Στο τελευταίο πειραματικό στάδιο της βελτιστοποίησης της στερεής καλλιέργειας του *A. oryzae* σε SMS και WL, μελετήθηκε η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης (0-72 ώρες). Βάσει των αποτελεσμάτων των προηγούμενων πειραμάτων, η καλλιέργεια του μύκητα έλαβε χώρα σε υπόστρωμα με σύσταση SMS:WL 50:50 και σε υγρασία 65%.

Στο Διάγραμμα 3.4-3, που παρουσιάζεται παρακάτω, παρατηρείται ότι η ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων αυξάνει μέχρι και τις 66 ώρες στερεής καλλιέργειας, ενώ μετέπειτα ακολουθεί πτωτική τάση. Η μέγιστη παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων που επιτεύχθηκε ήταν 138,46 U/g.

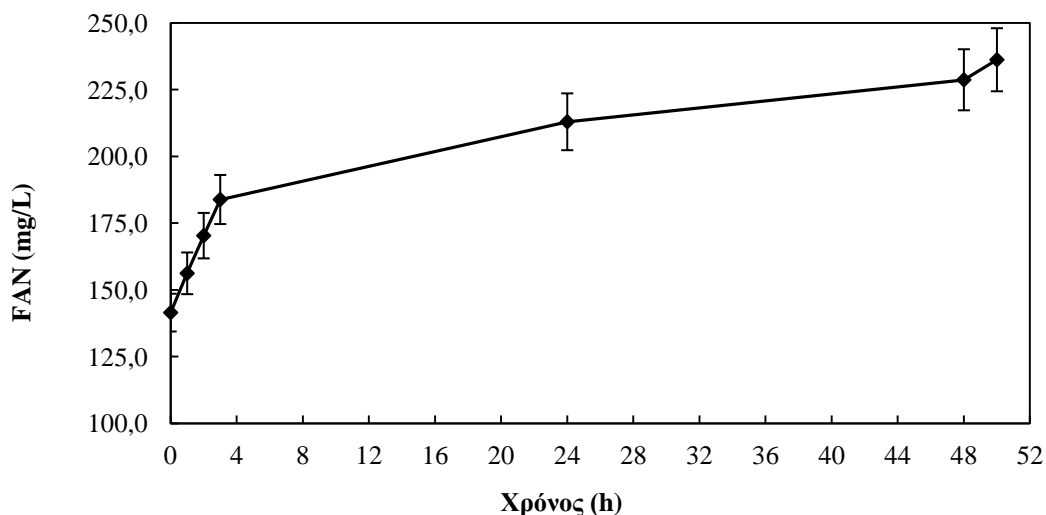


Διάγραμμα 3.4-3: Επίδραση του χρόνου καλλιέργειας στην παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (U/g ξ. υπ.) του μύκητα *Aspergillus oryzae*, κατά στερεή (SSF) καλλιέργειας σε μείγμα 50:50 εξαντλημένου υποστρώματος μανιταριών:οινολάσπης και σε υγρασία 65%.

3.5 Αξιοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων για την υδρόλυση οινολάσπης προς παραγωγή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε υδρόλυση της οινολάσπης με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων που παρήχθησαν στο προηγούμενο πείραμα. Το υδατικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της υδρόλυσης ήταν το υγρό που παραλήφθηκε μετά από τη φυγοκέντριση της οινολάσπης και κατόπιν απόσταξης (βλ. επεξεργασία οινολάσπης κεφ. 2.3.2). Σκοπός του παρόντος ήταν η παραλαβή υγρού μέσου πλούσιο σε άζωτο, ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί για μικροβιακές ζυμώσεις και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Τα αποτελέσματα του πειράματος (Διάγραμμα 3.5-1) αξιολογήθηκαν με βάση την παραγωγή του FAN των πρωτεολυτικών ενζυμών. Αρχικά, παρατηρείται ότι κατά την έναρξη της υδρόλυσης το FAN ήταν περίπου 145 mg/L. Με την πρόοδο της διεργασίας η παραγωγή αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό έως και τις 24 ώρες φθάνοντας τα 213 mg/L FAN. Η μέγιστη παραγωγή του FAN 236,2 mg/L, επιτεύχθηκε στο τέλος της υδρόλυσης, ήτοι στις 50 ώρες.

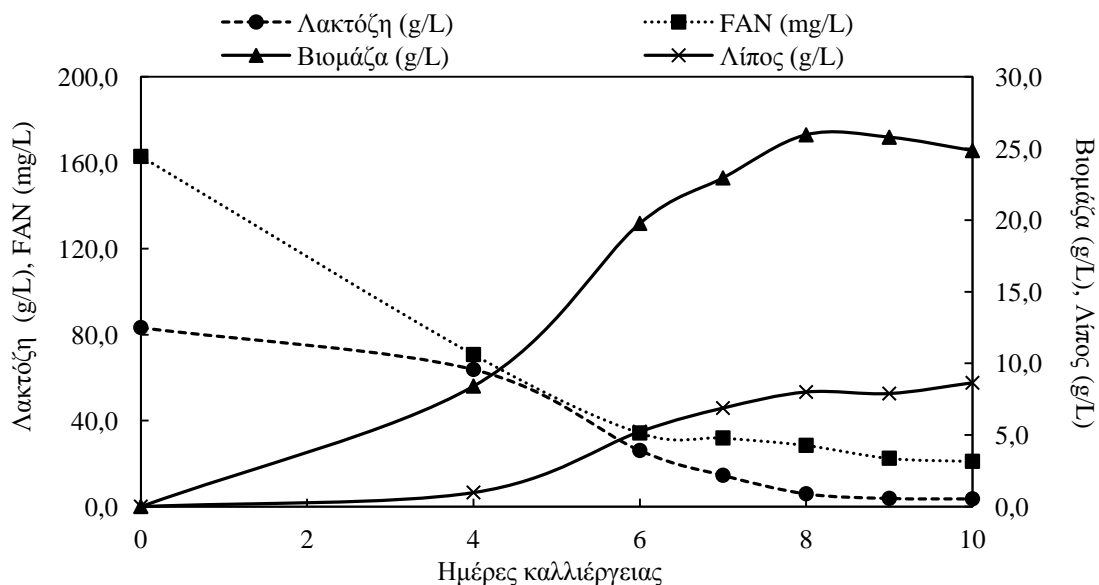


Διάγραμμα 3.5-1: Κινητική παραγωγής του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L) κατά την υδρόλυση της οινολάσπης από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*.

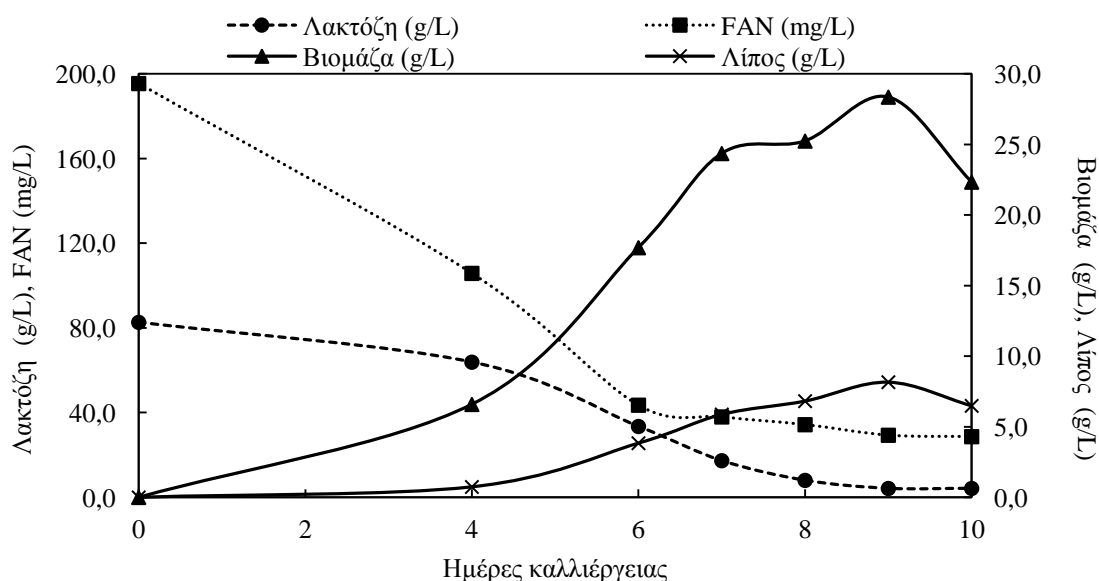
3.6 Καλλιέργεια υγρής κατάστασης του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα μίγματος υδρολύματος-τυρογάλακτος

Στο τελευταίο πείραμα της παρούσας μελέτης αξιοποιήθηκε το υδρόλυμα που παρήχθη από οινολάσπη, ως πηγή αζώτου, και αναμίχθηκε με τυρόγαλα το οποίο αποτέλεσε ταυτόχρονα πηγή άνθρακα και αζώτου, προς παραγωγή μικροβιακού λίπους μέσω υγρής ζύμωσης του *Mortierella ramanniana*.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι κινητικές αύξησης του μύκητα και η παραγωγή λίπους κατά την υγρή ζύμωσή του σε κωνικές φιάλες, σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις FAN. Αρχικά, παρατηρείται ότι ο μύκητας κατανάλωσε όλη την πηγή άνθρακα καθώς και την πηγή αζώτου, ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης FAN. Οι μέγιστες τιμές βιομάζας σημειώθηκαν την 9^η ημέρα καλλιέργειας και ήταν 26 και 28,4 g/L, στα 160 και 200 mg/L FAN αντίστοιχα. Όσον αφορά στην παραγωγή λίπους οι μεγαλύτερες τιμές που καταγράφηκαν 8,6 και 8,2 g/L (160 και 200 mg/L FAN αντίστοιχα). Τέλος, αναφορικά με την ενδοκυτταρική συσσώρευση λίπους παρατηρείται ότι ήταν μεγαλύτερη, ήτοι 35%, όταν το υπόστρωμα περιείχε 160 mg/L FAN, ενώ στα 200 mg/L FAN βρέθηκε 29%.



Διάγραμμα 3.6-1: Κινητική αύξησης βιομάζας (g/L) και παραγωγής λίπους (g/L) κατά την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε κωνικές φιάλες με μίγμα υδρολύματος-τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης και FAN 80 g/L και 160 mg/L αντίστοιχα. Συνθήκες ζύμωσης 28 °C, 180rpm.



Διάγραμμα 3.6-2: Κινητική αύξησης βιομάζας (g/L) και παραγωγής λίπους (g/L) κατά την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε κωνικές φιάλες με μίγμα υδρολύματος-τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης και FAN 80 g/L και 200 mg/L αντίστοιχα. Συνθήκες ζύμωσης 28 °C, 180rpm.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υγρή ζύμωση του μύκητα σε βιοαντιδραστήρα εξετάζοντας την παραγωγή βιομάζας και λίπους στις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις FAN (160 και 200 mg/L). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.6-1 από όπου παρατηρείται ότι οι μέγιστες τιμές βιομάζας (26,1 και 31 g/L) και λίπους (9,5 και 9,2 g/L) που επιτεύχθηκαν ήταν λίγο μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες κατά τη ζύμωση σε κωνικές φιάλες. Το ίδιο διαπιστώνεται και για την περιεκτικότητα της βιομάζας σε λίπους η οποία διαμορφώθηκε στο 36% και 30% όταν η αρχική συγκέντρωση FAN ήταν 160 και 200 mg/L αντίστοιχα.

Πίνακας 3.6-1: Κινητική αύξησης βιομάζας (g/L) και παραγωγής λίπους (g/L) κατά την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella ramanniana* σε βιοαντιδραστήρα με μίγμα υδρολύματος-τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης και FAN 80 g/L και 200 mg/L αντίστοιχα. Συνθήκες ζύμωσης 28 °C, 180rpm.

Χρόνος ζύμωσης (h)	Αρχική C λακτόζη g/L	Αρχική C FAN (mg/L)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Y _{P/X} (g/g)
200	~80	~160,0	26,1	9,5	0,36
190	~80	~200,0	31,0	9,2	0,30

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται στις μικροβιακές καλλιέργειες αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και το κόστος των παραγόμενων προϊόντων. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η επιλογή ευτελών και ποσοτικά διαθέσιμων υλικών για το σκοπό αυτό. Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά από την αγροτο-βιομηχανική δραστηριότητα θεωρούνται εξαιρετική πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών ενζύμων (Gao et al. 2008).

Τα υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας είναι τα στερεά απόβλητα που δημιουργούνται από τη διαδικασία της οινοποίησης και συγκεκριμένα μετά την εκχύμωση των στεμφύλων στο πιεστήριο. Η χημική σύσταση των υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάλογα με την προέλευση της πρώτης ύλης. Γενικά, τα υπολείμματα που προέρχονται από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών είναι πιο πλούσιας θρεπτικής σύστασης σε σχέση με τα υπολείμματα από λευκές ποικιλίες. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι τα γίγαρτα και οι φλοιοί περιέχουν περισσότερα θρεπτικά συστατικά σε σύγκριση με τους βόστρυχους (Basalan et al. 2011). Αυτά τα υπολείμματα αποτελούν πλέον ένα σημαντικό απόβλητο της αγροτο-βιομηχανικής δραστηριότητας και συνήθως εναποτίθενται ελεύθερα στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σοβαρά προβλήματα ρύπανσης. Αντίθετα, πολλά υποσχόμενη είναι η πιθανότητα αξιοποίησης αυτών των υπολειμμάτων μέσω ζυμώσεων προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Botella et al. 2005). Ωστόσο, μέχρι σήμερα, τα υποπροϊόντα αυτά δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς και οι μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία είναι λίγες. Η οινολάσπη συμπεριλαμβάνεται κι εκείνη στα στερεά υποπροϊόντα της οινοποίησης και απαντάται στον πυθμένα του περιέκτη μετά τη ζύμωση ή το φιλτράριμα του οίνου. Η σύστασή της είναι πλούσια σε β-γλυκάνες, λόγω των ζυμομυκήτων που απέμειναν από τη ζύμωση του οίνου, σε τρυγικό οξύ και αιθανόλη προϊόντα τα οποία μπορούν να ανακτηθούν και να αποτελέσουν χρήσιμες πρώτες ύλες για τη βιομηχανία τροφίμων (Nerantzis & Tataridis 2006).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης των στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων και οινολάσπης ερυθρής οινοποίησης από τους μύκητες των γενών *Pleurotus* και *Aspergillus*. Αρχικά, μελετήθηκε η αύξηση των *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*, σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας και σε τρία είδη καλλιέργειας: υγρής, ημι-στερεής και στερεής κατάστασης. Στόχος ήταν η

αξιολόγηση των μυκήτων στις τρεις καλλιέργειες και αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού της παραγόμενης βιομάζας τους, της κατανάλωσης των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος, καθώς και της ενεργότητας των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν μελέτες σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας που συγκρίνουν είδη του γένους *Pleurotus* σε τρία διαφορετικά είδη καλλιέργειας.

Δεδομένου των δυσκολιών που παρουσιάζονται για τον άμεσο προσδιορισμό της βιομάζας κατά την καλλιέργεια των μυκήτων σε στερεά υπολείμματα, επιλέχθηκε μία γενικά αποδεκτή και ικανοποιητική μέθοδος εκτίμησης της βιομάζας. Με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της χιτίνης του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (Roche et al. 1993, Scotti et al. 2001), ήταν εφικτό να προσδιοριστεί έμμεσα η παραγόμενη βιομάζα των *P. ostreatus* και *P. pulmonarius*, σε υπόστρωμα από υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας. Απαραίτητη προϋπόθεση, όμως, ήταν ο προσδιορισμός της σχέσης της βιομάζας με την περιεχόμενη σε αυτήν γλυκοζαμίνη, για κάθε στέλεχος του μύκητα, σε καλλιέργεια υγρής κατάστασης. Σύμφωνα με τους Matcham et al. (1985) και Fariña et al. (1997), τα θρεπτικά υλικά των καλλιεργειών που χρησιμοποιούνται με σκοπό να οριστεί ο συντελεστής μετατροπής της γλυκοζαμίνης σε βιομάζα, πρέπει να έχουν ανάλογη σύσταση με το υπό μελέτη στερεό υλικό. Έτσι, στην παρούσα μελέτη η σχέση βιομάζας-γλυκοζαμίνης προσδιορίστηκε σε εμπλουτισμένο υδρόλυμα από στέμφυλα οινοποιίας και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της παραγωγής βιομάζας των δύο ειδών *Pleurotus* στα στερεά αυτά υπολείμματα. Μέσω των εξισώσεων βιομάζας-γλυκοζαμίνης υπολογίστηκε ότι η περιεκτικότητα του μυκηλίου σε γλυκοζαμίνη ήταν 20,3 mg/g ξ. βιομάζας για τον *P. ostreatus* και 18,5 mg/g για τον *P. pulmonarius*. Οι Mishra & Kumar (2007) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης και μελέτησαν την μυκηλιακή ανάπτυξη του *P. ostreatus* κατά την στερεή καλλιέργειά του σε κέλυφος φιστικιού. Ωστόσο, δεν προχώρησαν σε συσχέτισμό της γλυκοζαμίνης και της βιομάζας, ώστε να εκτιμήσουν την τελευταία. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η γλυκοζαμίνη ήταν 3,58 mg/g ξ. βιομάζας, περιεκτικότητα σημαντικά μικρότερη από τα δικά μας αποτελέσματα (18,5-20,3 mg/g).

Από τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας συμπεραίνεται ότι δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών *Pleurotus*. Ωστόσο, από τη συγκριτική αξιολόγηση των τριών ειδών καλλιέργειας παρατηρήθηκε ότι η

μέγιστη παραγωγή βιομάζας ευνοήθηκε από την υγρή καλλιέργεια, ενώ ακολουθήθηκαν με φθίνουσα πορεία παραγωγής η ημι-στερεή και η στερεή καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, η μέγιστη ποσότητα βιομάζας που εκτιμήθηκε στην υγρή καλλιέργεια ήταν 0,54 g/g ξ. υποστρώματος (20^η ημέρα καλλιέργειας) για τον *P. pulmonarius* και 0,50 g/g (20^η ημέρα καλλιέργειας) για τον *P. ostreatus*. Αντίθετα, στην στερεή καλλιέργεια οι υψηλότερες τιμές βιομάζας που επιτεύχθηκαν και για τους δύο μύκητες ήταν περίπου 0,40 g/g. Στις ελάχιστες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε τέτοιου είδους υπολείμματα δεν γίνεται καμία αναφορά στην παραγωγή βιομάζας, καθώς εστιάζουν περισσότερο στην παραγωγή ενζύμων. Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που έχουν διερευνήσει την παραγωγή βιομάζας με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης σε διαφορετικά αγροτικά υποπροϊόντα. Συγκεκριμένα, σε μία πρόσφατη έρευνα (Philippoussis et al. 2011), η οποία μελέτησε διάφορα στελέχη του μύκητα *Lentinula edodes*, επιτεύχθη μέγιστη παραγωγή βιομάζας 0,51 g/g (36 ημέρες ανάπτυξης) κατά την στερεή καλλιέργεια σε υπολείμματα φασολιού. Προς σύγκριση με τα δικά μας αποτελέσματα, είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι στις 20 περίπου ημέρες καλλιέργειας του *Lentinula edodes* στο ίδιο υπόστρωμα η μέγιστη τιμή βιομάζας που καταγράφηκε ήταν 0,26 g/g.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, σε υποπροϊόντα στεμφύλων οινοποιίας, προσδιορίστηκε η κατανάλωση των φαινολικών συστατικών του υποστρώματος από τους μύκητες κατά την 9^η, 15^η και 20^η ημέρα ανάπτυξης. Αρχικά, εκχυλίσθηκαν τα φαινολικά συστατικά του υποστρώματος με μεθανόλη κι έπειτα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα συνολικά εκχυλίσσιμα φαινολικά συστατικά του υποστρώματος πριν τον εμβολιασμό ήταν ~0,5% (w/w). Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αυτό ήταν σχετικό χαμηλό, καθώς αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τα φαινολικά συστατικά των στεμφύλων από ερυθρές ποικιλίες κυμαίνονται κατά μέσο όρο στο 2-3% (w/w) (Πίνακας 4-1). Ωστόσο, παρατηρείται μεγάλη διακύμανση στις τιμές των φαινολικών ουσιών γεγονός το οποίο πιθανότατα οφείλεται στην επιλογή του διαλύτη εκχύλισης των στεμφύλων, στα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της πρώτης ύλης, ήτοι των σταφυλιών, αλλά και στην τεχνολογία οινοποίησης.

Μελέτες έχουν δείξει ότι χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες οι φαινολικές ουσίες εκχυλίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Lafka et al. 2007, Mendoza et al. 2013). Ο καλύτερος διαλύτης θεωρείται το μείγμα αιθανόλης-νερού, ο οποίος εκχυλίζει λίγο μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών από τη μεθανόλη.

Πίνακας 4-1: Ποσοστό φαινολικών συστατικών (% w/w) σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας προερχόμενα από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών.

Ποικιλία προέλευσης	Φαινολικά συστατικά % (w/w) ^a	Βιβλιογραφική αναφορά
Cabernet Sauvignon	0,3	Yi et al. 2009
Royal Rouge	0,5	
Αγιωργήτικο	0,1-2,9	Lafka et al. 2005
Cencibel	2,2 ^β	Larrauri et al. 1996
Αγιωργήτικο	2,4-13,8	Louli et al. 2004
ΔΑ ^γ	2,6	Zalikanerab et al. 2007
Manto Negro	2,6	Llobera & Cañellas 2007
Negro Amaro	4,2	Negro et al. 2003

^a g/ 100 g ξηρού υποστρώματος, εκφρασμένα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

^β εκφρασμένα σε ισοδύναμα ταννικού οξέος.

^γ ΔΑ: Δεν Αναφέρεται.

Δεδομένου, όμως, του κόστους της αιθανόλης συχνά επιλέγεται η μεθανόλη για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά των σταφυλιών προς οινοποίηση είναι γνωστό ότι η ποικιλία, το στάδιο ωριμότητάς τους, οι καιρικές συνθήκες (ηλιοφάνεια, θερμοκρασία) και η χρησιμοποίηση λιπασμάτων επηρεάζουν τον σχηματισμό των φαινολικών ουσιών. Η τεχνολογία οινοποίησης είναι ένας σημαντικός παράγοντας, καθώς κατά την ερυθρή οινοποίηση ακολουθείται η τεχνική της εκχύλισης (macération). Αυτό σημαίνει ότι μετά την πίεση των σταφυλιών τα στερεά υπολείμματα δεν απομακρύνονται αλλά παραμένουν σε επαφή με το γλεύκος για κάποιο χρονικό διάστημα, με σκοπό ο παραγόμενος οίνος να έχει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τον διακρίνουν. Έτσι, η επαφή του γλεύκους με τα στέμφυλα διευκολύνει την εκχύλιση των φαινολικών στο γλεύκος, με αποτέλεσμα τα υπολείμματα στεμφύλων να μην έχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ουσιών (Κοτσερίδης 2006), όπως στην περίπτωση των υπολειμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας.

Αναφορικά με την αποδόμηση των φαινολικών συστατικών από τους δύο μύκητες διαπιστώθηκε ότι καταναλώθηκε ένα μεγάλο ποσοστό τους (70-80%). Το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης σημειώθηκε κατά την ημι-στερεή καλλιέργεια του *P. pulmonarius*. Οι Sánchez et al. (2002) καλλιέργησαν (στερεής κατάστασης καλλιέργεια) τους μύκητες *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* σε αγροτικά υπολείμματα αμπέλου και στεμφύλων οινοποιίας προς παραγωγή καρποφοριών. Η παρουσία φαινολικών συστατικών στα στέμφυλα ήταν σαφώς μικρότερη από την παρούσα μελέτη και κυμάνθηκε στα 21,7 μg/g. Τα αποτελέσματά τους στα υπολείμματα

στεμφύλων έδειξαν ότι ο *P. ostreatus* κατανάλωσε έως 18,4% των φαινολικών συστατικών, ενώ ο *P. pulmonarius* κατανάλωσε μόλις το 9,2%. Κατά την καλλιέργειά τους σε υπολείμματα αμπέλου σημειώθηκε η μέγιστη κατανάλωση φαινολικών συστατικών του υποστρώματος, ήτοι 57% (*P. ostreatus*). Σε πιο πρόσφατη μελέτη του *Lentinula edodes* σε υπολείμματα αμπέλου η κατανάλωση των φαινολικών συστατικών ήταν συγκρίσιμη με τα αποτελέσματά μας, καθώς η αποδόμηση έφθασε το 71,4% (Gaitán-Hernández et al. 2006). Αντίστοιχα μεγάλη κατανάλωση των φαινολικών ουσιών (~80%) από τον *P. ostreatus* παρατηρήθηκε και κατά την στερεή ζύμωση σε πούλπα καφέ (Velázquez-Cedeño et al. 2002), ενώ οι Tsioulpas et al. (2002) βρήκαν ότι τα είδη *Pleurotus* είναι ικανά να αποδομήσουν έως και 76% τα φαινολικά συστατικά του κατσίγαρου (olive oil mill wastewater, OMW) σε υγρές ζυμώσεις.

Στην παρούσα μελέτη, οι μοναδικές διαφορές που διαπιστώθηκαν μεταξύ των μυκήτων και μεταξύ των ειδών καλλιέργειας αφορούσαν στον ρυθμό αποδόμησης των φαινολικών ουσιών κι όχι στη συνολική κατανάλωσή τους. Η τελική συγκέντρωση των φαινολικών στο υπόστρωμα στο τέλος της καλλιέργειας ήταν σχεδόν ίδια (0,10-0,15% w/w) σε όλα τα είδη καλλιέργειας, ωστόσο φάνηκε ότι ο ρυθμός αποδόμησης των φαινολικών συστατικών επηρεάστηκε τόσο από το είδος του μύκητα όσο και από τις συνθήκες καλλιέργειας (υγρή, στερεή και ημι-στερεή).

Οι βασιδιομύκητες της λευκής σήψης και ιδιαίτερα τα είδη του γένους *Pleurotus* θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς για την βιομηχανική απολιγνιτοποίηση αγροτο-βιομηχανικών αποβλήτων, με στόχο την παραγωγή χρήσιμων ενζύμων σε μεγάλες ποσότητες και με χαμηλό κόστος. Οι μύκητες αυτοί έχουν την ικανότητα να παράγουν πλήθος υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων, δίνοντας τη δυνατότητα αξιοποίησής τους σε πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Cooke & Rayner 1984, Kirk & Farrell 1987, Gadd 2001, Kamm & Kamm 2004, Elisashvili et al. 2009). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα στερεά υπολείμματα στεμφύλων είναι υλικά πλούσια σε λιγνίνη και κυτταρίνη (Llobera et al. 2007, Spigno et al. 2008, Goñi et al. 2009, Yi et al. 2009, Akpınar & Ozuturk Urek 2012), το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης εστιάστηκε στην παραγωγή των ενζύμων λακκάση και ενδογλυκανάση.

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε U/g ξηρού υποστρώματος για να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Για τον προσδιορισμό της λακκάσης χρησιμοποιήθηκε η συρινγκαλδαζίνη (syringaldazine, SYR) ως οξειδωτικό μέσο. Τα αποτελέσματα που

σημειώνονται στη βιβλιογραφία διαφέρουν ως προς το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της λακκάσης, το οποίο στις περισσότερες μελέτες είναι ABTS. Η επίδραση των διαφορετικών υποστρωμάτων στις τιμές της λακκάσης δεν είναι γνωστή, εντούτοις οι Elissetche et al. (2007) αναφέρουν ότι η ενεργότητα της λακκάσης με SYR ήταν λίγο μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες τιμές με ABTS σε πείραμα με τον *Ganoderma adspersum* σε υπόστρωμα από ξύλο.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι τόσο το είδος της καλλιέργειας όσο και τα διαφορετικά είδη *Pleurotus* επέδρασαν σημαντικά στην παραγόμενη ποσότητα των ενζύμων. Συμπερασματικά, η μέθοδος της στερεής καλλιέργειας βρέθηκε ως η πλέον κατάλληλη για υψηλή παραγωγή λακκάσης, καθώς επιτεύχθησαν 26.247 U/g από τον *P. ostreatus* και 15.273 U/g από τον *P. pulmonarius*. Μικρότερη παραγωγή λακκάσης σε σχέση με τη στερεή σημειώθηκε στην υγρή καλλιέργεια (μέγιστες τιμές: 4.129 U/g - *P. ostreatus* και 12.174 U/g - *P. pulmonarius*) και ακόμα πιο χαμηλή στην ημι-στερεή (2.978 U/g - *P. ostreatus* και 7.945 U/g - *P. pulmonarius*).

Προσφάτως οι Elisashvili et al. (2009) μελέτησαν την υγρή καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε υπόστρωμα στεμφύλων ερυθρής οينوποίησης και αναφέρουν ότι η ενεργότητα της λακκάσης ήταν πολύ χαμηλή, ήτοι 750 U/L (~ 4,7 U/g), σε σχέση με άλλα υποστρώματα. Επίσης, ο προσδιορισμός της παραγόμενης λακκάσης του *Trametes versicolor* σε υγρή καλλιέργεια με βόστρυχους και με γίγαρτα οδήγησαν σε 400 U/L και 250 U/L αντίστοιχα (Lorenzo et al. 2002). Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι με την προσθήκη κατάλληλων παραγόντων δύναται να επαυξηθεί η παραγωγή λακκάσης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ειδικότερα, οι Moldes et al. (2003) έδειξαν ότι στις 15 ημέρες στερεής καλλιέργειας του μύκητα *Trametes hirsuta* σε γίγαρτα στεμφύλων (εμπλουτισμένα με θειαμίνη 0,2%) η λακκάση έφθασε 22.550 U/L. Επίσης, σύμφωνα με μελέτη του *P. eryngii* σε στερεή καλλιέργεια στεμφύλων οينوποιίας η μέγιστη παραγωγή λακκάσης ήταν 2.247 U/L, με προσθήκη 750μM Mn^{2+} στο μέσο καλλιέργειας (Akrinar & Ozturk Urek 2012). Η υγρή καλλιέργεια του *Funalia trogii* σε υπολείμματα βοστρύχων έδωσε αξιόλογη ποσότητα λακκάσης που φθάνει τα 4.880 U/L (Landolo et al. 2010). Είναι γεγονός ότι δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές προς σύγκριση για ημι-στερεές καλλιέργειες σε υπολείμματα στεμφύλων οينوποιίας.

Η παραγωγή λακκάσης της παρούσας έρευνας είναι συγκρίσιμη και με άλλες μελέτες σε διαφορετικά λινγνοκυτταρινούχα υλικά. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνονται από την μελέτη του *P. ostreatus* σε στερεή καλλιέργεια με

υπολείμματα βαμβακιού, κατά την οποία η μέγιστη ενεργότητα λακκάσης ήταν ~28.000 U/g (Kerem et al. 1992). Αντίστοιχα υψηλή παραγωγή, ήτοι 20.000 U/g, είχε και ο *P. pulmonarius* κατά την στερεή ζύμωση σε πίτουρο σίτου (de Souza et al. 2006). Εμφανώς μικρότερη παραγωγή λακκάσης 549 U/g, καταγράφηκε στη στερεή καλλιέργεια του *Lentinula edodes* σε στελέχη καλαμιών (Philippoussis et al. 2011). Χαμηλές τιμές λακκάσης (632-726 U/g), σε σχέση με τα αποτελέσματά μας, βρέθηκαν και κατά την στερεή του *Ganoderma resinaceum* σε υπολείμματα φασολιού (Κοκκίνης 2010). Ακόμη, τα *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* παρήγαγαν σε πούλπα καφέ 1,0 και 1,2 U/g λακκάση αντίστοιχα (Velázquez-Cedeño et al. 2002). Τέλος, όσον αφορά στην παραγωγή λακκάσης σε υγρές καλλιέργειες οι Prasad et al. (2005) έδειξαν ότι ο *P. ostreatus* παρήγαγε 8.033 U/L σε πίτουρο σίτου, ενώ οι Tsioulpas et al. (2002) προσδιόρισαν 215 U/L λακκάσης από διάφορα είδη *Pleurotus* σε υπόστρωμα κασίγαρου.

Τα συμπεράσματά μας από την αξιολόγηση των τριών ειδών καλλιέργειας συνάδουν και με άλλες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Ramírez et al. (2003) παρατήρησαν ότι η μέθοδος της στερεής καλλιέργειας του *P. ostreatus* είναι καλύτερη για την παραγωγή ενζύμων, όπως η λακκάση, σε σύγκριση με την υγρή. Οι Gonzalez et al. (υπό δημοσίευση) συνέκριναν την παραγωγή λακκάσης σε υγρή και ημι-στερεή καλλιέργεια του *Trametes pubescens* σε διάφορα αγροτο-βιομηχανικά υποπροϊόντα και διαπίστωσαν ότι υψηλότερη απόδοση είχε η υγρή καλλιέργεια. Επίσης, μεγαλύτερη παραγωγή λακκάσης στην υγρή καλλιέργεια, εν σχέση με την ημι-στερεή, παρατηρήθηκε και για τον *Trametes versicolor* σε τρία διαφορετικά υπολείμματα: πίτουρο σίτου, κέλυφος από κουκούτσια βερίκοκου και κέλυφος καρυδιού (Birhanli & Yesilada 2013).

Αναφορικά με την παραγωγή της ενδογλυκανάσης διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της ενδογλυκανάσης ήταν μεγαλύτερη στην υγρή καλλιέργεια (0,96 U/g - *P. ostreatus* και 0,53 U/g - *P. pulmonarius*), ακολουθούμενη από την ημι-στερεή (μέγιστες τιμές: 0,19-0,20 U/g), ενώ ασήμαντη ήταν η αντίστοιχη παραγωγή στη στερεή καλλιέργεια (μέγιστες τιμές: 0,05-0,07 U/g). Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι η παραγόμενη ενδογλυκανάση είναι πάνω από 10 φορές μεγαλύτερη στην υγρή εν σχέση με τη στερεή καλλιέργεια. Πρόσφατες μελέτες (Elisashvili et al. 2008b, 2009) έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η βιοσύνθεση των υδρολυτικών ενζύμων των βασιδιομυκήτων είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μέθοδο καλλιέργειας, καθώς διαπίστωσαν ότι η παραγωγή ενδογλυκανάσης ήταν έως και 5 φορές μεγαλύτερη

στην υγρή σε σύγκριση με τη στερεή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η ενδογλυκανάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο το οποίο απαιτεί μοριακό νερό για να διασπάσει τους δεσμούς των πολυμερών υλικών.

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά. Οι Elisashvili et al. (2009) παρήγαγαν 8 U/mL (~50 U/g) ενδογλυκανάσης κατά την υγρή καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας, ενώ άλλη μελέτη δείχνει ότι ο ίδιος μύκητας παρήγαγε μόλις 0,28 U/g όταν καλλιεργήθηκε σε υπολείμματα αμπέλου (Kurt & Buyukalaca 2010). Πολύ μεγαλύτερες ενεργότητες δύναται να παραχθούν σε υγρές ζυμώσεις με άλλα λιγνινοκυτταρινούχα υποπροϊόντα. Για παράδειγμα ο *Pleurotus dryinus* παρήγαγε έως και 47,7 και 47 U/mL ενδογλυκανάση σε υπόστρωμα από φλούδες μανταρινιών και φύλλα δέντρων αντίστοιχα (Elisashvili et al. 2005). Όσον αφορά στη στερεή καλλιέργεια, μελέτες που χρησιμοποίησαν βασιδιομύκητες έχουν αναφέρει μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας ενδογλυκανάσης σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα. Ειδικότερα, η παραγωγή ενδογλυκανάσης από τον *Lentinula edodes* σημείωσε μέγιστη ενεργότητα 0,93 U/g και 0,97 U/g σε υπολείμματα φασολιού και σε στελέχη καλαμιών αντίστοιχα (Philippoussis et al. 2011). Ακόμα υψηλότερη παραγωγή έχει αναφερθεί για τα είδη *Ganoderma adsperum* (1,71 U/g) και *Ganoderma resinaceum* (1,65 U/g), κατά τη ανάπτυξή τους σε υπολείμματα φασολιού και σε στελέχη καλαμιών αντίστοιχα (Κοκκίνης 2010). Τέλος, οι ζυμώσεις του *P. ostreatus* σε πούλπα καφέ έχουν δείξει ότι η παραγωγή ενδογλυκανάσης κυμαίνεται στο 0,5-0,6 U/g (Velázquez-Cedeño et al. 2002, Mata et al. 2005).

Συμπερασματικά, η παραγωγή λακκάσης ευνοείται περισσότερο από την στερεή καλλιέργεια, σε αντίθεση με την ενδογλυκανάση που παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες κατά την υγρή καλλιέργεια. Όπως έχει αναφερθεί κι από άλλους ερευνητές, η παραγωγή ενζύμων και κατ' επέκταση η αποδόμηση της λιγνινοκυτταρίνης εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος, τις συνθήκες καλλιέργειας, το είδος του μύκητα (Kerem et al. 1992, Elisashvili et al. 2008a, Elsayed et al. 2012), καθώς και από το άζωτο, τον άνθρακα και την παρουσία μεταλλικών ιόντων και θείου στο θρεπτικό μέσο (Galhaup et al. 2002, Akpınar & Ozturk Urek 2012). Μία πιθανή εξήγηση για την υψηλή παραγωγή λακκάσης στην στερεή καλλιέργεια σε σχέση με την υγρή είναι ότι αυτές οι συνθήκες προσομοιάζουν το φυσικό περιβάλλον των μυκήτων (Pandey et al. 1999). Επίσης, οι Patel et al. (2009) έδειξαν ότι η αύξηση της υγρασίας του υποστρώματος πάνω από 60% μειώνει

την παραγωγή λακκάσης του *P. ostreatus* σε υπόστρωμα από άχυρο σίτου, πιθανότατα λόγω της μειωμένης μεταφοράς O₂. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί και για τον *P. pulmonarius* (de Souza et al. 2006) και ενδέχεται να εξηγεί τη χαμηλότερη παραγωγή λακκάσης στην υγρή καλλιέργεια των στεμφύλων σε σχέση με την στερεή. Πράγματι, η λακκάση είναι ένα ένζυμο που οξειδώνει πλήθος ανόργανων και οργανικών υποστρωμάτων με ταυτόχρονη αναγωγή τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Galhaup et al. 2002). Ως εκ τούτου, η παροχή οξυγόνου είναι καθοριστικός παράγοντας για την δράση του ενζύμου.

Γενικά παρατηρήθηκε χαμηλή παραγωγή ενδογλυκανάσης στην παρούσα μελέτη, το οποίο πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα στέμφυλα είχαν χαμηλή περιεκτικότητα σε βόστρυχους (3,5%, βλ. κεφ. 2.1.2). Έχει φανεί ότι όσο πιο πλούσιο είναι το μείγμα στεμφύλων σε βόστρυχους τόσο αυξάνεται το ποσοστό της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης (Couto & Sanroman 2005). Συγκεκριμένα, όταν η αναλογία του μείγματος βόστρυχοι:στέμφυλα είναι 1:2 η περιεχόμενη ημικυτταρίνη είναι μόλις 8%, ενώ η λιγνίνη ξεπερνά το 60% (Sánchez et al. 2002). Επίσης, η αυξημένη παραγωγή ενδογλυκανάσης έχει συσχετισθεί με τα στάδια σχηματισμού καταβολών και καρποφόρησης (Mata et al. 2005), οπότε είναι πιθανόν να μην μετρήθηκαν υψηλές τιμές αυτού του ενζύμου διότι τα συγκεκριμένα πειράματα εστίασαν στην φάση επώασης των μυκήτων. Τα υδρολυτικά ένζυμα έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογής και τα είδη *Pleurotus* είναι μικροοργανισμοί που δύναται να τα παράξουν. Δεδομένου όμως, ότι δεν υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές, αποτελεί ένα πεδίο το οποίο χρήζει περαιτέρω έρευνας έτσι ώστε να αξιολογηθούν καλύτερα οι μέθοδοι καλλιέργειας (υγρή, στερεή) και οι συνθήκες καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, ενεργότητα ύδατος, συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών και παρουσία επαυξητικών παραγόντων) (Télliez- Télliez et al. 2013).

Η παραγωγή υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων των βασιδιομυκήτων σχετίζεται με τους χαρακτήρες αύξησης των μυκήτων, π.χ. με την παραγόμενη μυκηλιακή βιομάζα (Elisashvili et al. 2008a). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη ότι στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες αναφορές που μελετούν την ταυτόχρονη παραγωγή της λακκάσης και της ενδογλυκανάσης από τους βασιδιομύκητες (Velázquez-Cedeño et al. 2002, Kachlishvili et al. 2006, Elisashvili et al. 2006, 2008b, 2009, Κοκκίνης 2010, Philippoussis et al. 2011) κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθούν οι σχέσεις τόσο μεταξύ των παραγόμενων ενζύμων όσο και με την παραγωγή βιομάζας και την κατανάλωση των φαινολικών ουσιών του υποστρώματος.

Από τις συσχετίσεις που διερευνήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή της βιομάζας και της λακκάσης έχουν αντιστρόφως ανάλογη σχέση στην ημι-στερεή και υγρή καλλιέργεια, ενώ στην στερεή καλλιέργεια εντοπίστηκε θετική συσχέτιση, ιδιαίτερα για τον *P. pulmonarius* (R^2 : 0,95). Η παραγωγή βιομάζας και η ενεργότητα της ενδογλυκανάσης παρουσίασαν ως επί το πλείστον θετική συσχέτιση μεταξύ των τριών ειδών καλλιέργειας, εντούτοις οι πιο σημαντικές σημειώθηκαν στην υγρή καλλιέργεια (*P. ostreatus*- R^2 : 1, *P. pulmonarius*- R^2 : 0,99). Τα συμπεράσματα, αυτά, για την στερεή καλλιέργεια έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της στερεής καλλιέργειας του *Lentinula edodes* σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η σχέση βιομάζας-λακκάσης ήταν αρνητική (R^2 : 0,96-0,97), ενώ η σχέση βιομάζας-ενδογλυκανάσης ήταν θετική (R^2 : 0,86-0,96) (Philippoussis et al. 2011).

Η συσχέτιση μεταξύ των δύο ενζύμων ήταν αντιστρόφως ανάλογη μόνο στην ημι-στερεή και στην υγρή καλλιέργεια των δύο μυκήτων. Στη δε στερεή καλλιέργεια σημειώθηκαν θετικές συσχετίσεις οι οποίες δεν ήταν σημαντικές. Γενικά, έχει παρατηρηθεί κι από άλλους ερευνητές η αρνητική συσχέτιση της λακκάσης και της ενδογλυκανάσης (Ogha & Royses 2001, Κοκκίνης 2010, Philippoussis et al. 2011). Ωστόσο, τα συμπεράσματά μας για την στερεή καλλιέργεια επιβεβαιώνονται από τους Philippoussis et al. (2011), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η παραγωγή λακκάσης και ενδογλυκανάσης του *Lentinula edodes* είχε θετική συσχέτιση σε υπολείμματα φασολιού, ενώ στα άλλα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα είχε αρνητική συσχέτιση.

Η διερεύνηση της σχέσης της βιομάζας με τα φαινολικά συστατικά δείχνει ότι όσο αποδομούνται τα φαινολικά τόσο αυξάνει η ποσότητα της βιομάζας. Ακόμη, η κατανάλωση των φαινολικών ουσιών του υποστρώματος με την παράλληλη αύξηση της ενεργότητας της λακκάσης υποδηλώνουν την μεταξύ τους αρνητική σχέση. Είναι αξιοσημείωτο όμως, ότι αυτό ήταν χαρακτηριστικό μόνο για την στερεή καλλιέργεια των μυκήτων. Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των φαινολικών συστατικών και της παραγωγής λακκάσης σε στερεή καλλιέργεια βασιδιομυκήτων έχει διαπιστωθεί κι από άλλες έρευνες (Velázquez-Cedeño et al. 2002, Mata et al. 2005, Κοκκίνης 2010, Philippoussis et al. 2011). Στα πειράματά μας, η ημι-στερεή και η υγρή καλλιέργεια ευνόησαν την μείωση της παραγωγή της λακκάσης καθώς καταναλώνονταν τα φαινολικά σημειώνοντας θετική συσχέτιση. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των φαινολικών συστατικών και της

λακκάσης κατά την υγρή καλλιέργεια των ειδών *Pleurotus*, το οποίο έχει διαπιστωθεί και από τους Tsioumpas et al. (2002). Κάποιοι ερευνητές εξηγούν ότι εκτός από την λακκάση, ενδέχεται να εμπλέκονται κι άλλοι μηχανισμοί στην διαδικασία αποδόμησης των φαινολικών ουσιών (Tsioumpas et al. 2002, Mata et al. 2005).

Στο τελευταίο πείραμα, που αφορά στην αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων στεμφύλων οινοποιίας, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μανιταριών *Pleurotus* με καταγραφή των παραμέτρων καρποφορίας (αριθμός καρποσωμάτων, πρωιμότητα, απόδοση και βιολογική αποδοτικότητα). Μεταξύ των δύο ειδών διαπιστώθηκε ότι ο *P. pulmonarius* πέτυχε σχεδόν διπλάσιες τιμές, 14,4% και 31,4%, σε σύγκριση με τον *P. ostreatus* (7,4% και 16,2%) τόσο στην απόδοση (ΑΠ) όσο και στην βιολογική αποδοτικότητα (BA) αντίστοιχα.

Η σύγκριση αυτών των ειδών *Pleurotus* σε άχυρο σίτου και υπολείμματα βαμβακιού έχει γίνει και από τους Philippoussis & Diamantopoulou (2011), οι οποίοι επιβεβαιώνουν ότι ο *P. pulmonarius* είχε καλύτερες αποδόσεις από τον *P. ostreatus*. Παρόμοια συμπεράσματα είχε και η μελέτη των Sánchez et al. (2002), καθώς η BA των *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* όταν καλλιεργήθηκαν σε στέμφυλα οινοποιίας κυμάνθηκε στο 37-40%. Επίσης, έδειξαν ότι σε αγροτικά υπολείμματα αμπέλου η BA εκτινάσσεται στο 58-78%, τιμές που συνάδουν και με την μελέτη των Kurt & Buyukalaca (2010). Χαμηλότερη BA για το είδος *P. ostreatus* έχει διαπιστωθεί σε υπόστρωμα από φλοιό ρυζιού (7,8%), ενώ κοντά στις δικές μας μετρήσεις ήταν η BA στα υποστρώματα από φλοιό καλαμποκιού (16,5%) (Obadoi et al. 2003). Αντίστοιχα χαμηλές τιμές έχουν βρεθεί για τον *P. ostreatus* (13,6%) και τον *P. pulmonarius* σε κέλυφος φιστικού (18,5%) (Philippoussis et al. 2001) αλλά και κατά την αύξηση του *Lentinula edodes* σε σπάδικες καλαμποκιού και σε πριονίδι βελανιδιάς (19,4 % και 25,1% αντίστοιχα) (Philippoussis et al. 2003). Μέχρι σήμερα έχει διερευνηθεί ένας μεγάλος αριθμός λιγνινοκυτταρινούχων υλικών ως υποστρώματα για την καλλιέργεια του *Pleurotus*. Ανάμεσα σε όλα αυτά τα υποστρώματα την μεγαλύτερη BA ($\geq 70\%$) έχουν παρουσιάσει η πούλπα καφέ, τα υποπροϊόντα χαρτιού, τα υπολείμματα ξύλου, το χαρτόνι, τα υπολείμματα βαμβακιού και το άχυρο σίτου (Martínez-Carrera et al. 2000, Upadhyay 2002, Croan 2003, Mandeel 2005, Philippoussis & Diamantopoulou 2011, Philippoussis et al. 2011).

Το εξαντλημένο υπόστρωμα μανιταριών (SMS) αποτελεί ένα υποπροϊόν της καλλιέργειας μακρομυκήτων, το οποίο κομποστοποιείται και ενσωματώνεται στους αγρούς ως εδαφοβελτιωτικό ή αξιοποιείται από την κτηνοτροφία ως ζωοτροφή. Σε

άλλες μελέτες έχουν γίνει προσπάθειες ανάκτησης υδρολυτικών ενζύμων με αξιόλογα αποτελέσματα (Ko et al. 2005), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της πενταχλωροφαινόλης (απολυμαντικό, βιοκτόνο και συντηρητικό ξύλου, το οποίο έχει απαγορευτεί) από τα ύδατα (Chiu et al. 1998, Law et al. 2003).

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη έγινε προσπάθεια αξιοποίησης αυτού του υποπροϊόντος μέσω της αυτόλυσης με σκοπό την παραγωγή θρεπτικού υγρού, το οποίο εν συνεχεία θα αξιολογούνταν για την καταλληλότητά του ως υπόστρωμα μικροβιακών ζυμώσεων. Από τα πειράματα διαπιστώθηκε ότι όταν αλέσθηκε το SMS έδωσε λίγο μεγαλύτερες τιμές FAN συγκριτικά με τη μη αλεσμένη μορφή. Παρόλα αυτά οι μέγιστες τιμές FAN που επιτεύχθηκαν κατά την αυτόλυση ήταν χαμηλές (SMS-*P. pulmonarius*: 67,09 mg/L και SMS-*P. ostreatus*: 50,33 mg/L) κι ως εκ τούτου δεν εμπλούτισαν σημαντικά το τελικό υγρό ώστε να αποτελέσει θρεπτικό υπόστρωμα για μικροβιακές ζυμώσεις.

Είναι γεγονός ότι το πεδίο της μυκητικής αυτόλυσης δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς, ενώ δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές για την αυτόλυση του SMS. Παρόμοια μελέτη διεξήγαγαν οι Koutinas et al. (2005), οι οποίοι πραγματοποίησαν αυτόλυση στερεών υπολειμμάτων προερχόμενων από την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus awamori* σε διάφορα άλευρα. Η διεργασία της αυτόλυσης έλαβε χώρα στις ίδιες συνθήκες με την αυτόλυση του SMS, ήτοι 55 °C και μη ελεγχόμενο pH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αυτόλυση των στερεών υπολειμμάτων αλεύρου σε συγκέντρωση 45g/L έδωσε ~400 mg/L FAN, ποσότητα σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα δικά μας αποτελέσματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος και δεδομένου ότι με την αυτόλυση δεν δημιουργήθηκε ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκε στερεή καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε μείγμα υποστρώματος με SMS και οινολάσπη (WL). Τα πειράματα περιελάμβαναν βελτιστοποίηση των συνθηκών αύξησης (αναλογία υποστρώματος, υγρασία, χρόνος ζύμωσης) του μύκητα και αξιολογήθηκαν με βάση την παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων του. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* παράγουν σημαντικές ποσότητες πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην αποδόμηση της πρωτεΐνης σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες (Rao et al. 1998, Srinubaru et al. 2007).

Οι διαφορετικές αναλογίες SMS:WL που διερευνήθηκαν ήταν 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70. Η ζύμωση του *A. oryzae* στα υποστρώματα που είχαν 30-40% WL, προφανώς παρήγαγαν τη χαμηλότερη ποσότητα πρωτεολυτικών ενζύμων (έως

72 U/g), λόγω της περιορισμένης ποσότητας ζυμομυκήτων (πηγή πρωτεΐνης). Αντίθετα, υψηλότερη ενεργότητα (97-104,2 U/g) καταγράφηκε στα υποστρώματα που είχαν 50-70% WL. Πρόθεση της μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μία οικονομική μέθοδος που θα αξιοποιεί τα υπολείμματα στεμφύλων και οινολάσπης για την ανάκτηση θρεπτικών συστατικών. Δεδομένου, λοιπόν, ότι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε WL άνω του 50% δεν επέφερε ανάλογη αύξηση της παραγωγής των πρωτεολυτικών ενζύμων, επιλέχθηκε η συγκεκριμένη αναλογία για τα επόμενα πειράματα.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν διαφορετικές αρχικές υγρασίες του υποστρώματος (50-75%) και διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη ενεργότητα πρωτεολυτικών ενζύμων επιτεύχθηκε όταν η αρχική υγρασία του υποστρώματος ήταν 65%, αποτέλεσμα το οποίο συνάδει και με άλλη μελέτη του *A. oryzae* σε υπόστρωμα από υπολείμματα ηλιάνθου (Kachrimanidou et al. 2013).

Στο τελευταίο πειραματικό στάδιο της βελτιστοποίησης της στερεής καλλιέργειας του *A. oryzae* μελετήθηκε η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης (0-72 ώρες) και διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων αυξάνει μέχρι και τις 66 ώρες στερεής καλλιέργειας, με μέγιστη παραγωγή 138,46 U/g. Η τιμή αυτή είναι σημαντικά πιο χαμηλή από την μελέτη των Kachrimanidou et al. (2013), οι οποίοι προσδιόρισαν έως και 400 U/g στις 48 ώρες καλλιέργειας του *A. oryzae* με αρχική συγκέντρωση ηλιόπιτας 45 g/L. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η ηλιόπιτα έχει περισσότερη πρωτεΐνη από την οινολάσπη.

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δεν βρέθηκαν αντίστοιχες μελέτες με στέμφυλα οينوποιίας και οινολάσπη για τον *A. oryzae* προς σύγκριση των αποτελεσμάτων μας. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την παραγωγή ενζύμων από άλλους μύκητες του γένους *Aspergillus* σε υπολείμματα στεμφύλων. Ειδικότερα, η μελέτη του *Aspergillus awamori* σε υπόστρωμα από στέμφυλα οينوποιίας έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην παραγωγή ξυλανάσης, καθώς και κυτταρινολυτικών και πηκτινολυτικών ενζύμων (Botella et al. 2005, 2007, Diaz et al. 2007).

Στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα που παρήχθησαν από την στερεή καλλιέργεια του *A. oryzae* για την υδρόλυση της οινολάσπης, με στόχο την παραγωγή ενός υγρού θρεπτικού μέσου πλούσιο σε πηγή αζώτου. Εφόσον το κύριο συστατικό της οινολάσπης είναι η πρωτεΐνη (λόγω των ζυμομυκήτων) το

κριτήριο για την εκτίμηση της υδρόλυσης ήταν η παραγωγή FAN. Η μέγιστη παραγωγή FAN που επιτεύχθηκε κατά την υδρόλυση της οινολάσπης ήταν 236 mg/L, τιμή πολύ χαμηλότερη από αυτή που επιτεύχθη σε αντίστοιχη υδρόλυση της ηλιόπιτας (FAN 600mg/L) (Kachrimanidou et al. 2013). Τούτο, υποδεικνύει ότι χρειάζονται να γίνουν περαιτέρω πειράματα διερευνώντας είτε κάποιους παρεμποδιστικούς παράγοντες του υποστρώματος είτε χρησιμοποιώντας περισσότερη αρχική ενεργότητα ενζύμων.

Στο τελευταίο στάδιο της μελέτης εξετάστηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους μέσω υγρής ζύμωσης του Ζυγομύκητα *Mortierella ramanniana* σε μίγμα υδρολύματος από οινολάσπη με τυρόγαλα, τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρα. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων υπήρξαν δυσκολίες που έπρεπε να αντιμετωπιστούν καταλλήλως για να ολοκληρωθούν τα πειράματα και κατ' επέκταση η παρούσα μελέτη. Οι δυσκολίες αυτές αφορούσαν κυρίως προβλήματα κατά την δειγματοληψία καθώς οι μυκηλιακοί μύκητες έχουν την τάση να καταλαμβάνουν κατά την αύξησή τους το εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα και τα πτερύγια ανάδευσης. Τούτο, ήταν δυνατόν να αποφευχθεί μόνο με την δημιουργία σφαιριδίων βιομάζας (pellets) και επιτεύχθη όταν χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια αντί για εναιώρημα σπορίων ως εμβολιαστικό υλικό (Bellou et al. 2012). Για να επιτευχθεί ικανοποιητική κατανομή του οξυγόνου, για την ανάπτυξη του μύκητα, έπρεπε να συνδυαστούν η ροή παροχής οξυγόνου με την ταχύτητα ανάδευσης. Ωστόσο, προέκυψε ένα ακόμη πρόβλημα που ήταν η θραύση του μυκηλίου, λόγω της έντονης ανάδευσης, με αποτέλεσμα την διακοπή της καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, χρειάστηκαν πολλές επαναλήψεις των πειραμάτων για να επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας.

Αναφορικά με το είδος *Mortierella ramanniana* έχουν γίνει λίγες μελέτες για την αύξησή του και την παραγωγή λιπιδίων σε υποστρώματα από υπολείμματα της βιομηχανίας τροφίμων, ενώ η αξιοποίηση του τυρογάλακτος από τον εν λόγω μύκητα δεν έχει γίνει ακόμη αντικείμενο μελέτης. Τα αποτελέσματά μας είναι συγκρίσιμα με αυτά άλλων μελετών που παρουσιάζονται στον πίνακα 4-2. Ειδικότερα, υψηλές τιμές παραγωγής λίπους (31,3 g/L) δύναται να επιτευχθούν σε συνθετικά υποστρώματα όπως η γλυκόζη. Σε βιομηχανικά παραπροϊόντα όπως η γλυκερόλη, το τυρόγαλα και η μελάσα οι τιμές αυτές είναι πιο χαμηλές, ήτοι από 3,2-9,6 g/L. Η παρούσα μελέτη, φθάνοντας τις μέγιστες τιμές παραγωγής λίπους που υπάρχουν στη βιβλιογραφία,

Πίνακας 4-2: Αξιοποίηση διαφόρων υποστρωμάτων και παραγωγή λίπους από τους *M. isabellina* και *M. ramanniana*.

Είδος	Υπόστρωμα	Συνθήκες	Λίπος (g/L)	Y _{P/X} %	Αναφορά
<i>Mortierella ramanniana</i>	Γλυκόζη	AΦ ^a	3,6	24	Hansson & Dostalek 1988
	Γλυκόζη	B ^b	31,3	50	Hiruta et al. 1997
	Ξυλόζη	AΦ	18,5	64,1	Gao et al. 2013
	Γλυκερόλη	AΦ	3,7	53,1	Bellou et al. 2012
	Γλυκερόλη	B	3,2	32,7	Bellou et al. 2012
	Τυρόγαλα	AΦ	8,6	35	Παρούσα μελέτη
	Τυρόγαλα	B	9,5	36	Παρούσα μελέτη
<i>Mortierella isabellina</i>	Γλυκόζη	B	12,7	72	Chatzifragkou et al. 2010
	Φρουκτόζη	AΦ	7,4	61	Chatzifragkou et al. 2010
	Μελάσα	AΦ	5,1	54	Chatzifragkou et al. 2010
	Γλυκόζη	AΦ	18,1	50	Papanikolaou et al. 2004
	Τυρόγαλα	AΦ	8,1	25,3	Vamvakaki et al. 2010
	Επεξεργασμένο τυρόγαλα	AΦ	3,65	10,75	Demir et al. 2013

^a AΦ: αναδεδυόμενες φιάλες, ^b B: Βιοαντιδραστήρας

έδειξε ότι το μη επεξεργασμένο τυρόγαλα είναι ιδανικό υπόστρωμα για μικροβιακές ζυμώσεις προς αυτήν την κατεύθυνση.

Συνοψίζοντας, η στερεή καλλιέργεια είναι μία οικονομικά αποδοτική διεργασία για τη χρησιμοποίηση αγροτο-βιομηχανικών υποπροϊόντων. Οι Zhihui et al. (2008) υποστηρίζουν ότι ο συνδυασμός των στεμφύλων οινοποιίας με την οινολάσπη μπορούν να δημιουργήσουν ένα κατάλληλο και πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα για την στερεή καλλιέργεια μυκήτων. Τα αποτελέσματα μας συνηγορούν στο γεγονός ότι χρειάζεται περισσότερη έρευνα ώστε να βελτιστοποιηθεί τόσο η στερεή καλλιέργεια του *A. oryzae* όσο και η υδρόλυση των υπολειμμάτων οινοποιίας.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος αναφορών για την καλλιέργεια ζυμών και μυκήτων σε βιομηχανικά υποπροϊόντα προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, με ικανοποιητικές αποδόσεις (Papanikolaou & Aggelis 2002, Papanikolaou et al. 2002, 2003, 2008, 2010, Fakas et al. 2009, André et al. 2010, Vamvakaki et al. 2010). Παράλληλα, έχουν μελετηθεί διάφορα αγροτο-βιομηχανικά υπολείμματα για την παραγωγή υδρολυμάτων (Koutinas et al. 2007, Wang et al. 2010). Έτσι, μία δυναμική προοπτική αξιοποίησης των υδρολυμάτων, που χαρακτηρίζονται από πλούσια σύνθεση, είναι η αντικατάσταση της πηγής αζώτου

(π.χ. εκχύλισμα ζύμης) και των διάφορων ανόργανων στοιχείων, τα οποία ήθισται να χρησιμοποιούνται στις διεργασίες ζύμωσης (Kachrimanidou et al. 2013).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν επανεξετασθεί νομικά, περιβαλλοντικά και οικονομικά θέματα, υποδεικνύοντας ότι η υπαίθρια εναπόθεση και η υγειονομική ταφή των υποπροϊόντων οινοποιίας παρουσιάζει περιβαλλοντικά και κοινωνικά μειονεκτήματα. Ταυτοχρόνα, όμως, η πρόοδος της μοντέρνας χημείας και της βιοτεχνολογίας επέτρεψε την μελέτη αυτών των υποπροϊόντων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την ανακύκλωσή τους αλλά και την χρησιμοποίησή τους προς παραγωγή νέων προϊόντων. Στις ημέρες μας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κομποστοποίηση, τροφή και θρεπτικά συμπληρώματα, ζωοτροφή, αλκοολούχα ποτά, μελάνια και βαφές, ως προϊόντα υγιεινής, αντιβακτηριακοί παράγοντες, και βιοκαύσιμα (Nerantzis & Tataridis 2006). Μία άλλη δυναμική προοπτική είναι η παραγωγή χρήσιμων ενζύμων για τη βιομηχανία τροφίμων και χημικών προϊόντων. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα υπολείμματα στεμφύλων οινοποιίας είναι ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την παραγωγή ενζύμων, το οποίο έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα κι από άλλες μελέτες (Moldes et al. 2003, Botella et al. 2005, 2007, Díaz et al. 2007, Akpınar & Ozturk Urek 2012). Επιπροσθέτως, αναπτύχθηκαν διεργασίες οι οποίες δύνανται να χρησιμοποιηθούν για την απορρύπανση του περιβάλλοντος από τα πολυάριθμα απόβλητα των αγροτο-βιομηχανιών, τα οποία συνήθως απορρίπτονται στο περιβάλλον χωρίς καμία επεξεργασία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, που αφορούν στην αξιοποίηση των στερεών υπολειμμάτων οινοποιίας από τους μύκητες *Pleurotus*, μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

- ✓ Η παραγωγή βιομάζας των ειδών *Pleurotus* ευνοήθηκε περισσότερο κατά την υγρή καλλιέργειά τους.
- ✓ Σημειώθηκε ικανοποιητική αποδόμηση των φαινολικών ουσιών του υποστρώματος (~70-80%) και στα τρία διαφορετικά είδη καλλιέργειας.
- ✓ Το υπόστρωμα στεμφύλων δύναται να χρησιμοποιηθεί για υψηλή παραγωγή λακκάσης.
- ✓ Η στερεή καλλιέργεια ευνόησε την παραγωγή λακκάσης, ενώ η υγρή την παραγωγή της ενδογλυκανάσης.
- ✓ Η καλλιέργεια των μανιταριών σε υπόστρωμα στεμφύλων έδωσε καλές αποδόσεις, όμως χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.
- ✓ Μεταξύ των δύο μυκήτων *Pleurotus*, ο *P. ostreatus* παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμων, ενώ ο *P. pulmonarius* έχει καλύτερες αποδόσεις στην παραγωγή μανιταριών.

Από τα αποτελέσματα της αξιοποίησης του εξαντλημένου υποστρώματος καλλιέργειας μανιταριών (SMS) σε συνδυασμό με την οινολάσπη (WL) από τον μύκητα *A. oryzae* συμπεραίνεται ότι:

- ✓ Η μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (138,46 U/g) του μύκητα σημειώθηκε σε ζύμωση διάρκειας 66 ωρών σε υπόστρωμα που περιείχε ποσοστό οινολάσπης πάνω από 50% και με αρχική υγρασία 65%.
- ✓ Η μέγιστη παραγωγή FAN που επιτεύχθηκε κατά την υδρόλυση της οινολάσπης ήταν σχετικά χαμηλή (236 mg/L), γεγονός το οποίο πιθανότατα οφείλεται σε παρεμποδιστικούς παράγοντες του υποστρώματος και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Τέλος, η παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε άζωτο και ο συνδυασμός σακχαρούχα απόβλητα, όπως το τυρόγαλα, αποτελεί μία δυναμική προοπτική αξιοποίησης αποβλήτων στη βιοτεχνολογία παραγωγής μικροβιακών μεταβολιτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akpinar M. & Ozuturk Urek R. (2012). Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus eryngii*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 42, 582-597.
- Alonso A., Guilleán D., Barroso C., Puertas B. & Garcia A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 50, 5832-5836.
- André A., Diamantopoulou P., Philippoussis A., Sarris D., Komaitis M. & Papanikolaou S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products* 31, 407-416.
- Arvanitogiannis S.I., Ladas D. & Mavromatis A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 75-487.
- Baldrian P. & Šnajdr J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1023-1029.
- Basalan M., Gungor T., Owens F.N. & Yalcinkaya I. (2011). Nutrient content and *in vitro* digestibility of Turkish grape pomaces. *Animal Feed Science and Technology* 169, 194-198.
- Belitz H.D. & Grosch W. (1986). *Food Chemistry*, 2nd Edition, Spriger-Verlag, New York., 57-61.
- Bellou S., Moustogianni A., Makri A. & Aggelis G. (2012). Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 146-158.
- Bertran E., Sort X., Soliva M. & Trillas I. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology* 95, 203-208.
- Birhanli E. & Yesilada O. (2013). The utilization of lignocellulosic wastes for laccase production under semi solid-state and submerged fermentation conditions. *Turkish Journal of Biology* 37, 450-456.
- Botella C., de Ory I., Webb C., Cantero D. & Blandino A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal* 26, 100-106.
- Botella C., Díaz A., de Ory I., Webb C. & Blandino A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 42, 98-101.
- Buzzini P. & Martini A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology* 71, 41-4.
- Buzzini P., Gobbetti M. & Rossi J. (1993). Utilization of grape must and concentrated rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger* in batch fermentations. *Biotechnology Letters* 15, 151-6.
- Castillo F. J. (1990). Lactose metabolism by yeasts. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, ed. H. Verachtert & R. De Mot. Marcel Dekker, New York, pp. 297-320.

- Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotiou-Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G. & Papanikolaou S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European journal of Lipid Science and Technology*, 112, 1048-1057.
- Chira K., Schmauch G., Saucier C., Fabre S. & Teissedre P.L. (2009). Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 57, (2): 545-553.
- Chiu S.W., Ching M.L., Fong K.L. & Moore D. (1998). Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. *Mycological Research* 102, (12): 1553-1562.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y. & Srinophakun P.(2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 1012-1018.
- Cooke R.C. & Rayner A.D.M. (1984). Ecology of Saprotrophic Fungi. Longman.
- Couto S.R. & Sanroman M.A. (2005). Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22, 211-219.
- Croan S.C. (2003). Utilization of treated conifer wood chips by *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. species for cultivating mushrooms. *Mush. Int.* 91: 4-7.
- Danilatos N. (1986). Development of Greek wine and wineries. *Proceedings in 1st EEC Symposium on Anaerobic Digestion results of research and demonstration projects*, Villeneuve-d' Ascq, France, 4-6 March, 261-267.
- Davies R.J. & Holdsworth J.E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: biochemistry, physiology and production. *Advances in Applied Lipid Research* 1, 119-159.
- Demir M., Turhan I., Kucukcetin A. & Alpkent Z. (2013). Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. *Bioresource Technology*, 128, 365-369.
- de Souza D.F., Tychanowicz G.K., Marques de Souza C.G. & Peralta R.M. (2006). Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *Journal of Basic Microbiology* 46, (2):126-134.
- Diamantopoulou P. & Philippoussis A. (2001). Production attributes of *Agaricus bisporus* white and off-white strains and the effect of CaCl₂ irrigation on productivity and quality. *Scientia Horticulturae* 91, (3-4): 379-391.
- Díaz B.A., de Ory I., Caro I. & Blandino A. (2012). Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food and Bioproducts Processing* 90, 72-78.
- Elisashvili V., Kachlisvili E., Penninckx M. (2008a). Effect of growth substrate, method of fermentation and nitrogen source on lignocelluloses-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 35, (11):1531-1538.

- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T. & Kvesitadze, G. (2008b). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* 99, 457-462.
- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Asatiani M. & Kvesitadze G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 998-1004.
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Tamar Khardziani & Agathos S. N. (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 331–339.
- Elissetche J.-P., Ferraz A., Freer J. & Rodríguez J. (2007). Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, (3): 429-434.
- Evans C. S., Hedger J. N. (2001). Degradation of plant cell wall polymers. In: *Fungi in bioremediation* (Gadd G. M. ed). British Mycological Society, Cambridge University Press, United Kingdom.
- Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A. & Aggelis G. (2009). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* 33, (4): 573-580.
- Fariña J.I., Siñeriz F., Molina O.E. & Perotti N.I. (1997). Determining biomass in viscous culture broths of *Sclerotium rolfii* during β -glucan production: hexosamine assay as an indirect alternative technique. *Biotechnology Techniques* 11, (9):667-669.
- Farkaš J. (1988). Technology and Biochemistry of Wine, Volume 2, ed. AMACOM Div American Mgmt Assn, ISBN 2881240704, 9782881240706.
- Fadyloglou S. (2001). Immobilization and Characterization of Ficin. *Nahrung Food* 45, (2): 143-146.
- Femenia A., Sánchez E.S., Sim al S. & Rosselló C. (1998). Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 46, 271-276.
- Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. & Guinee T.P. (eds) (2004). Cheese: an overview. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume 1: General Aspects 1-18.
- Freimund S., Sauter M., Kappeli O. & Dutler H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers* 54, 159-171.
- Frost M.G. & Moss D.A. (1987). Production of enzymes by fermentations. In: *Biotechnology*, (Rehm H.J., Reed G. eds), Verlagsgesellschaft, Weinheim 7, 108–110.
- Gadd G.M. (2001). Fungi in Bioremediation. Cambridge University press 2nd edition.
- Gaitán-Hernández R., Esqueda M., Gutiérrez A., Sánchez A., Beltrán-García M. & Mata G. (2006). Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 432-439.

- Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B. & Haltrich D. (2002). Increased Production of Laccase by the Wood-Degrading Basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 529-536.
- Gao D., Zeng J., Zheng Y., Yu X. & Chen S. (2013). Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology*, 133, 315-321.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F. & Xi Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology* 99, 7623-7629.
- Goñi I., Díaz-Rubio M.E., Pérez-Jiménez J. & Saura-Calixto F. (2009). Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Research International* 42, 840-846.
- Gonzalez J.C., Medina S.C., Rodriguez A., Osma J.F., Alméciga-Díaz C.J. & Sánchez O.F. (2013). Production of *Trametes Pubescens* Laccase under Submerged and Semisolid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes. *PLoS ONE* 8(9): e73721. doi:10.1371/journal.pone.0073721.
- Gonzalez-Paramas A., Esteban-Ruano S., Santos-Buelga C., Pascual-Teresa S. & Rivas-Gonzalo J. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 52, 234-238.
- Gonzalez Siso M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey. *Bioresource Technology* 57:1-11.
- Hang Y.D. & Woodams E.E. (1985). Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnology Letters* 7, 253-4.
- Hang Y.D., Lee C.Y. & Woodams E.E.(1986). Solid state fermentation of grape pomace for ethanol production. *Biotechnology Letters* 8, 53-6.
- Hansson L. & Dostalek M. (1988). Effect of culture conditions on mycelian growth and production of g-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 240-246.
- Hiruta O., Yamamura K., Takebe H., Futamura T., Iinuma K. & Tanaka H. (1997). Application of Maxblend fermentor for microbial processes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 79-86.
- Hoebler C., Barry J.L., David A. & Delort-Laval J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 37, (2): 360-367.
- Isikhuemhen O.S. & Mikiashvili N.A. (2009). Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 36, (1):1353-1362.
- Kachlishvili E., Penninckx M.J., Tsiklauri N. & Elisashvili V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 391-397.

- Kachrimanidou V., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Yanniotis S., Kookos I. & Koutinas A.A. (2013). Utilisation of By-Products from Sunflower-Based Biodiesel Production Processes for the Production of Fermentation Feedstock. *Waste and Biomass Valorization*, DOI 10.1007/s12649-012-9191-x.
- Kamm B. & Kamm M. (2004). Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 137-145.
- Kerem Z., Friesem D. & Hadar Y. (1992). Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1121-1127.
- Kirk T.K. & Farrell R.L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, 465-505.
- Ko H.G., Park S.H., Kim S.H., Park H.G. & Park W.M. (2005). Detection and Recovery of Hydrolytic Enzymes from Spent Compost of Four Mushroom Species. *Folia Microbiologica* 50, 103-106.
- Kogan G. (2000). 1-3,1-6-b-D-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry* 23, 107-152.
- Koutinas A. & Papanikolaou S. (2011) Biodiesel production from microbial oil. In: *Handbook of biofuels production-Processes and technologies* eds Luque, R., Campelo, J. and Clark, J.H. pp. 177-198. Cambridge (UK): Woodhead Publishing Limited.
- Koutinas A.A., Wang R.-H. & Webb C. (2005). Development of a process for the production of nutrient supplements for fermentations based on fungal autolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 629-638.
- Koutinas A.A., Arifeen N., Wang R. & Webb C. (2007). Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 61-72.
- Kuhad R. C. & Singh A. (1993). Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* 13, (2): 151-172.
- Kurt S. & Buyukalaca S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresourve Technology* 101, 3164-3169.
- Lafka T.I., Sinanoglu V. & Lazos S.E. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104, 1206-1214.
- Landolo D., Piscitelli A., Sannia G. & Faraco V. (2010). Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology* doi:10.1007/s12010-010-9014-0.
- Lankinen P. (2004). Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocelluloses-containing media. Thesis, University of Helsinki.
- Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzman-Mendez B.E. & Lopez-Madrid W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216, 193-201.

- Larrauri J.A., Ruperez P. & Saura-Calixto F. (1996). Antioxidant activity of wine pomace. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 369-372.
- Law W.M., Lau W.N., Lo K.L., Wai L.M. & Chiu S.W. (2003). Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* 52, 1531-1537.
- Leatham G. F. (1986). The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, 51-58.
- Lettera V., Del Vecchio C., Piscitelli A. & Sannia G. (2011). Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. *Comptes Rendus Biologies* 334, 781-788.
- Liang Y., Pan L., Lin Y. (2009). Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73, 192-5.
- Lie S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 37-41.
- Llobera A. & Cañellas J. (2007). Dietary fiber content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* 101, 659-666.
- Lorenzo M., Moldes D., Rodríguez Couto S. & Sanromán A. (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresources Technology* 82, 109-113.
- Louli V., Ragoussis N. & Magoulas K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology* 92, 201-208.
- Mandeel Q.A. et al. (2005). Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 601-607.
- Manole A., Herea D., Chiriac H. & Melnig V. (2008). Laccase activity determination. Vol. I, s. Biomaterials in Biophysics, Medical Physics and Ecology. Scientific Annals of "ALEXANDRU IOAN CUZA DIN IAȘI" UNIVERSITY.
- Mansur M., Arias M. E., Copa-Patiño J. L., Flårdh M. & González A. E. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95, 1013-1020.
- Martínez-Carrera D., Aguilar A., Martínez W., Bonilla M., Morales P. & Sobal M. (2000). Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. Chapter 45, 471-488. In: *Coffee biotechnology and quality* (Sera T., Soccol C., Pandey A. & Roussos S. eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Martínez Á. T., Speranza M. M., Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A. & del Río J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8, 195-204.
- Marwaha S. S. & Kennedy J. F. (1988). Review: whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science Technology* 23, 323-336.

- Mata G. & Savoie J.M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 513-519.
- Mata G., Murrieta Hernández D.M. & Iglesias Andreu L.G (2005). Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21, 143-150.
- Matcham E.S., Jordan R.B. & Wood A.D. (1985). Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Applied Microbiology and Biotechnology* 21, 108-112.
- Mendoza L., Yañez K., Vivanco M., Melo R. & Cotoras M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43, 360-364.
- Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Mishra A. & Kumar S. (2007). Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 42, 681-685.
- Mishra M.K., Barik S.K., Ayyappan S. & Mohapatra B.C. (2000). Fish bioassay for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent. *Bioresource Technology* 72, 213-218.
- Mishra N., Dubey A., Mishra R. & Barik N. (2010). Study on antioxidant activity of common dry fruits. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3316-3320.
- Moldes D., Gallego P.P., Rodríguez Couto S. & Sanromán A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 25, 491-495.
- Negi S. & Benerjee R. (2006). Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. *Food Technology and Biotechnology* 44, 257-261.
- Negro C., Tommasi L. & Miceli A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* 87, 41-4.
- Nerantzis E.T. & Tataridis P. (2006). Integrated enology-utilization of winery wastes for the production of high added products. *e-Journal of Science & Technology* 1, 79-89.
- Nicolini L., Volpe C., Pezzotti A. & Carilli A. (1993). Changes in in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. *Bioresource Technology* 45, 17-20.
- Obadoi M., Cleland-Okine J. & Vowotor K.A. (2003). Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 146-149.
- Ohga S. & Royse D.J. (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters* 201, (1): 111-115.
- Oner M.D. & Akar B. (1993). Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production, Gaziantep University, Turkey, 125-156.

- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R. & Nigam P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77, 149-52.
- Papanikolaou S. & Aggelis G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource Technology* 82, 43-49.
- Papanikolaou S. & Aggelis G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 639-654.
- Papanikolaou S. & Aggelis G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:1031-1051.
- Papanikolaou S & Aggelis G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:1052-1073.
- Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G. (2003). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 95, 287-291
- Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M. & Aggelis G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* 97:867-75.
- Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M. & Aggelis G. (2007). Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 1060-1070.
- Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M. & Aggelis G. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology* 99, 2419-2428.
- Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I. & Aggelis G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 308-312.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G. & Marc I. (2003). Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology*,
- Papanikolaou S., Diamantopoulou P., Chatzifragkou A., Philippoussis A. & Aggelis G. (2010). Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy and Fuels* 24, 4078-4086.
- Patel H., Gupte A. & Gupte S. (2009). Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *Bioresources* 4, (1): 268-284.
- Patil VK, Chakrawar VR, Narwadkar PR & Shinde GS (1995). Grape. In: *Handbook of fruit science and technology* (Salunkhe D.K. & Kadam S.S. eds), New York: Marcel Dekker, 7-37.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J. & Martínez J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5, 53-63.
- Pérez-Serradilla J.A. & Luque de Castro M.D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry* 111, 447-456.

- Philippopoulos C. & Papadakis M. (2001). Current trends in whey processing and utilization in Greece, *International Journal of Dairy Technology* 54, 1:14-19.
- Philippoussis A. (2009). Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In: *Biotechnology for Agro-industrial Residues Processing* (Sing Nigam P. and Pandey A. eds), Springer, 163-196.
- Philippoussis A. & Diamantopoulou P. (2011). Agro-food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*.
- Philippoussis A., Diamantopoulou P., Zervakis G., (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, (6): 551-557.
- Philippoussis A., Diamantopoulou P. & Zervakis G. (2002). Monitoring of mycelium growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural residues. In : *Mushroom Biology and Mushroom Products* (Sánchez, Huerta, Montiel eds), UAEM, Cuernavaca, Mexico, 279-287
- Philippoussis A., Zervakis G., Diamantopoulou P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Acrocybe aegeria*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17, 191-200.
- Philippoussis A., Diamantopoulou P., Papadopoulou K., Lakhtar H., Roussos S., Parissopoulos G. & Papanikolaou S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27, 285-297.
- Poldermans B. (1990). Industrial uses of enzymes, In: *Enzymes in industry-production and applications* (Gerhartz W.), VCH, New York, 109.
- Prasad K.K., Mohan S.V., Bhaskar Y.V., Ramanaiah S.V., Babu V.L., Pati B.R. & Sarma P.N. (2005). Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *Journal of Microbiology* 43, (3):301-307.
- Puoci F., Iemma F., Spizzirri U., Restuccia D., Pezzi V., Sirianni R., Manganaro L., Curcio M., Parisi O., Cirillo G. and Picci N. (2011). Antioxidant Activity of a Mediterranean Food Product: "Fig Syrup". *Nutrients* 3, 317-329.
- Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86:807-815.
- Ratledge C. & Wynn J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51, 1-51.
- Ramírez N.E., Vargas M.C., Ariza J.C. & Martínez C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2, 64-72.
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T., (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484-489.

- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. & Deshpande V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 3, 597-635.
- Richardson A. & McDougall G.J. (1998). Identification and partial purification of an oxidase from lignifying xylem of Leyland cypress (*X Cupressocyparis leylandii*). *Trees* 12, (3): 146-152.
- Rodríguez Couto S., Longo M.A., Cameselle C., Sanromán MÁ (1999). Lignolytic enzymes from corn cob cultures of *Phanerochaete chrysosporium* in semi-solid state conditions. *Acta Biotechnologica* 19, 17-25.
- Roche N., Venague A., Desgranges C. & Durand A. (1993). Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. *Biotechnology Advances* 11, 677-683.
- Saeman J. F., Moore W. E., Mitchell R. L. & Millett M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *TAPPI Journal* 34, 336-365
- Salgado M.J., Rodríguez N. Cortes S. & Domínguez M.J. (2006). Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production. *Journal of Science of Food and Agriculture* 90, 2168-2177.
- Sanchez-Amat A. & Solano F. (1997). A Pluripotent Polyphenol Oxidase from the Melanogenic Marine *Alteromonas* sp. Shares Catalytic Capabilities of Tyrosinases and Laccases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, (3): 787-792.
- Sánchez A., Ysunza F., Beltrán-García M.J. & Esqueda M. (2002). Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 50, 2537-2542.
- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. In : *Biotechnology Advances* 27, (2): 185-194.
- Scotti T.C., Vergoignant C., Feron B. & Durand A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal* 7, 1-5.
- Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M. & Kumar A. (2011). Laccase: Microbial sources, Production, Purification and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*, doi:10.4061/2011/217861.
- Spigno G., Pizzorno T. & De Faveri D.M. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology* 99, 4329-4337.
- Srinubaru G., Lokeswari N. & Jayaraju K. (2007). Screening of Nutritional Parameters for the Production of Protease from *Aspergillus Oryzae*. *E-journals of Chemistry* 4, (2): 208-215.
- Stajić M., Persky L., Hadar Y., Friesem D., Duletic-Iausevic S., Wasser S.P. & Nevo E. (2006). Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168, 87-96.
- Stredonsky M. & Conti E. (1993). Xanthan production by solid state fermentation. *Process Biochemistry* 34, 581-7.
- Strong P.J. & Burgess J.E. (2008). Fungal and enzymatic remediation of a wine lees and five wine-related distillery wastewaters. *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2007.12.04.

- Tataridis P., Mylonas P., Mylona D. & Nerantzis E.T. (2005). Bioethanol Production from Solid State Fermentation (SSF) of Grape Pomace. *International Conference Renewable resources and biorefineries*, Ghent - Belgium, 19-21September, p. 92.
- Tataridis P., Apostolopoulos K., Moraitaki E., Spanou D., Nerantzis E.T. & Papakonstantinou S. (2006). Utilization of grape pomace for the production of bacterial cellulose. *Pan-Hellenic Union of Bioscientists Congress "Biosciences in the 21st century"*, 13-15 April, Athens, Greece, p. 114, (in greek).
- Télliez-Télliez M., Díaz R., Sánchez C. & Díaz-Godínez G. (2013). Hydrolytic enzymes produced by *Pleurotus* species. *African Journal of Microbiology Research* 7, (4): 276-281.
- Thurston CF. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. & Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84, 251-257.
- Upadhyay R.C., Verma R.N., Singh S.K. & Yadav M.C. (2002). Effect of organic nitrogen supplementation in *Pleurotus* species In: *Mushroom Biology and Mushroom Products* (Sánchez J.E. et al. eds).
- Vamvakaki A.-N., Kandarakis I., Kaminarides S., Komaitis M. & Papanikolaou S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences* 10, 348-360.
- Velázquez-Cedeño M.A., Mata G. & Savoi J.-M. (2002). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulosic enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 201-207.
- Viniegra-González G. (1999). Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates. In: *Advances in bioprocess engineering II*, (Galiendo E. & Ramírez O.T. eds), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 123-6.
- Vlyssides A.G., Barampouti E.M. & Mai S. (2005). Wastewater characteristics from Greek wineries and distilleries. *Water Science and Technology* 51, (1):53-60.
- Waldron, K. W. & Selvendran, R. R. (1990). Composition of cell walls from different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiologia Plantarum* 80, 568-575.
- Wang R., Law R.C.S. & Webb C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry* 40, 217-227.
- Wang R., Shaarani S.M., Godoy L.C., Melikoglu M., Vergara C.S., Koutinas A. & Webb C. (2010). Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 77-83.
- Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J. & Li G. (2008). Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresource Technology* 99, (6): 1926-1931.
- www.enzymeindia.com
- www.eurlex.europa.eu, Ειδική έκθεση αριθ. 7/2012 «Μεταρρύθμιση της κοινής οργάνωσης αγοράς στον αμπελοοινικό τομέα: κατάσταση προόδου».

www.fao.org

www.indexfungorum.org

Yi C., Shi J., Kramer J., Xue S., Jiang Y., Zhang M., Ma Y. & Pohorly J. (2009). Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry* 114, 570-576.

Zalikarenab L., Pirmohammadi R. & Teimuriyansari A. (2007). Chemical Composition and Digestibility of Dried White and Red Grape Pomace for Ruminants. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, (9):1107-1111.

Zhihui B., Bo J., Yuejie L., Jian C. & Zuming L. (2008). Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences* 20, 353-358.

Ανυφαντάκης Μ. Εμμανουήλ (2004). Τυροκομία : Χημεία-Φυσικοχημεία-Μικροβιολογία, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Βαβουράκη Ι.Α. (2010). Προκαταρκτική Μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων. Χρηματοδοτούμενο έργο LIFE+: INTEGRASTE «Ανάπτυξη ολοκληρωμένης πολιτικής για τη διαχείριση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων με στόχο τη μεγιστοποίηση της ανάκτησης υλικών και ενέργειας». Πάτρα.

Γαλιώτου-Παναγιώτου Μ. (2006). Ενζυμολογία Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις Γ.Π.Α., Αθήνα.

Καν. (ΕΚ) 479/08 του Συμβουλίου για την κοινή οργάνωση της αμπελοοινικής αγοράς, την τροποποίηση των καν. (ΕΚ) αριθ. 1493/99, (ΕΚ) αριθ. 1782/03, (ΕΚ) αριθ. 1290/05, (ΕΚ) αριθ. 3/08 & την κατάργηση των καν. (ΕΟΚ) αριθ. 2392/86 & (ΕΚ) αριθ. 1493/99.

Κατσαρός Ι. Γ. (2009). Μελέτη της επίδρασης της διεργασίας υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης σε πρωτεολυτικά ένζυμα τροφίμων. Διδακτορική Διατριβή, Ε.Μ.Π., Αθήνα.

Κοκκίνης Γ. (2010). Μελέτη της ανάπτυξης, καρποφορίας και παραγωγής λιγνοκυτταρινολυτικών ενζύμων μυκήτων του γένους *Ganoderma* σε ζύμωση στερεάς φάσης γεωργικών υπολειμμάτων. Πτυχιακή Μελέτη, Γ.Π.Α., Αθήνα.

Κοτσερίδης Γ. (2006). Οινολογία Ι, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις Γ.Π.Α., Αθήνα.

Τζάμος Ε. (2004). Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

Φιλίππου Α. (2003). Βιοτεχνολογία Καλλιέργειας Εδώδιμων και Φαρμακευτικών Μανιταριών σε Λιγνοκυτταρινούχα Υποστρώματα. Έκδοση ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε - Ινστιτούτο Γεωργικών Μηχανών και Κατασκευών, Αθήνα, σελίδες 30.