

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ *Morchella* sp. ΣΕ

ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΜΠΕΣΚΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗΣ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2024

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑ *Morchella sp.* ΣΕ

ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΥΓΡΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Παπαδάκη Αικατερίνη

Κοψαχείλης Νικόλαος

Καχριμανίδου Βασιλική

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία είχε σκοπό τη μελέτη δύο μακρομυκήτων του γένους *Morchella* sp. για την παραγωγή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε ζυμώσεις υγρής κατάστασης. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά υποστρώματα και διερευνήθηκαν οι προοπτικές αξιοποίησης των στεμφύλων οиноποιίας μέσω της ανάπτυξης των μυκήτων *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4. Ειδικότερα, τα δύο στελέχη *Morchella* αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα γλυκόζης, φρουκτόζης και σε εκχύλισμα από στέμφυλα οиноποιίας. Η αξιολόγηση των δύο μυκήτων περιλάμβανε τον προσδιορισμό της ξηρής μυκηλιακής μάζας και των ενδοπολυσακχαριτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη αυτά μπορούν να αναπτυχθούν στα συνθετικά υποστρώματα παράγοντας μέγιστη τιμή βιομάζας έως και 8 g/L. Μεταξύ των δύο στελεχών στο υπόστρωμα στεμφύλων μεγαλύτερη τιμή βιομάζας πέτυχε η *Morchella dunalii* 4 με συγκέντρωση 3,8 g/L. Σε ό,τι αφορά τα ξηρά εκχυλίσματα των ενδοπολυσακχαριτών, οι αποδόσεις έφτασαν έως και 45,2% (g/100 g ξηρής βιομάζας), ενώ παρατηρήθηκε ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξανόταν η απόδοση του εκχυλίσματος των ενδοπολυσακχαριτών. Περαιτέρω μελέτη των ενδοπολυσακχαριτών έδειξε ότι έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ωφέλιμων γαλακτικών βακτηρίων. Συνοψίζοντας, η παρούσα πτυχιακή εργασία έδειξε ότι είδη του γένους *Morchella* μπορούν να αναπτυχθούν σε παραπροϊόντα τροφίμων και να παράγουν μεταβολικά προϊόντα, όπως οι ενδοπολυσακχαρίτες, με πιθανές βιολειτουργικές ιδιότητες.

ABSTRACT

The present work aimed to study two macromycetes of the genus *Morchella* sp. in submerged fermentations and evaluate the production of biomass and intracellular polysaccharides. Specifically, two synthetic substrates were used, and the potential utilization of grape pomace was investigated using the strains *Morchella dunalii* 2 and *Morchella dunalii* 4. In particular, the *Morchella* strains were cultivated in glucose, fructose and grape pomace extract. The evaluation of the two fungi included the determination of dry mycelial mass and intracellular polysaccharides. The results showed that these strains can grow on synthetic substrates, producing a maximum biomass value of up to 8 g/L. Among the two strains, *Morchella dunalii* 4 achieved the highest biomass production of 3.8 g/L when grape pomace extract was used as the fermentation substrate. As far as concern the intracellular polysaccharides dry extracts, the maximum yield was 45.2% (g/100 g dry biomass). It was also noticed that the yield of the intracellular polysaccharide dry extracts was increased during fermentation. Further study of the intracellular polysaccharides highlighted their antioxidant activity, whereas they could serve as growth substrate of lactic acid bacteria. In summary, the present study demonstrated that species of the genus *Morchella* can be cultivated on substrates made from food by-products and produce metabolic products, such as intracellular polysaccharides, with potential functional properties.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Μύκητες.....	1
1.1.2. Φαρμακευτικά μανιτάρια.....	2
1.2. Ο μακρομύκητας <i>Morchella</i>	5
1.2.1 Βιολογικός κύκλος	6
1.2.2 Μορφολογία του μύκητα <i>Morchella</i> sp.....	8
1.2.3 Παραγωγή και εμπορική αξία εδώδιμων μυκήτων.....	9
1.3. Ζυμώσεις με χρήση φαρμακευτικών μυκήτων.....	10
1.4. Αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα και αξιοποίησή τους.....	10
1.4.1 Τα στέμφυλα οινοποιίας ως αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα	11
1.4.2 Παραγωγή μανιταριών από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα	13
1.5. Πολυσακχαρίτες ως βιοδραστικά μόρια	13
1.5.1 Πολυσακχαρίτες του μακρομύκητα <i>Morchella</i> sp	14
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	16
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
3.1 Μικροοργανισμοί και θρεπτικά μέσα.....	17
3.1.1 Βιολογικό υλικό	17
3.1.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας	17
3.1.3 Παρασκευή και εμβολιασμός προκαλλιιεργειών	17
3.2 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης των <i>Morchella</i> sp. σε στερεή καλλιέργεια.....	18
3.3 Ζύμωση υγρής κατάστασης σε συνθετικά υποστρώματα.....	18
3.4 Ζύμωση υγρής κατάστασης σε εκχύλισμα από στέμφυλα οινοποιίας	19
3.5 Αναλυτικές μέθοδοι	20
3.5.1 Προσδιορισμός pH	20
3.5.2 Προσδιορισμός βιομάζας.....	20
3.5.3 Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων κατά τη ζύμωση.....	21
3.5.4 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων	22
3.5.3 Εκχύλιση της βιομάζας για παραλαβή ενδοπολυσακχαριτών.....	24
3.5.4 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με τη μέθοδο Lowry.....	25
3.5.5 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με τη μέθοδο Dubois.....	26
3.5.8 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενδοπολυσακχαριτών	27

3.5.9 Επίδραση ενδοπολυσακχαριτών στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων	29
3.5.10 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με FTIR	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
4.1 Μελέτη μυκηλιακής αύξησης σε στερεή καλλιέργεια SSF	32
4.2 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικά υποστρώματα	34
4.2.1 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	34
4.2.2 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης.....	37
4.3 Μελέτη παραγωγής βιομάζας σε υπόστρωμα από στέμφυλα οινοποιίας	40
4.4 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών	44
4.4.1 Προσδιορισμός σύστασης εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών σε σάκχαρα.....	46
4.4.2 Προσδιορισμός σύστασης εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών σε πρωτεΐνες	48
4.4.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών	49
4.4.3 Προσδιορισμός πολυσακχαριτών με FTIR.....	51
4.5 Μελέτη επίδρασης ενδοπολυσακχαριτών στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων	52
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	55
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συστατικά συνθετικών υποστρωμάτων με γλυκόζη ή φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα.....	18
Πίνακας 2: Σύσταση υποστρώματος για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων.....	30
Πίνακας 3: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες <i>Morchella dunalii</i> 2 και 4 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	45
Πίνακας 4: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες <i>Morchella dunalii</i> 2 και 4 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης.....	45
Πίνακας 5: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες <i>Morchella dunalii</i> 2 και <i>Morchella dunalii</i> 4 σε υπόστρωμα στεμφύλων οиноποιίας.....	45

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη Lowry.....	25
Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη Dubois.....	27
Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη DPPH εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox.....	28
Γράφημα 4: Ανάπτυξη μυκηλίου του μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 2 σε τριβλίο petri που περιέχει συνθετικό υπόστρωμα PDA.....	33
Γράφημα 5: Ανάπτυξη μυκηλίου του μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 4 σε τριβλίο petri που περιέχει συνθετικό υπόστρωμα PDA.....	33
Γράφημα 6: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunalii</i> 4 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	35
Γράφημα 7: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunali</i> 2 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.....	36
Γράφημα 8: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunalii</i> 4 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης.....	38
Γράφημα 9: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunalii</i> 2 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης.....	39
Γράφημα 10: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunalii</i> 4 σε υπόστρωμα στεμφύλων.....	41
Γράφημα 11: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της <i>Morchella dunalii</i> 2 σε υπόστρωμα στεμφύλων.....	42
Γράφημα 12: Κατανάλωση σακχάρων (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) κατά τη ζύμωση του στελέχους <i>Morchella dunalii</i> 4 σε υπόστρωμα εκχυλίσματος στεμφύλων.....	43
Γράφημα 13: Κατανάλωση σακχάρων (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) κατά τη ζύμωση του στελέχους <i>Morchella dunalii</i> 2 σε υπόστρωμα εκχυλίσματος στεμφύλων.....	44

Γράφημα 14: Σύσταση σε σάκχαρα ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	47
Γράφημα 15: Σύσταση σε σάκχαρα ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	47
Γράφημα 16: Σύσταση σε πρωτεΐνη ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	48
Γράφημα 17: Σύσταση σε πρωτεΐνη ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	49
Γράφημα 18: Σύσταση σε ισοδύναμα trolox ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	50
Γράφημα 19: Σύσταση σε ισοδύναμα trolox ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα <i>Morchella dunalii</i> 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.....	50
Γράφημα 20: Προσδιορισμός πολυσακχαριτών με FTIR στη <i>Morchella dunalii</i> 2...	51
Γράφημα 21: Ανάπτυξη των γαλατικών βακτηρίων <i>L.rhamnosus</i> GG και <i>L. Plantarum</i> F_162 από την κατανάλωση ενδοπολυσακχαριτών.....	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Χαρακτηριστικά των μανιταριών.....	2
Εικόνα 2: <i>Lentinula edodes</i> (Σπαντίδος, 2015).....	3
Εικόνα 3: <i>Ganoderma lucidum</i> (Σπαντίδος, 2015).....	3
Εικόνα 4: <i>Pleurotus ostreatus</i> (Σπαντίδος, 2015).....	4
Εικόνα 5: <i>Trametes versicolor</i>	4
Εικόνα 6: Ο μακρομύκητας <i>Morchella</i> sp. (Zhang et al., 2023).....	5
Εικόνα 7: Τα χαρακτηριστικά του μακρομύκητα <i>Morchella</i> sp.....	6
Εικόνα 8: Βιολογικός κύκλος του μακρομύκητα <i>Morchella</i> sp. (Ower 1982)..	7
Εικόνα 9: <i>Morchella</i> sp.....	9
Εικόνα 10: Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος από στέμφυλα οиноποιίας.	20
Εικόνα 11: Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης- HPLC.....	22
Εικόνα 12: Μέθοδος FAN σε δείγμα ζύμωσης.....	23
Εικόνα 13: Φασματοφωτόμετρο.....	23
Εικόνα 14: Λυοφιλοποιητής.....	24
Εικόνα 15: Εκχυλίσματα ενδοπολυσακχαριτών μετά τη λυοφιλίωση.....	24
Εικόνα 16: Μέθοδος DPPH στα εκχυλίσματα ενδοπολυσακχαριτών.....	29
Εικόνα 17: Μικροπλάκα 96 θέσεων.....	30
Εικόνα 18: Φωτόμετρο μικροπλακών.....	30
Εικόνα 19: Φασματοφωτόμετρο FTIR.....	31

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

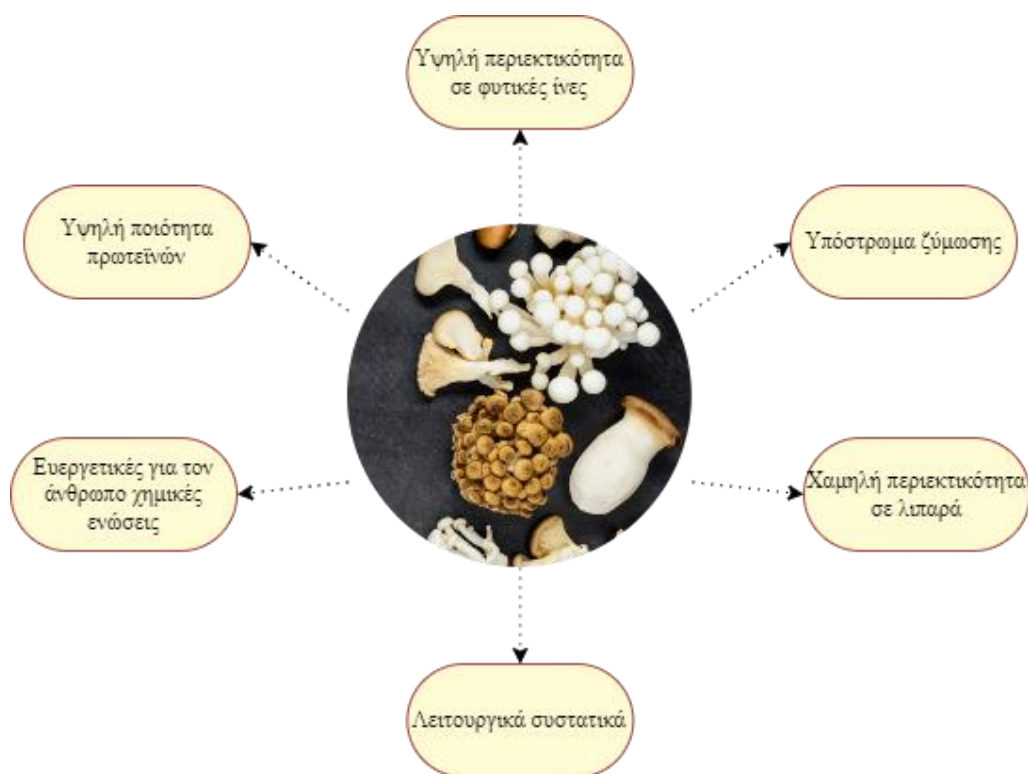
1.1. Μύκητες

Οι μύκητες θεωρούνται η δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα οργανισμών, μετά τα έντομα, στη βιόσφαιρα. Τα μανιτάρια είναι μύκητες και συνιστούν τις μεγαλύτερες ομάδες οργανισμών στον κόσμο και θα μπορούσαν να προσομοιάζουν τα άνθη και τους καρπούς ενός φυτού (Μαρδίτσα, 2015). Μερικά μανιτάρια φαίνονται μόνο με μικροσκόπιο, καθώς είναι πολύ μικρά και εμφανίζονται σε διάφορα χρώματα, μεγέθη, σχήματα και σε πολλά είδη.

Τα μανιτάρια, παράγουν διοξείδιο του άνθρακα και καταναλώνουν οξυγόνο, δεν έχουν χλωροφύλλη και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να εξαρτώνται από τα πράσινα φυτά, τα οποία φωτοσυνθέτουν και παράγουν τροφή και για αυτά. Τα μανιτάρια έχουν υφές οι οποίες συνήθως δεν είναι ορατές μακροσκοπικά και είναι ένα τμήμα με το οποίο το μανιτάρι απορροφά τις θρεπτικές ουσίες που χρειάζεται.

Τα μανιτάρια ξεκίνησαν να καλλιεργούνται στα τέλη του 17^{ου} αιώνα στη Γαλλία. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια διαδόθηκε και σε άλλες χώρες όπως, Αγγλία, Γερμανία, Δανία, Η.Π.Α και Ιταλία. Το μυκήλιο με τη σημερινή του μορφή, εμφανίστηκε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Στην αρχή, τα μανιτάρια καλλιεργούνταν στην ύπαιθρο ενώ σήμερα η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικά κτίσματα με κατάλληλα μέσα και θερμοκρασία. Ο αριθμός των μανιταριών ανέρχεται σε 75.000 με 100.000 είδη εκ των οποίων τα 2.000 είναι εδώδιμα. Στην Ελλάδα υπάρχουν 2.500 είδη μυκήτων από τα οποία τα 900 είναι μανιτάρια (Μαρδίτσα, 2015). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, περίπου 10,2 εκατομμύρια τόνοι μανιταριών (και τρούφας) παρήχθησαν στον κόσμο το 2017.

Τα μανιτάρια έχουν πολλά διατροφικά πλεονεκτήματα όπως, χαμηλή θερμιδική αξία, υψηλή περιεκτικότητα σε ίνες και πρωτεΐνες και απουσία χοληστερόλης (Εικόνα 1). Πέραν της διατροφικής τους αξίας, αρκετά είδη μανιταριών έχουν περιγραφεί ότι διαθέτουν φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστικά τωνμανιταριών

1.1.2. Φαρμακευτικάμανιτάρια

Σύμφωνα με το National Cancer Institute: Τα φαρμακευτικάμανιτάρια είναιμανιτάρια που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων, πνευμονικών παθήσεων ακόμα και του καρκίνου (Medicinal Mushrooms PDQ). Είναι γνωστό ότι τα φαρμακευτικάμανιτάρια έχουν ανοσορρυθμιστική δράση, ρυθμίζουν δηλαδή το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε αυτό να λειτουργεί μέσα στα φυσιολογικά όρια. Ταμανιτάρια έχουν αντιβακτηριδιακά, αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη χαρακτηριστικά, ενώ ακόμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την καταπολέμηση της άνοιας. Επίσης, έχουν αντιακές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές και αντιδιαβητικές ιδιότητες. (Zipora et al., 2018).

Στην Ελλάδα η καλλιέργεια φαρμακευτικώνμανιταριών ξεκίνησε το 2006. Για κάποια συγκεκριμένα είδη, πολύ διαδεδομένη είναι η καλλιέργειά τους πάνω σε κορμούς δέντρων. Τα φαρμακευτικάμανιτάρια μπορούν να χαρακτηριστούν και πηγή διατροφολογικών ουσιών (Μαρδίτσα, 2015). Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπληρώματα διατροφής ή λειτουργικά τρόφιμα (Ulrike Lindequist et al., 2014). Για παράδειγμα, κατά την παρασκευή ψωμιού το 5% του αλευριού σίτου

αντικαταστάθηκε με σκόνη από μυκήλιο μανιταριών και παρατηρήθηκε πως μετά το ψήσιμο το ψωμί με το μυκήλιο περιείχε μεγάλες ποσότητες γ-αμινι-βουτυρικού οξέος και εργοθειονίνης που το καθιστά ωφέλιμο για την υγεία (Ulziijargal et al., 2013).

Σε αυτήν την ενότητα περιγράφονται κάποια είδη φαρμακευτικών μανιταριών.

- ***Lentinula edodes*** (Εικόνα 2): έχει αντικαρκινική, ανοσοδιεγερτική, αντιμικροβιακή και υποχοληστερινική δράση.



Εικόνα 2: *Lentinula edodes* (Σπαντίδος, 2015)

- ***Ganoderma lucidum*** (Εικόνα 3): πρόκειται για ένα μη εδώδιμο φαρμακευτικό μανιτάρι, αλλά το εκχύλισμά του είναι πλούσιο σε βιοδραστικά συστατικά. Θεωρείται το γηραιότερο και το πιο γνωστό μανιτάρι, καθώς χρησιμοποιείται χιλιάδες χρόνια για τις ευεργετικές του ιδιότητες στην υγεία. Χρησιμοποιείται κυρίως κατά της αϋπνίας, σε ψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές.



Εικόνα 3: *Ganoderma lucidum* (Σπαντίδος, 2015)

- ***Pleurotus ostreatus*** (Εικόνα 4): πρόκειται για ένα μανιτάρι από το οποίο έχει απομονωθεί αντικαρκινική ουσία. Πέραν τούτου, θεωρείται εδώδιμο και με αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες.



Εικόνα 4: *Pleurotus ostreatus* (Σπαντίδος, 2015)

- ***Trametes versicolor*** (Εικόνα 5): από το συγκεκριμένο μανιτάρι εκκρίνεται η κρεστίνη, η οποία είναι γνωστή για την αντικαρκινική της δράση.



Εικόνα 5: *Trametes versicolor*

- ***Morchella*** (Εικόνα 6): Οι μακρομύκητες του γένους *Morchella sp.* είναι εδώδιμοι με ιδιαίτερη κι ευχάριστη γεύση. Οι πολυσακχαρίτες του *Morchella sp.* έχουν προσελκύσει ευρεία προσοχή λόγω της σημαντικής βιοδραστικότητάς τους (Zhang et al., 2023).

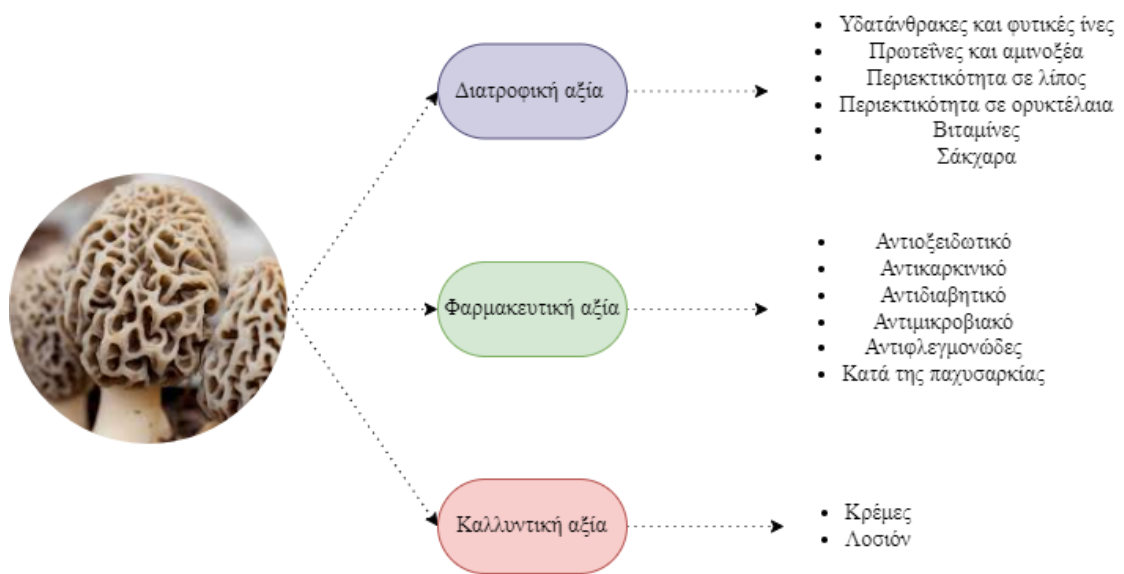


Εικόνα 6: Ο μακρομύκητας *Morchella* sp. (Zhang et al., 2023)

1.2. Ο μακρομύκητας *Morchella*

Ο *Morchella* sp. είναι μύκητας της οικογένειας *Morchellaceae* και του γένους *Morchella*. Ο πύλος είναι σχεδόν σφαιρικός, ωοειδής έως ελλειπτικός, ύψους έως 10 cm, και αμβλύς στρογγυλεμένος στην κορυφή, ενώ στην επιφάνεια υπάρχουν κοιλότητες που μοιάζουν με κοιλιά. Χαρακτηρίζονται από ένα μοναδικό κωνικό κεφάλι, με κυψελοειδή εμφάνιση, που προκύπτει από ένα δίκτυο κορυφογραμμών που συνθέτουν το καπάκι τους (Zirora et al., 2018). Το χρώμα των κοιλοτήτων κυμαίνεται από ανοιχτό καφέ έως κιτρινωπό καφέ. Το χρώμα των πλευρών είναι πιο ανοιχτό, ο μίσχος είναι, σχεδόν λευκός, κοίλος και κυλινδρικός. Ο σπόρος είναι επιμήκης, άχρωμος, η κορυφή του πλευρικού νήματος είναι διευρυμένη, το σώμα είναι ελαφρύ και η ποιότητα είναι τραγανή.

Ο μύκητας *Morchella* sp. είναι ευρέως διαδεδομένο στην Κίνα, την Ινδία, τη Γαλλία, τη Γερμανία, τις Ηνωμένες Πολιτείες και σποραδικά διαδεδομένο στη Ρωσία, τη Σουηδία, το Μεξικό, την Ισπανία, την Τσεχοσλοβακία και σε τμήματα του Πακιστάν. Μεταξύ αυτών, ο *Morchella* sp. είναι ευρέως διαδεδομένος στην Κίνα και συχνά θεωρείται μύκητας διπλής χρήσης με την ίδια προέλευση ως φάρμακο και τρόφιμο (Εικόνα 7), λόγω της μοναδικής γεύσης και της πλούσιας διατροφικής του αξίας. Σήμερα, χρησιμοποιείται ως φάρμακο -τρόφιμο και ως λειτουργικό τρόφιμο, λόγω των βιοδραστικών του ιδιοτήτων (Zirora et al., 2018). Ως βιοδραστικά συστατικά εννοούμε εκείνα τα συστατικά που έχουν επίδραση, προκαλούν αντίδραση στο ζωντανό ιστό. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές ανάλογα με την ουσία, τη δόση και τη βιοδιαθεσιμότητα (Guaadaoui et al., 2014).



Εικόνα 7: Τα χαρακτηριστικά του μακρομύκητα *Morchella sp.*

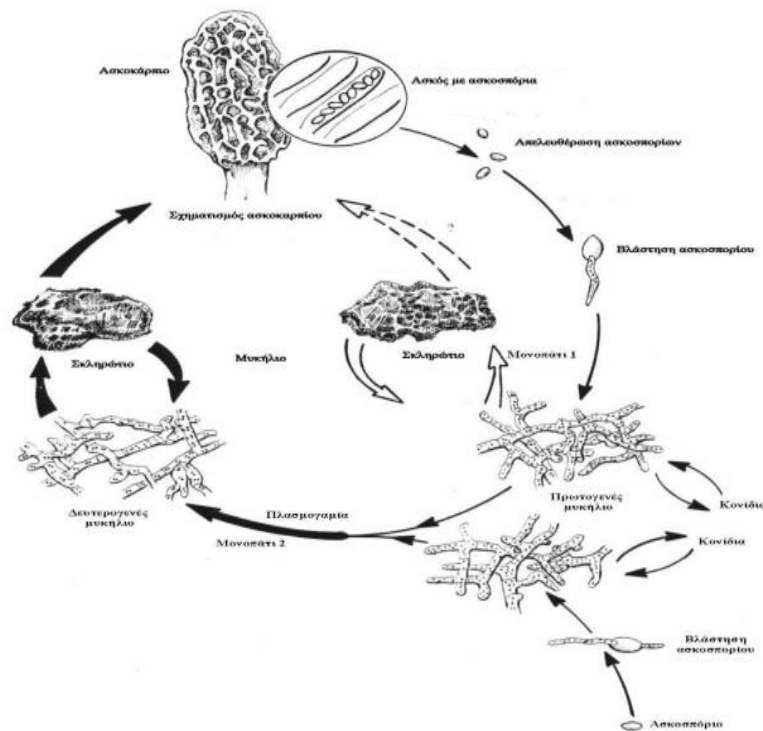
Επιπλέον, πολλά είδη διαδραματίζουν σημαντικό οικολογικό ρόλο μέσω της συμβιωτικής τους σχέσης με τα δέντρα, επιτρέποντάς τους να αναπτύσσονται σε εδάφη με διαφορετικά θρεπτικά συστατικά. Ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες όπως η Ινδία, το εισόδημα από τους άγριους βρώσιμους μύκητες αποτελεί σημαντική πηγή αγροτικού εισοδήματος. Εκτός από αυτό, οι βρώσιμοι μύκητες, αποτελούν σημαντική πηγή διατροφής. Οι μορχέλες είναι μανιτάρια που εμφανίζονται τόσο σε δάση κωνοφόρων όσο και σε εύκρατα δάση πλατύφυλλων. Όλα τα είδη είναι βρώσιμα και γευστικά, με εξαίρεση τις τρούφες: 18 είδη *Morchella sp.* έχουν αναφερθεί από 28 χώρες, συνολικά 14 ως βρώσιμα και πέντε ως φαρμακευτικά.

1.2.1 Βιολογικός κύκλος

Οι μακρομύκητες μπορούν να αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς. Τα εγγενή σπόρια έχουν στον πυρήνα τους μόνο ένα αντίγραφο από το κάθε χρωμόσωμα. Από την άλλη τα αγενή σπόρια έχουν δύο αντίγραφα. Αγενής αναπαραγωγή μπορεί να επιτευχθεί με τμήμα μυκηλίου ή συσσωματώματα υφών, τα οποία ονομάζονται σκληρώτια (Εικόνα 8).

Υπάρχουν δύο πιθανές διαδρομές στον κύκλο ζωής του μύκητα *Morchella* μετά τη βλαστική ανάπτυξη και το σχηματισμό πρωτογενούς μυκηλίου. (Ower, 1982; Volk and Leonard, 1990). Οι δύο αυτές διαδρομές διαφέρουν κυρίως στο σημείο στο οποίο λαμβάνει χώρα η πλασμογαμία (ένωση υφών).

Το μονοπάτι 1 οδηγεί απευθείας, χωρίς πλασμογαμία, από το πρωτογενές μυκήλιο έως το σχηματισμό σκληρωτίου, όταν οι συνθήκες (π.χ. έλλειψη υγρασίας, δυσμενής θερμοκρασία) δεν ευνοούν την περαιτέρω βλαστική ανάπτυξη. Η επαγωγή αυτή από δυσμενείς συνθήκες δεν είναι το αποκλειστικό ερέθισμα, καθώς τα σκληρώτια μπορούν να αναπτύσσονται επίσης ως απόκριση σε ορισμένα θρεπτικά συστατικά. Ωστόσο, όποια και αν είναι η κινητήρια δύναμη, μόλις γίνει η δέσμευση για την έναρξη της ανάπτυξης του σκληρωτίου, το αναπτυσσόμενο τμήμα του πρωτογενούς μυκηλίου στρογγυλεύει και σχηματίζει τα παχιά, σκουρόχρωμα τοιχώματα που είναι χαρακτηριστικά του σκληρωτίου (Volk and Leonard, 1990).



Εικόνα 8: Βιολογικός κύκλος του μακρομύκητα *Morchella* sp. (Ower 1982).

Αυτά τα πρωτογενή σκληρώτια, με κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες την άνοιξη μπορούν να βλαστήσουν για να σχηματίσουν εγγενείς καρποφορίες. Διαφορετικά, το σκληρώτιο βλαστάνει δίνοντας νέο πρωτογενές μυκήλιο (Μ. Δεδουση., 2020).

Εάν υπάρχει αλληλεπίδραση με άλλο συμβατό πρωτογενές μυκήλιο, μπορεί να ακολουθήσει η διαδρομή 2. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν οι υφές δύο γενετικά διαφορετικών μυκηλίων αλληλεπιδρούν, μπορεί να προκύψουν ετεροκαρυωτικές υφές. Εάν οι συνθήκες γίνουν δυσμενείς για περαιτέρω ανάπτυξη, οι ετεροκαρυωτικές υφές μπορεί να σχηματίσουν ένα ετεροκαρυωτικό σκληρώτιο μορφολογικά παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιείται για την διαχείριση στη φύση (Volk and Leonard., 1990).

Έτσι την επόμενη άνοιξη, το μυκήλιο που θα προκύψει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες έχει 2 επιλογές:

- Μυκηλιογενή βλάστηση, η οποία αναγεννά ένα δευτερογενές μυκήλιο
- Καρπογενή βλάστηση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό καρποφόρων σωμάτων.

1.2.2 Μορφολογία του μύκητα *Morchella* sp.

Τα ασκοκάρπια έχουν σπογγώδη ή κυψελωτή εμφάνιση. Σε αυτή συμβάλλουν οι διαμήκεις και εγκάρσιες πτυχώσεις του. Οι κυψέλες έχουν δαιδαλώδη ή πολυγωνική μορφή. Σε κάποια είδη των μυκήτων αυτών, υπάρχουν πτυχώσεις που χωρίζουν τις κύριες κυψέλες σε δευτερεύουσες. Επίσης, οι μύκητες αυτοί έχουν ενιαία εσωτερική κοιλότητα πύλου και στίπου. Ο πύλος είναι εξωτερικά λείος και ο στύπος φέρει έντονες αναδιπλώσεις (Δεδούση, 2020).



Εικόνα 9: *Morchella* sp.

1.2.3 Παραγωγή και εμπορική αξία εδώδιμων μυκήτων

Οι άγριοι βρώσιμοι μύκητες συλλέγονται και καταναλώνονται από τον άνθρωπο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Αρχαιολογικά αρχεία δείχνουν ότι καταναλώνονταν από ανθρώπους που ζούσαν στη Χιλή πριν από 13.000 χρόνια. Η Κίνα κατέχει εξέχουσα θέση στις πρώιμες και όψιμες ιστορικές καταγραφές των άγριων εδώδιμων μυκήτων. Για αιώνες, πολλά είδη έχουν εκτιμηθεί στην Κίνα όχι μόνο για τη διατροφή και τη γεύση τους, αλλά και για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Αυτές οι αξίες και οι παραδόσεις είναι τόσο ισχυρές σήμερα όσο και πριν από αιώνες, όπως αποδεικνύεται από τη μεγάλη ποικιλία άγριων μυκήτων που συλλέγονται από τα δάση και τους αγρούς και διατίθενται ευρέως στην αγορά. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η Κίνα είναι σήμερα ο μεγαλύτερος εξαγωγέας καλλιεργούμενων μανιταριών. Εκτός από σημαντική πηγή τροφής, πολλά είδη μανιταριών χρησιμοποιούνται ευρέως ως φάρμακα. Έτσι, τα άγρια μανιτάρια συμβάλλουν στη διατροφή, το εισόδημα και την ανθρώπινη υγεία.

Η καλλιέργεια μανιταριών στην Ελλάδα ξεκίνησε γύρω στο 1960 από καλλιεργητές με ελάχιστη ή καθόλου γεωπονική ή γεωργική εκπαίδευση. Η παραγωγή ήταν 100 kg/ημέρα- το σύστημα αυτό υιοθετήθηκε το 1972. Στη συνέχεια, η παραγωγή αυξήθηκε με επιτυχία στα 500 kg/ημέρα. Η πρώτη συστηματική μονάδα στο κράτος εμφανίστηκε το 1972 στην περιοχή Ακράτα Αχαΐας, με παραγωγή 150 kg/ημέρα. Μετά από μια ταχεία αύξηση, η ετήσια παραγωγή μανιταριών στη χώρα έφτασε στο επίπεδο των 1.200 τόνων ετησίως το 1985 και έκτοτε παρέμεινε σε μεγάλο βαθμό

σταθερή. (Μπιατικέα, 2015). Σύμφωνα με την έρευνα των Malone et al. (2022) οι μακρομύκητες *Morchella* sp. πωλούνται από πιστοποιημένους τροφοσυλλέκτες 36 δολάρια ανά λίβρα (\$36/lb) για φρέσκες μαύρες ή κίτρινες μορχέλες.

1.3. Ζυμώσεις με χρήση φαρμακευτικών μυκήτων

Μικροοργανισμοί από την ομάδα ζυμομυκήτων, βακτηρίων και μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές ζυμώσεις με σκοπό την χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Για παράδειγμα, ο μύκητας *Trametes versicolor* έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για την ιατρική, τη φαρμακευτική και τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των θρεπτικών ιδιοτήτων του.

Σε ένα πείραμα, ο μύκητας χρησιμοποιήθηκε για τη βιολογική επεξεργασία των στεμφύλων (grape pomace) για 15 ημέρες για την ανάπτυξη σταθερών συνθηκών ζύμωσης με στόχο τη βελτίωση της εκχυλισιμότητας των φαινολικών ενώσεων και της θρεπτικής αξίας των στεμφύλων. Ως εμβόλιο, χρησιμοποιήθηκε μυκήλιο που είχε καλλιεργηθεί σε λιγνοκυτταρινούχα υλικά. Η χρήση των στεμφύλων ως υπόστρωμα σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης με *T. versicolor* οδήγησε στην ανάπτυξη μίας τεχνικής για την απελευθέρωση συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων από τη λιγνοκυτταρινούχα δομή, δηλαδή για τη βελτίωση του προφίλ των βιοδραστικών ουσιών και για τη γενική βελτίωση των θρεπτικών και λειτουργικών ιδιοτήτων (αύξηση της περιεκτικότητας σε ανόργανα άλατα, τέφρα, πρωτεΐνες και λίπος) των βιολογικά επεξεργασμένων στεμφύλων (Šelo et al., 2024).

1.4. Αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα και αξιοποίησή τους

Καθώς, η ζήτηση για τρόφιμα αυξάνεται συνεχώς καθώς ο πληθυσμός της γης αυξάνεται ραγδαία. Ως εκ τούτου, στις περισσότερες χώρες, διαφορετικές βιομηχανίες τροφίμων και ποτών έχουν αναπτυχθεί σημαντικά προκειμένου να καλύψουν τη ζήτηση τροφίμων. Το αποτέλεσμα της αυξημένης βιομηχανικής δραστηριότητας οδηγεί αναπόφευκτα στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων και παραπροϊόντων. Αυτή η τεράστια ποσότητα υπολειμμάτων αν εναποτίθενται στο περιβάλλον, χωρίς κατάλληλη προεπεξεργασία, μπορούν να

προκαλέσουν περιβαλλοντική ρύπανση και επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (Sadh et al., 2018).

Υπάρχουν δύο είδη αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, τα γεωργικά υπολείμματα και τα βιομηχανικά υπολείμματα. Τα γεωργικά υπολείμματα μπορούν να χωριστούν σε υπολείμματα αγρού και υπολείμματα επεξεργασίας. Τα υπολείμματα του αγρού είναι υπολείμματα που υπάρχουν στα χωράφια μετά τη διαδικασία συγκομιδής των καλλιεργειών, ενώ τα υπολείμματα επεξεργασίας είναι υπολείμματα που παραμένουν ακόμη και μετά την επεξεργασία των καλλιεργειών. Οι βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων όπως οι χυμοί, τα πατατάκια, το κρέας, τα γλυκά και τα φρούτα παράγουν μεγάλες ποσότητες παραπροϊόντων κάθε χρόνο.

Τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα ή υπολείμματα που προκύπτουν από τις διάφορες βιομηχανίες επεξεργασίας πρώτων υλών είναι πλούσια σε θρεπτική συστατικά και βιοδραστικές ενώσεις. Αυτά τα απόβλητα περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, σάκχαρα και μέταλλα. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά, αυτά τα υπολείμματα δεν περιγράφονται ως «απόβλητα» αλλά μπορούν να θεωρηθούν πρώτες ύλες για τη σύνθεση και την ανάπτυξη άλλων προϊόντων. Η διαθεσιμότητα αυτών των θρεπτικών συστατικών στις πρώτες ύλες παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να επαναχρησιμοποιήσουν τις πρώτες ύλες μέσω διαδικασιών ζύμωσης για την παραγωγή διαφορετικών ευεργετικών προϊόντων (Sadh et al., 2018).

1.4.1 Τα στέμφυλα οινοποιίας ως αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τις δυνατότητες χρήσης αγροτοβιομηχανικών υποπροϊόντων για την καλλιέργεια μανιταριών, όπως φλοιοί καφέ, αναποφλοιώτο άχυρο, άχυρο ρυζιού, άχυρο σίτου, απορρίμματα βαμβακιού και άλλα. Η παραγωγή οίνου αποτελεί πρωταρχικό γεωργικό τομέα με την ετήσια παγκόσμια παραγωγή να εκτιμάται σε 282 εκατομμύρια εκατόλιτρα το 2018. Η διαδικασία παραγωγής κρασιού, από το χωράφι μέχρι το τελικό προϊόν, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τόσο υγρών όσο και στερεών υποπροϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των μίσχων σταφυλιών, των στεμφύλων και της οινολάσπης. Τα στέμφυλα των σταφυλιών αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του συνολικού βάρους των αρχικών σταφυλιών

που μεταποιούνται για την παραγωγή οίνου (Papadaki et al., 2019). Η αξιοποίηση των στεμφύλων σταφυλιού είναι ένα επίκαιρο θέμα, όχι μόνο στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στις βιομηχανίες καλλυντικών, βιοϊατρικής και φαρμακευτικών προϊόντων (Šelo et al., 2024).

Τα στέμφυλα αποτελούν λιγνοκυτταρινούχο υλικό που περιέχει συμπιεσμένους φλοιούς σπόρους και πολτό, συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών στην περίπτωση της ερυθρής οινοποίησης. Μπορεί να προβλεφθεί ετήσια παγκόσμια δυναμικότητα 10,5-13,1 εκατομμυρίων τόνων στέμφυλου, λαμβάνοντας υπόψη ότι 6 λίτρα κρασιού συνεπάγονται 1 κιλό στεμφύλων. Ως εκ τούτου, αναπτύσσονται διάφορες στρατηγικές για την αξιοποίηση του πυρηνελαίου σταφυλιών ως υλικό χαμηλού κόστους, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αιθανόλης και βιοαιθανόλης, της αναερόβιας χώνευσης και της κομποστοποίησης, της εκχύλισης πολυφαινολών, των ζωοτροφών και της τροποποίησης του εδάφους. Ο πυρήνας σταφυλιών έχει επίσης αξιολογηθεί σε ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Επίσης, τα απόβλητα οινοποιείων και αμπελώνων χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια μανιταριών σε ζυμώσεις τόσο στερεής όσο και υγρής κατάστασης για την εκτίμηση της ανάπτυξης μυκηλίων και της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες. Ακόμη, έρευνες γίνονται και για την μετατροπή των στεμφύλων σε συστατικά υψηλής αξίας (π.χ. μανιτάρια, ένζυμα και πολυσακχαρίτες) μέσω της βιοτεχνολογικής οδού. Ομοίως, αυτές οι ενώσεις μπορούν να βρουν εφαρμογές στην επεξεργασία τροφίμων και να συμπεριληφθούν ξανά στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων. Επίσης, σύμφωνα με τις στρατηγικές της κυκλικής οικονομίας, είναι πλέον υψίστης σημασίας η αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και υποπροϊόντων για την προώθηση βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον λύσεων που θα παράγουν διαφοροποιημένα τελικά προϊόντα που μπορούν να εισέλθουν ξανά στη βιομηχανία τροφίμων (Papadaki et al., 2019). Η βιολογική επεξεργασία των στεμφύλων μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την προώθηση της αειφορίας στην αμπελουργία και την οινοποίηση, μειώνοντας έτσι τα απόβλητα και δημιουργώντας πρόσθετη οικονομική αξία από υποπροϊόντα που διαφορετικά θα ήταν περιττά ή προβληματικά (Šelo et al., 2024).

1.4.2 Παραγωγή μανιταριών από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα

Το μανιτάρι χρησιμοποιείται είτε ως τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες είτε ως εργαλείο βιοαποκατάστασης. Αναπτύσσονται δηλαδή τεχνολογίες που επικεντρώνονται στη χρήση βιολογικών μεθόδων για την επεξεργασία των αποβλήτων. Μια τέτοια μέθοδος βασίζεται στη χρήση των μανιταριών για την απομάκρυνση των αποβλήτων από το περιβάλλον. Τα μανιτάρια και άλλοι μύκητες διαθέτουν ενζυμικό μηχανισμό για την αποδόμηση των αποβλήτων και των ρύπων (Kulshreshtha et al., 2014). Τα αγροτοβιομηχανικά λιγνοκυτταρινούχα απόβλητα και υπολείμματα χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια εδώδιμων μυκήτων με ελεγχόμενο τρόπο. Το περιβαλλοντικό πρόβλημα με τα υπολείμματα γεωργικής προέλευσης μπορεί να επιλυθεί με την παραγωγή μανιταριών με ελεγχόμενο τρόπο χρησιμοποιώντας αυτά τα απόβλητα ως πρώτη ύλη. Η παραγωγή μανιταριών λειτουργεί ως μέθοδος βιοτεχνολογίας για την αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων

Η σύνθεση των περισσότερων μανιταριών αποτελείται από πρωτεΐνες, ίνες, λιπίδια, και υδατάνθρακες. Ακόμη και μανιτάρια ίδιου γένους μπορεί να έχουν διαφορετικές τροφικές συνθέσεις σε σύγκριση μεταξύ τους. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι όλα τα παραγόμενα μανιτάρια ήταν πλούσια σε πρωτεΐνες (Sadh et al., 2018) .

Επιπρόσθετα, τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα ρεύματα μπορούν να μετατραπούν, μέσω της καλλιέργειας μανιταριών, σε διάφορες βιοδραστικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών και των ενζύμων. Έτσι, η χρήση γεωργικών αποβλήτων και αποβλήτων γεωργικής βιομηχανίας ως πρώτων υλών μπορεί να συμβάλει στη μείωση του κόστους παραγωγής και στην επαναχρησιμοποίηση των αποβλήτων, και στην παραγωγή νέων προϊόντων.

1.5. Πολυσακχαρίτες ως βιοδραστικά μόρια

Οι πολυσακχαρίτες είναι επίσης ένα από τα σημαντικότερα βιοδραστικά συστατικά του *Morchella sp.* (Zhang et al., 2023) και έχουν συνδεθεί με θετικές επιδράσεις στην υγεία. Σήμερα υπάρχουν μελέτες που απομονώνουν και χαρακτηρίζουν αυτούς τους πολυσακχαρίτες (Tietel et al., 2018).

Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται βιομηχανικά ως πηκτικοί παράγοντες και σταθεροποιητές σε προϊόντα διατροφής. Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για

τις βιολογικές λειτουργίες τους, όπως αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές ή πρεβιοτικές δραστηριότητες. Η παραγωγή πολυσακχαριτών κατανέμεται εκτενώς μεταξύ των μυκήτων. Έχουν διαφορετικές λειτουργίες όταν οι μύκητες αναπτύσσονται σε φυσικά υποστρώματα. Οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στους πολυσακχαρίτες που παράγονται από εδώδιμα και φαρμακευτικά μανιτάρια λόγω των ποικίλων βιολογικών και φαρμακολογικών δραστηριοτήτων τους. Αυτές περιλαμβάνουν ανοσοδιεγερτικές, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές, αντιαλλεργικές, αντιοξειδωτικές και υπογλυκαιμικές δραστηριότητες. Αρκετά μανιτάρια χαρακτηρίζονται ως πηγή διαφορετικών βιοδραστικών πολυσακχαριτών. Οι περισσότερες από αυτές είναι ομογλυκάνες και μερικές είναι ετερογλυκάνες, αν και μπορούν επίσης να βρεθούν σε συνδυασμό με πρωτεΐνες, σχηματίζοντας πεπτιδογλυκάνες ή σύμπλοκα πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών (πρωτεογλυκάνες) (Sánchez Ó. ,et all 2020).

1.5.1 Πολυσακχαρίτες του μακρομύκητα *Morchella* sp

Οι πολυσακχαρίτες του μακρομύκητα *Morchella* sp. έχουν ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, κυρίως ανοσορρυθμιστική δράση, αντικαρκινική δράση και αντιοξειδωτική δράση, μεταξύ άλλων. Η παρουσίαση αυτών των βιοδραστικοτήτων συνδέεται στενά με την ποικιλομορφία των δομών τους. Επομένως, για να ληφθούν οι πολυσακχαρίτες με διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες, πολλές μελέτες έχουν υιοθετήσει διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, μεθόδους καθαρισμού και μεθόδους χημικής δομικής τροποποίησης (καρβοξυλομάδες, υδροξυλίου, ακετυλίου και θειικού άλατος) για τη λήψη πολυσακχαριτών με διαφορετικές μοριακές δομές. Οι βιολογικές δραστηριότητες των πολυσακχαριτών εξαρτώνται από τη δομή τους και η μέθοδος εκχύλισης είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δομή των πολυσακχαριτών. Οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης πολυσακχαριτών περιλαμβάνουν κυρίως εκχύλιση με ζεστό νερό (HWE, hot water extraction), HWE και αλκαλική εκχύλιση, αλλά αυτές οι μέθοδοι έχουν τα μειονεκτήματα του χαμηλού ρυθμού εκχύλισης, της χρονοβόρας και περιβαλλοντικής ρύπανσης. Ως εκ τούτου, ορισμένες νέες τεχνικές εκχύλισης εφαρμόζονται σταδιακά στη διαδικασία εκχύλισης πολυσακχαριτών, όπως η εκχύλιση με υπερήχους, η εκχύλιση μικροκυμάτων και η εκχύλιση εξαιρετικά υψηλής πίεσης. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν υιοθετήσει πολυτεχνικούς συνδυασμούς για την περαιτέρω βελτίωση του

ρυθμού εκχύλισης και των βιολογικών δραστηριοτήτων των πολυσακχαριτών, όπως η ενζυμική εκχύλιση με υπερήχους, η ενζυμική εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων, η ενζυμική εκχύλιση με υψηλή πίεση καθώς και η εκχύλιση με υπερήχους-μικροκυμάτων.

Η διαδικασία εκχύλισης των πολυσακχαριτών *Morchella sp.* αποτελείται γενικά από τα ακόλουθα βήματα. Πρώτον, οι πρώτες ύλες πρέπει να απολυμανθούν και να αποχρωματιστούν ανάλογα με την κατάσταση. Δεύτερον, οι σκόνες των πρώτων υλών εξάγονται υπό ορισμένες θερμοκρασίες, αναλογίες υλικού-υγρού και άλλες ειδικές συνθήκες και το υπερκείμενο υγρό συμπυκνώνεται μετά τη φυγοκέντρωση. Το τελικό στάδιο είναι να προστεθεί 3 φορές ο όγκος αιθανόλης 95 % στο υπερκείμενο υγρό και, στη συνέχεια, να φυγοκεντρηθεί, να αποπρωτεϊνιστεί, να διαλυθεί και να λυοφιλοποιηθεί για να ληφθεί ακατέργαστος πολυσακχαρίτης (Zhang et al., 2023).

Η μέθοδος εκχύλισης με ζεστό νερό είναι η πιο κοινή μέθοδος για την εξαγωγή πολυσακχαριτών. Εκτός αυτού, η αλκαλική εκχύλιση είναι επίσης μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως στην εκχύλιση των πολυσακχαριτών *Morchella sp.* Για να μην υπάρχουν ελλείψεις από την εκχύλιση με ζεστό νερό υπάρχουν νέες τεχνικές εκχύλισης των πολυσακχαριτών του *Morchella sp.* . Μεταξύ αυτών, η παραγωγή ζύμωσης είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στην εκχύλιση πολυσακχαριτών *Morchella sp.* Σε σύγκριση με τους πολυσακχαρίτες από καρποφόρα σώματα και τα μυκήλια του *Morchella sp.* , ο εξωπολυσακχαρίτης (EPS) από το υγρό της ζύμωσης λαμβάνεται ευκολότερα . Η παραγωγή πολυσακχαριτών με ζύμωση υγρής κατάστασης μπορεί όχι μόνο να μειώσει το κόστος αλλά και να πραγματοποιήσει τον εμπλουτισμό των πολυσακχαριτών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, το επίπεδο των ακατέργαστων πολυσακχαριτών απέχει πολύ από το να είναι επαρκές μετά την κανονική διαδικασία εκχύλισης. Για να ληφθεί η λεπτή δομή των πολυσακχαριτών, απαιτείται περαιτέρω διαδικασία καθαρισμού . Η διαδικασία καθαρισμού των πολυσακχαριτών χωρίζεται σε τρία στάδια. Πρώτον, ο ακατέργαστος πολυσακχαρίτης υποβάλλεται σε επεξεργασία αποπρωτεΐνωσης και αποχρωματισμού. Στη συνέχεια, ο πολυσακχαρίτης κλασματοποιείται με χρωματογραφία στήλης και τέλος ένας ομοιόμορφος καθαρός πολυσακχαρίτης λαμβάνεται μέσω των σταδίων συγκέντρωσης, διάλυσης και λυοφιλίωσης (Zhang et al., 2023).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη μελέτησε την παραγωγή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών από δύο είδη μακρομυκήτων *Morchella*, τη *Morchella dunalii* 4 και τη *Morchella dunalii* 2. Οι ζυμώσεις έγιναν αρχικά σε συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης και σε επόμενο στάδιο και σε υπόστρωμα από στέμφυλα οиноποιίας. Σκοπός της εργασίας ήταν:

- Η αξιοποίηση των στεμφύλων οиноποιίας ως υπόστρωμα σε ζυμώσεις υγρής κατάστασης.
- Η αξιολόγηση της καταλληλότητας του υποστρώματος για την παραγωγή βιομάζας και βιοδραστικών ουσιών από τους μύκητες *Morchella* sp.
- Η συγκριτική αξιολόγηση των μυκήτων *Morchella dunalii* 4 και *Morchella dunalii* 2 μέσω της εκτίμησης της παραγωγής βιομάζας και των ενδοπολυσακχαριτών
- Ο χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών που ανακτήθηκαν από τη βιομάζα, ως προς τη σύσταση και τις πιθανές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Μικροοργανισμοί και θρεπτικά μέσα

3.1.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η καλλιέργεια δύο ειδών του μύκητα *Morchella dunalii*. Τα στελέχη είναι κατατεθειμένα στην τράπεζα μικροοργανισμών που βρίσκεται στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Στην ίδια συλλογή καλλιεργειών ανήκει και το στέλεχος γαλακτικού βακτηρίου *Lactiplantibacillus plantarum* F_162 ενώ το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* GG που χρησιμοποιήθηκε, βρίσκεται στη συλλογή του εργαστηρίου κατόπιν ευγενικής παραχώρησης από τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Κουρκουτά του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης.

Η διατήρηση των μυκήτων γίνεται σε τρυβλία petri τα οποία περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA), σε σωλήνες (slants) με PDA και παραφινέλαιο στο ψυγείο, αλλά και σε αποστειρωμένα κρυοφιαλίδια (cryovials) με απιονισμένο νερό (dH₂O) στο ψυγείο ή σε αποστειρωμένα cryovials με 30% γλυκερόλη στην κατάψυξη. Αντίστοιχα τα γαλακτικά βακτήρια φυλάσσονται σε cryovials τα οποία περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα De Man Rogosa and Sharpe MRS, εμπλουτισμένο με 20% γλυκερόλη.

3.1.2 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις κλειστού τύπου εντός κωνικών φιαλών, όγκου 100 mL, πληρωμένες με 30 mL από τρία θρεπτικά μέσα. Για της ζυμώσεις αυτές, παρασκευάστηκαν δύο συνθετικά υποστρώματα, με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα, ενώ στη συνέχεια μελετήθηκε και η χρήση εκχυλίσματος στερεών αποβλήτων οиноποίησης (στέμφυλα).

3.1.3 Παρασκευή και εμβολιασμός προκαλλιιεργειών

Όπως αναφέρθηκε, τα στελέχη του μακρομύκητα *Morchella dunalii* μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, φυλάσσονται σε στερεές καλλιέργειες οι οποίες επιτρέπουν τη συντήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτές οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή προκαλλιιεργειών υγρής κατάστασης

χρησιμοποιώντας ένα κομμάτι από την στερεή καλλιέργεια (agar plug). Συγκεκριμένα, από την στερεή καλλιέργεια έγινε χρήση τρυβλίων petri με θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Το θρεπτικό υπόστρωμα ζυγίστηκε στα απαιτούμενα γραμμάρια και τοποθετήθηκε σε μια Durant, αναδεύτηκε για να διαλυθεί πλήρως σε H₂O και στη συνέχεια αποστειρώθηκε. Μετά την αποστείρωση, με τη βοήθεια λύχνου, απλώθηκε στα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες. Ύστερα από την πήξη του θρεπτικού υποστρώματος, ακολούθησε εμβολιασμός από τα επιθυμητά στελέχη.

Πριν από την κάθε καλλιέργεια γίνεται μια ανανέωση των μυκήτων σε τρυβλίο Petri. Αρχικά, χρησιμοποιείται ένας μεταλλικός σωλήνας ο οποίος με τον οποίο λαμβάνεται εμβόλιο (agar plug) διαμέτρου 6 mm. Το εμβόλιο τοποθετείται στο κέντρο ενός νέου τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα PDA και ακολουθεί επώαση στους 26 °C.

3.2 Προσδιορισμός μυκηλιακής ανάπτυξης των *Morchella* sp. σε στερεή καλλιέργεια

Για την μελέτη της κινητικής ανάπτυξης του μύκητα, εμβολιάστηκαν τρυβλία Petri με τη *Morchella dunalii* 2 και 4. Στη συνέχεια, επώαστηκαν και κάθε μέρα με ένα χάρακα μετρούνταν η ανάπτυξή του, στον άξονα x και y, μέχρι να έχει αναπτυχθεί και να καλύψει πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου.

3.3 Ζύμωση υγρής κατάστασης σε συνθετικά υποστρώματα

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης. Και στις δύο περιπτώσεις, το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε σε τιμή 6,2 και ο συνολικός όγκος στα 500 mL. Στη συνέχεια, Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με 2 agar plugs διαμέτρου 2 mm εντός κωνικών φιαλών όγκου 100 mL, πληρωμένες με 30 mL από τα συνθετικά θρεπτικά μέσα. Χρειάστηκαν 16 κωνικές φιάλες, σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 2 κωνικές και η δειγματοληψία γινόταν ανά 2 ημέρες. Η ζύμωση ήταν στατική και οι κωνικές επώαζονταν στους 26 °C. Κύρια πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη και η φρουκτόζη αντίστοιχα. Επιπλέον, προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), πεπτόνη, καθαρό ανθρακικό ασβέστιο σε σκόνη και μίγμα αλάτων.

Πίνακας 1: Συστατικά συνθετικών υποστρωμάτων με γλυκόζη ή φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα.

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/ 500 mL)
Γλυκόζη ή Φρουκτόζη	5,26
Εκχύλισμα ζύμης	1,25
Πεπτόνη	1,75
Ανθρακικό ασβέστιο	1,0

3.4 Ζύμωση υγρής κατάστασης σε εκχύλισμα από στέμφυλα οινοποιίας

Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν στερεά απόβλητα οινοποίησης (στέμφυλα) (grape pomace), τα οποία προέκυψαν από την ερυθρή οινοποίηση σταφυλιών τοπικής ποικιλίας της Κεφαλονιάς (Μαυροδάφνη). Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε υγρή ζύμωση των μυκήτων στα υπολείμματα στεμφύλων. Για τη διεργασία εκχύλισης των ελεύθερων σακχάρων ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- 1) Μετά την παραλαβή τους τα στέμφυλα, τα οποία φυλάσσονται στην κατάψυξη. Μετά την απόψυξή τους ακολούθησε ξήρανση στους 80 °C
- 2) Στη συνέχεια σε αναλογία 1:4 (ξηρά στέμφυλα: νερό) αναδεύτηκαν με το νερό και πραγματοποιήθηκε θέρμανση στους 50 °C για 1 ώρα (Εικόνα 10) και κατόπιν απομάκρυνση των στερεών με διήθηση έγινε μέσω ηθμού Whatman No 1.

Στη συνέχεια, διορθώθηκε το pH, για την διεξαγωγή του πειράματος της ζύμωσης, σε 6.2. Το υγρό υπόστρωμα που παρασκευάζεται έχει αρχικό pH 3.4. Για την αλλαγή του pH χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOH 0.1 M. Ακολούθησε πλήρωση των κωνικών όγκου 100 mL με 30 mL υποστρώματος, οι οποίες στη συνέχεια αποστειρώθηκαν (121 °C/ 15 min). Τέλος, μετά την αποστείρωση και με ασηπτικές συνθήκες, η κάθε κωνική φιάλη εμβολιάστηκε με 2 agar plugs και τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο στους 26 °C.



Εικόνα 10: : Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος από στέμφυλα οиноποιίας.

3.5 Αναλυτικές μέθοδοι

Η πορεία της ζύμωσης στις καλλιέργειες των τριών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη προσδιορίστηκε με την μέτρηση του pH, τη συλλογή και τον προσδιορισμό της βιομάζας, τον προσδιορισμό της κατανάλωσης των σακχάρων, καθώς και τον προσδιορισμό αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων. Η ανάλυση της χημικής σύστασης των παραγόμενων από τη βιομάζα ενδοπολυσακχαριτών έγινε με φωτομετρικές μεθόδους όπως μέτρηση των ολικών σακχάρων με Dubois και ολικού περιεχομένου πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DPPH.

3.5.1 Προσδιορισμός pH

Το pH που απαιτείται για την εκπόνηση του πειράματος είναι 6,2 πριν στην έναρξη της ζύμωσης. Στο τέλος της κάθε καλλιέργειας μετρήθηκε το pH στο υγρό της κάθε κωνικής φιάλης. Το τελικό pH μετρήθηκε με τη βοήθεια οργάνου μέτρησης Electronic pHmeter.

3.5.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Η μυκηλική μάζα συλλέχτηκε με διήθηση υπό κενό, σε χοάνη Buhner, χρησιμοποιώντας ηθμό Whatman No 2, με σκοπό το διαχωρισμό της από το θρεπτικό

μέσο της καλλιέργειας. Το υγρό θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας αποθηκεύτηκε σε συνθήκες κατάψυξης ενώ το νωπό μυκήλιο, αφού εκπλύθηκε και με H_2O , μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα βαζάκια και ξηράνθηκε στους $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι απόκτησης σταθερού βάρους. Μετά τη ξήρανση, καταγράφηκε το βάρος τους σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα φιαλίδια τύπου McCartney. Τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν σε κάθε δειγματοληψία.

3.5.3 Προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων κατά τη ζύμωση

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Liquid Pressure Chromatography) HPLC είναι μια μέθοδος υγρής χρωματογραφίας με την οποία μεταξύ άλλων μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση σακχάρων σε κάποιο δείγμα και κατά συνέπεια να προσδιοριστεί και η πορεία της ζύμωσης αναφορικά με την κατανάλωση των σακχάρων. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η κινητή υγρή φάση, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης, περνάει μέσα από μια στήλη που περιέχει τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή ενωμένη χημικά με στερεό υπόστρωμα.

Αρχικά, για να ξεκινήσει η διαδικασία ανοίχτηκε η HPLC (Εικόνα 11) και ρυθμίστηκαν οι παράμετροι λειτουργίας. Στη συνέχεια, ανοίχτηκε η κυψελίδα αναφοράς του ανιχνευτή και αφέθηκε για κάποια λεπτά να γεμίσει με την κινητή φάση. Κατόπιν, έκλεισε, μηδενίστηκε η ένδειξη του ανιχνευτή και αφέθηκε μέχρι να σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσης. Λήφθηκε δείγμα από το υγρό της ζύμωσης για κάθε προγραμματισμένη μέρα δειγματοληψίας, για να προσδιοριστεί ο ακριβής αριθμός σακχάρων. Έγιναν 2 επαναλήψεις σε κάθε μέτρηση. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων, τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα και ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα H_2SO_4 10 mM. Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρα σύριγγας $0,2\text{ }\mu\text{m}$ μπήκαν σε vials και τοποθετήθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη. Τέλος, λήφθηκαν τα χρωματογραφήματα για κάθε δείγμα που αναλύθηκε και μετρήθηκε το εμβαδόν της κορυφής για να δώσει ακριβές αποτέλεσμα.



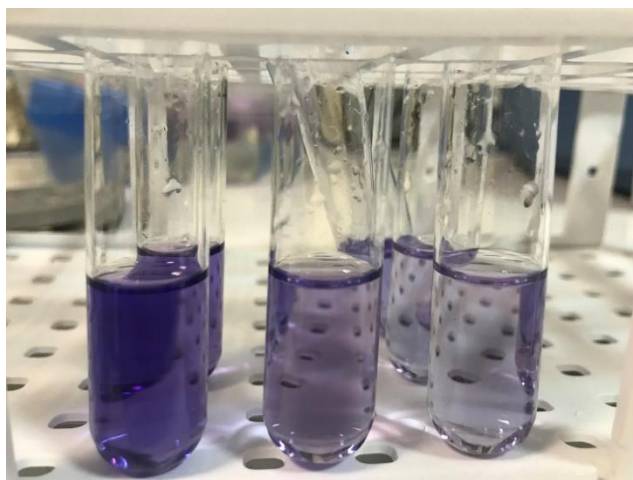
Εικόνα 11: Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης- HPLC

3.5.4 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αζώτου και των ελεύθερων αμινομάδων είναι η φωτομετρική μέθοδος της νυνιδρίνης. Παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent), το οποίο αποτελείται από 49,71g φωσφορικού οξέος $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g νυνιδρίνη, 3 g φρουκτόζη και 60 g KH_2PO_4 (Δισόξινο φωσφορικό κάλιο), τα οποία διαλύθηκαν σε 1 L απιονισμένου νερού. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του αντιδραστηρίου το pH του πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 6,6 και 6,8. Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύτηκε σε σκούρο μπουκάλι Duran και μπήκε στο ψυγείο σε θερμοκρασία συντήρησης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα δεύτερο αντιδραστήριο το οποίο ονομάζεται αντιδραστήριο αραιώσης (Dilution reagent). Αυτό αποτελείται από 2 g KIO_3 (Ιωδιούχο κάλιο), διαλυμένο σε 500 mL H_2O και 384 mL καθαρής αιθανόλης. Αναδεύτηκε και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. Παρασκευάστηκαν πρότυπο διάλυμα γλυκίνης για την πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm. Η συγκέντρωση σε γλυκίνη σε σχέση με την

απορρόφηση εκφράζεται ισοδύναμα με την εξίσωση $y=3,5479x-0,0477$, όπου y η συγκέντρωση γλυκίνης σε mg/L και x η απορρόφηση σε nm.

Σε κάθε γυάλινο σωληνάκι τοποθετήθηκαν 1mL αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (Color reagent). Αναδεύτηκαν στη συσκευή Vortex και στη συνέχεια μπήκαν για βρασμό στους 100 °C για 16 min. Έπειτα, αφέθηκαν να κρύνουν σε νερό με πάγο για 20 min. Μόλις κρύνωσαν, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (Dilution reagent) και αναδεύτηκε για 20 sec (Εικόνα 12). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στο φασματοφωτόμετρο στα 570 nm (Εικόνα 13). Για το τυφλό, χρησιμοποιήθηκε στη θέση του δείγματος απιονισμένο νερό και ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία.



Εικόνα 12: Μέθοδος FAN σε δείγμα ζύμωσης.



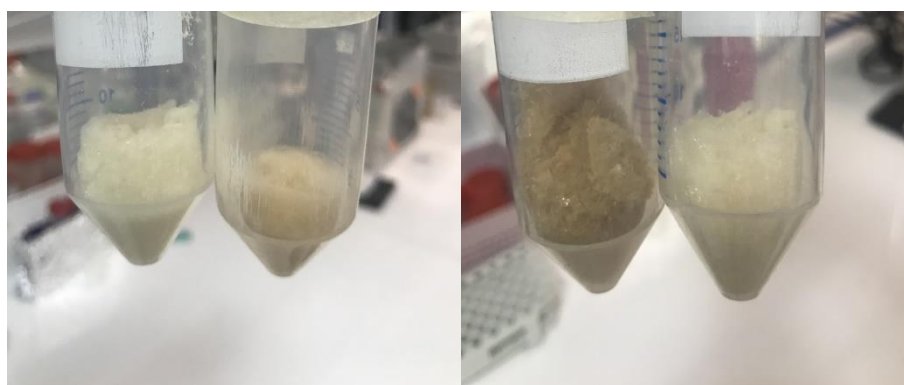
Εικόνα 13: Φασματοφωτόμετρο

3.5.3 Εκχύλιση της βιομάζας για παραλαβή ενδοπολυσακχαριτών

Σε προζυγισμένα φιαλίδια τοποθετήθηκαν 0,2 g της ξηρής βιομάζας με 10 mL H₂O και τοποθετήθηκαν για βρασμό για 10 min. Για να διαχωριστεί το στερεό από το υγρό εκχύλισμα, τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 20 min σε 4.000 rpm στους 10 °C. Μετά τη φυγοκέντριση, συλλέχθηκε προσεκτικά το υγρό εκχύλισμα. Μετά από αυτή τη διαδικασία, πραγματοποιήθηκε και 2^η εκχύλιση με ακριβώς τον ίδιο τρόπο. Τα εκχυλίσματα λυοφιλώθηκαν (Εικόνες 14 και 15) και ακολούθησε η καταγραφή του ξηρού εκχυλίσματος της βιομάζας στον ζυγό ακριβείας. Με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης απομακρύνεται η υγρασία του υγρού εκχυλίσματος χωρίς να υποβαθμίζεται η βιολογική της αξία από την επίδραση της θερμότητας που θα απαιτούταν σε άλλες μεθόδους ξήρανσης. Τα g ξηρού εκχυλίσματος αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια, για να χρησιμοποιηθούν σε άλλες μετρήσεις.



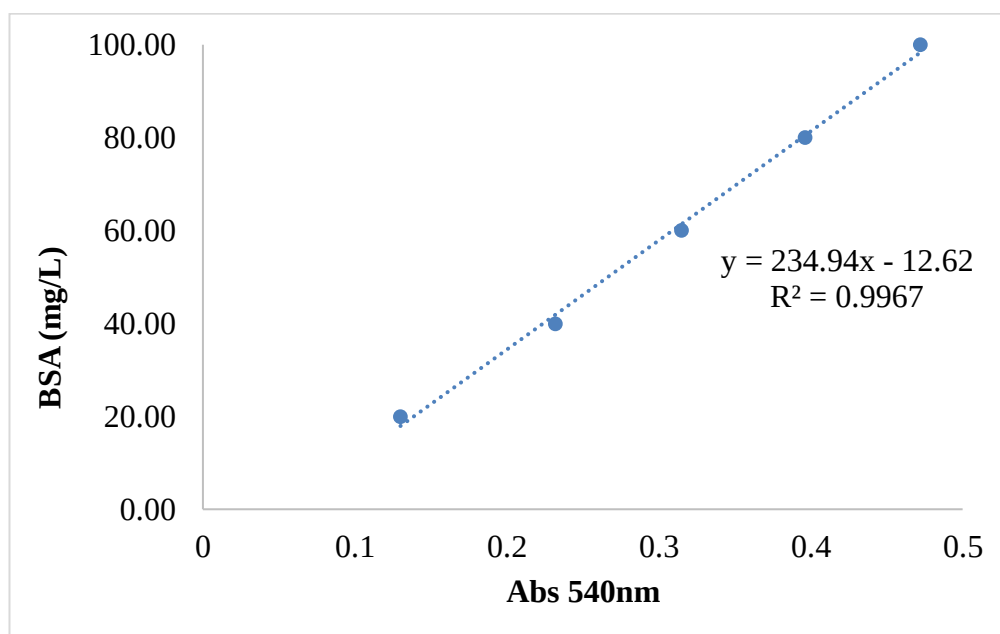
Εικόνα 14: Λυοφιλοποιητής



Εικόνα 15: Εκχυλίσματα ενδοπολυσακχαριτών μετά τη λυοφιλίωση.

3.5.4 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με τη μέθοδο Lowry

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στο λυοφιλιωμένο εκχύλισμα βιομάζας ακολουθήθηκε η φωτομετρική μέθοδος Lowry. Για την πρότυπη καμπύλη, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine serum albumin- αλβουμίνη ορού βοός) σε συγκεντρώσεις 5-100 mg/L για τον προσδιορισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 540nm. Η συγκέντρωση σε BSA σε σχέση με την απορρόφηση εκφράζεται ισοδύναμα με την εξίσωση $y=234,94x-12,62$, όπου y η συγκέντρωση του BSA σε mg/L και x η απορρόφηση στα 540nm.



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη Lowry.

Λήφθηκαν 20 mg λυοφιλιωμένου δείγματος από κάθε καλλιέργεια και με τα 3 θρεπτικά υποστρώματα, στο οποίο προστέθηκε 1mL H₂O. Για να ομογενοποιηθούν αναδεύτηκαν για μερικά λεπτά στη συσκευή Vortex. Για τη διεξαγωγή της μεθόδου χρειάστηκε να παρασκευαστούν στο εργαστήριο 3 αντιδραστήρια, τα οποία ενώθηκαν και έφτιαξαν ένα διάλυμα. Αυτά είναι:

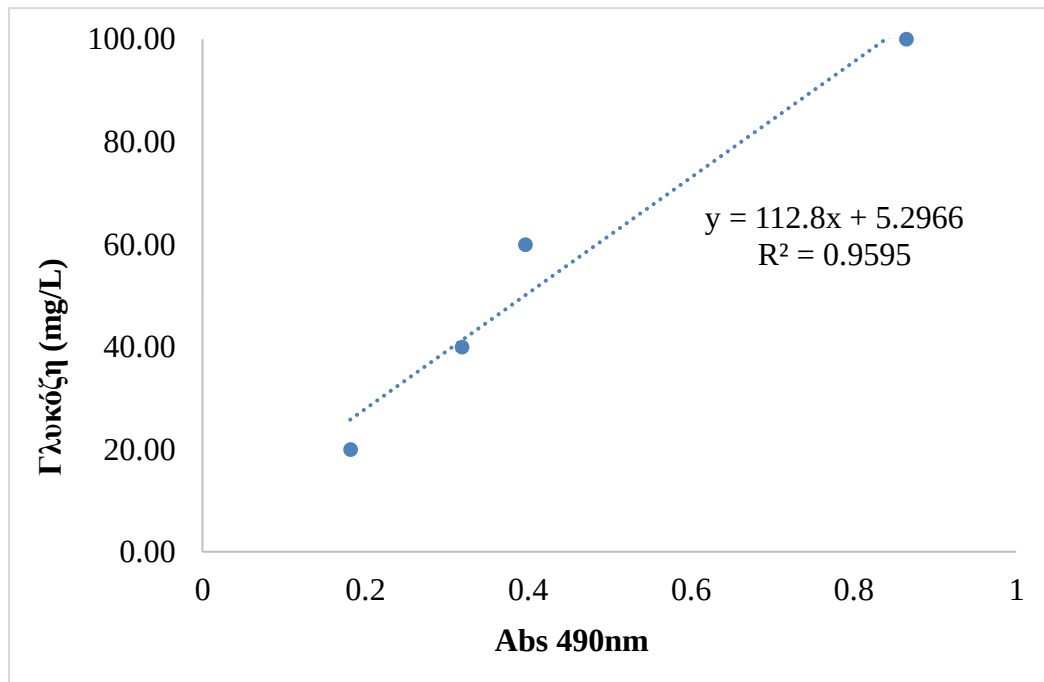
- Na₂CO₃ (ανθρακικό νάτριο) 2% (w/v) 0,1 M
- CuSO₄ (θειικός χαλκός) 1% (w/v) σε H₂O
- KNaC₄H₄O₆*4H₂O (τρυγικό καλιονάτριο) 2% (w/v) σε H₂O

Για την παρασκευή του τελικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν σε αναλογία 100:1:1 τα παραπάνω διαλύματα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu 1 N. Έγιναν 2 επαναλήψεις για κάθε μέτρηση με τα δείγματα να έχουν αραιωθεί κατάλληλα. Η μέθοδος έγινε σε γυάλινα σωληνάκια. Αρχικά, στα σωληνάκια τοποθετήθηκαν 1mL από το αραιωμένο δείγμα και 1 mL από το τελικό διάλυμα και αναδεύτηκαν. Στη συνέχεια, αφέθηκαν για 10 min στο σκοτάδι και μετά προστέθηκαν 100 μ L από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Αναδεύτηκαν ξανά και τοποθετήθηκαν για 30 min στο σκοτάδι. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 540 nm. Για το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το αραιωμένο δείγμα αντικαταστάθηκε από ίση ποσότητα H_2O .

3.5.5 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με τη μέθοδο Dubois

Τα ολικά σάκχαρα για τον προσδιορισμό της σύστασης των εξωπολυσακχαριτών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Dubois. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή πως τα σάκχαρα, και τα παράγωγά τους, όταν επεξεργάζονται με φαινόλη και πυκνό θειικό οξύ δημιουργούν ένα πορτοκαλί-χρυσό χρώμα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι αρκετά ευαίσθητη και το χρώμα σταθερό (Toledo et. Al, 2012).

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 10 g/L και με αραιώσεις με H_2O , παρασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 490 nm. Η συγκέντρωση της γλυκόζης σε σχέση με την απορρόφηση εκφράζεται ισοδύναμα με την εξίσωση $y=112,8x+5,2966$, όπου y η συγκέντρωση της γλυκόζης σε mg/L και x η απορρόφηση στα 490 nm.



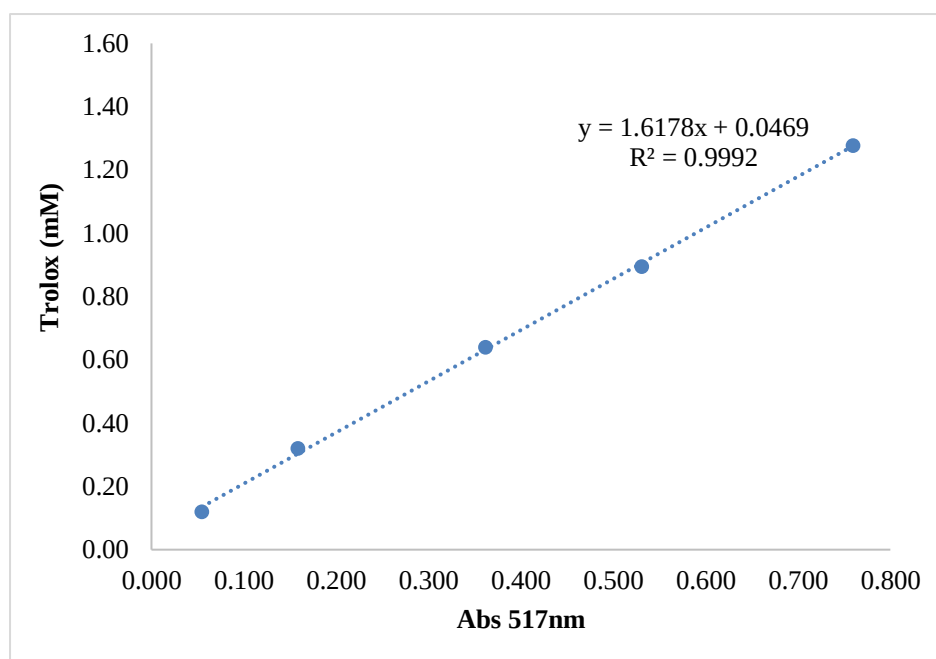
Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη Dubois

Λήφθηκαν 20 mg λυοφιλωμένου δείγματος εξωπολυσακχαριτών, στο οποίο προστέθηκε 1 mL H₂O. Η μέθοδος έγινε σε γυάλινα σωληνάκια, με 2 επαναλήψεις για κάθε δείγμα τα οποία είχαν προηγουμένως αραιωθεί κατάλληλα. Αρχικά, σε κάθε γυάλινο σωλήνα τοποθετήθηκε 1 mL από το αραιωμένο δείγμα, 1 mL διαλύματος φαινόλης 5% και 5 mL πυκνού θειικού οξέος 98%. Στη συνέχεια, αναδεύτηκε και αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, μετρήθηκε η απορρόφηση φασματοφωτομετρικά στα 490 nm. Για το τυφλό δείγμα ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία αντικαθιστώντας το δείγμα H₂O.

3.5.8 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενδοπολυσακχαριτών

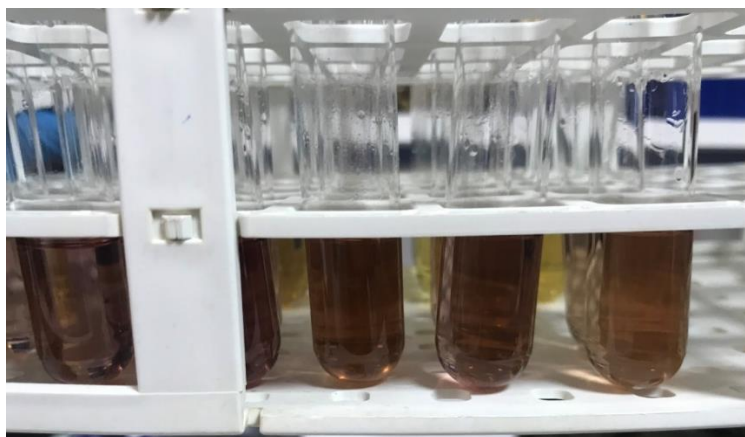
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων σχετίζεται με την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Το αντιδραστήριο του διαλύματος της DPPH παρασκευάζεται με μεθανόλη.

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα σε Trolox για την πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων. Οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 517nm. Η συγκέντρωση σε Trolox σε σχέση με την απορρόφηση εκφράζεται ισοδύναμα με την εξίσωση $y = 1,6178x + 0,0469$, όπου y η συγκέντρωση Trolox σε mM και x η απορρόφηση σε nm.



Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη DPPH εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox

Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων των εξωπολυσακχαριτών λήφθηκαν 20 mg λυοφιλωμένου δείγματος, στο οποίο προστέθηκε 1 mL H₂O. Η μέθοδος έγινε σε γυάλινα σωληνάκια, με 2 επαναλήψεις για κάθε μέτρηση και οι αραιώσεις έγιναν σε αναλογία 1:1. Σε κάθε γυάλινο σωληνάκι τοποθετήθηκαν 100 μL αραιωμένο δείγμα και 3,9 mL από το αντιδραστήριο DPPH. Αναδεύτηκαν καλά στη συσκευή Vortex και αφέθηκαν για 1h και 30 min στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της ώρας αυτής, αντίδραση έχει γίνει και θα μετρηθούν στο φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 16). Επειδή οι αντιοξειδωτικές μέθοδοι έχουν αρνητικό αποτέλεσμα, γιατί υπολογίζεται πόσο μπορεί να εξουδετερωθεί η βάση του DPPH από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, έχει μετρηθεί μόνο του το αντιδραστήριο. Αυτό συμβαίνει για να αφαιρεθεί μετά ο μέσος όρος των απορροφήσεων των δειγμάτων και να υπολογιστεί η απορρόφηση και στη συνέχεια η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Η αλλαγή στο χρώμα του αντιδραστηρίου είναι ενδεικτική και ανάλογη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος.



Εικόνα 16: Μέθοδος DPPH στα εκχυλίσματα ενδοπολυσακχαριτών

3.5.9 Επίδραση ενδοπολυσακχαριτών στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων

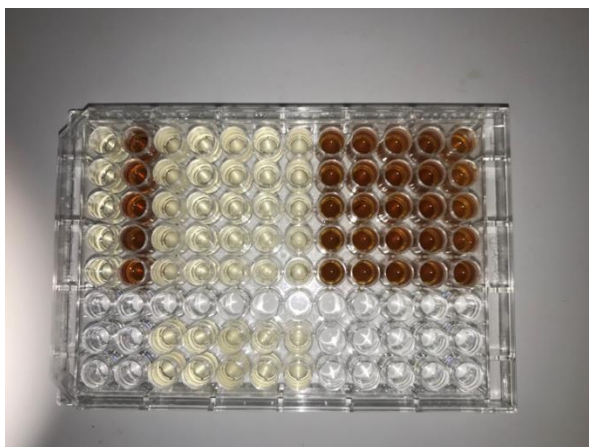
Το φωτόμετρο μικροπλακών χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων για ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε υπόστρωμα γλυκόζης (control) και σε υπόστρωμα ενδοπολυσακχαριτών. Σε ειδικά τρυβλία 96 βοθρίων τοποθετήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα M2 το οποίο ενδείκνυται για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Στα βοθρία αυτά προστέθηκε θρεπτικό υπόστρωμα M2 (Πίνακας 2), εμβολιάστηκαν με 2 βακτήρια του γένους *Lactobacillus* sp. και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τον έλεγχο της ανάπτυξης των στελεχών. Για τον έλεγχο επίδρασης των ενδοπολυσακχαριτών στην ανάπτυξη των βακτηρίων, στα υπόλοιπα βοθρία τοποθετήθηκε M2 με μοναδική πηγή άνθρακα το εκχύλισμα ενδοπολυσακχαριτών που προέκυψε από τη βιομάζα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο μικροπλακών (Εικόνα 17 και 18) κι επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες, ενώ ανά 15 min λαμβάνονταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε βοθρίου (600 nm) η οποία είναι ενδεικτική της μικροβιακής αύξησης.

Ως αρνητικοί δείκτες και για τον έλεγχο της καθαρότητας των υποστρωμάτων αλλά και για τη λήψη της αρχικής απορρόφησης χρησιμοποιήθηκαν βοθρία τα οποία περιείχαν μόνο το εκάστοτε υπόστρωμα.

Πίνακας 2: Σύσταση υποστρώματος για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων.

Θρεπτικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
--------------------	-------------------

Γλυκόζη (Glucose)	20
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	8
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammonium sulphate)	5
K ₂ HPO ₄ (Potassium phosphate dibasic)	1
MgSO ₄ 7H ₂ O (Magnesium sulphate)	0.3
C ₂ H ₃ NaO ₂ (Sodium acetate)	5



Εικόνα 17: Μικροπλάκα 96 θέσεων.



Εικόνα 18: Φωτόμετρο μικροπλακών

3.5.10 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών με FTIR

Ο χαρακτηρισμός του χημικού προφίλ του εκχυλίσματος των ενδοπολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική αντανάκλαση (ATR-FTIR). Στην φασματοσκοπία IR η ουσία προς ανάλυση απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στο φάσμα του IR, η απορρόφηση καταγράφεται από τον ανιχνευτή και αποδίδεται ως φάσμα της ουσίας. Στη φασματοφωτομετρία FTIR η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται υπό γωνία με διαφορετικό δείκτη διάθλασης.

Κατά την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν λυοφιλωμένα δείγματα εκχυλισμάτων τα οποία τοποθετήθηκαν σε στερεή κατάσταση στην επιφάνεια του κρυστάλλου του FTIR (Εικόνα 19). Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού του οργάνου. Τέλος, οι κορυφές του φάσματος ταυτοποιήθηκαν με βάση τον κυματαριθμό στον οποίο απορροφά ο κάθε χαρακτηριστικός δεσμός και συγκρίθηκε με τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 19: Φασματοφωτόμετρο FTIR

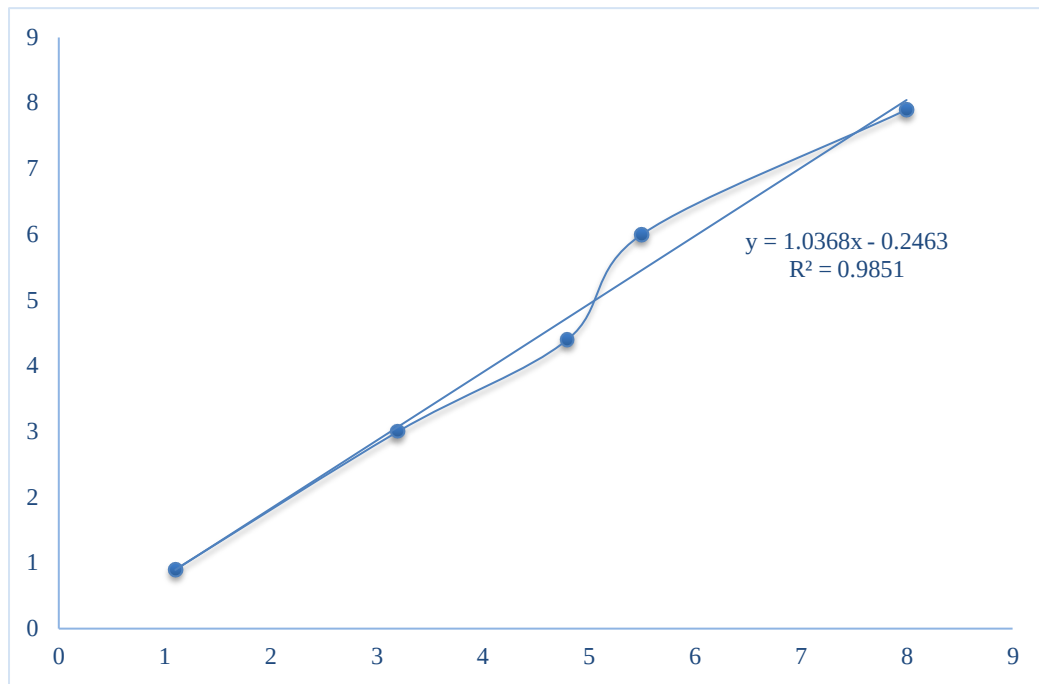
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη είχε ως στόχο την ανάπτυξη και τη μελέτη δύο μακρομυκήτων του γένους *Morchella*, *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4, σε υγρές καλλιέργειες. Οι ζυμώσεις αυτές έγιναν με τη χρήση τριών διαφορετικών υποστρωμάτων σε στατικές συνθήκες. Οι δύο μύκητες αναπτύχθηκαν σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης και σε υπόστρωμα από αγροτοβιομηχανικά υπολείμματα (στέμφυλα). Οι ζυμώσεις κλειστού τύπου πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες όγκου 100 ml, πληρωμένες με 30 ml θρεπτικού υποστρώματος σε θερμοκρασία 27 °C. Η διάρκεια της ζύμωσης για το συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης ήταν 6 ημέρες και για το συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης και το υπόστρωμα από αγροτοβιομηχανικά υπολείμματα ήταν 8 ημέρες.

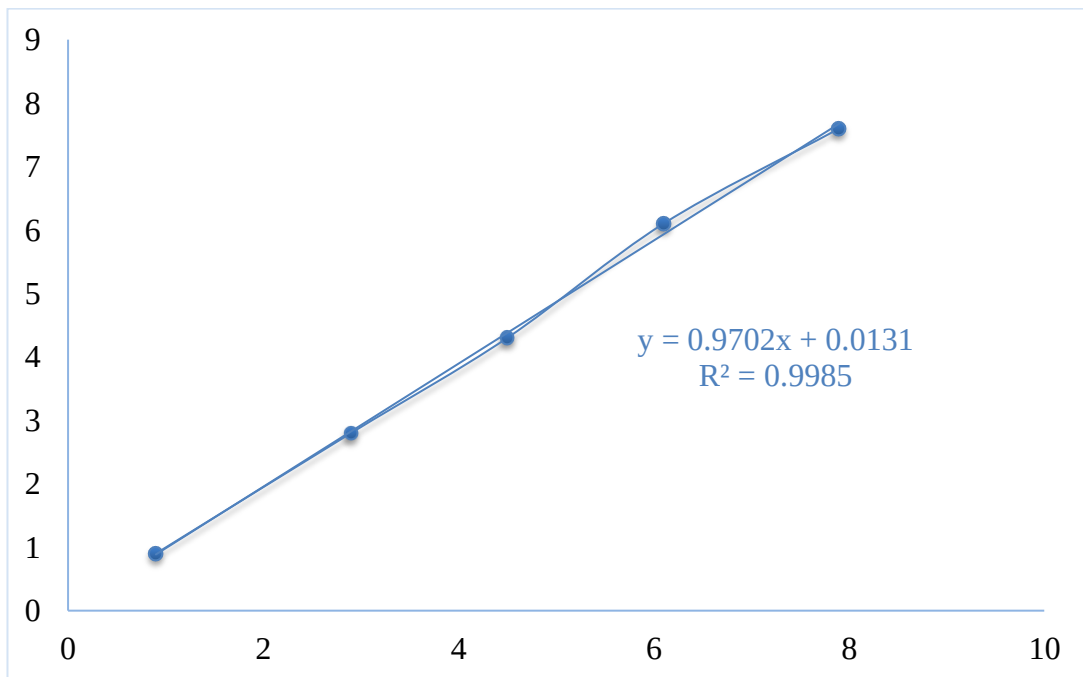
Οι μακρομύκητες *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4 αξιολογήθηκαν με βάση τη μελέτη της αύξησής τους, της κατανάλωσης σακχάρων και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), της παραγωγής βιομάζας αλλά και ενδοπολυσακχαριτών που προέρχονται από αυτή. Στη συνέχεια οι ενδοπολυσακχαρίτες μελετήθηκαν ως προς τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες και σάκχαρα αλλά και ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα, που εμφανίζουν.

4.1 Μελέτη μυκηλιακής αύξησης σε στερεή καλλιέργεια SSF

Από την ανάπτυξη σε στερεή κατάσταση των μακρομυκήτων *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4 που πραγματοποιήθηκε πάρθηκαν τιμές από 5 μέρες για να μελετηθεί η ανάπτυξη του μυκηλίου.



Γράφημα 4: Ανάπτυξη μυκηλίου του μακρομύκητα *Morchella dunalii* 2 σε τριβλίο petri που περιέχει συνθετικό υπόστρωμα PDA



Γράφημα 5: Ανάπτυξη μυκηλίου του μακρομύκητα *Morchella dunalii* 4 σε τριβλίο petri που περιέχει συνθετικό υπόστρωμα PDA

Η ανάπτυξη και των δύο στελεχών έγινε στην ίδια θερμοκρασία στους 27 °C, με ίδια υγρασία, ίδια σύσταση του υποστρώματος και συνθήκες καλλιέργειας. Επίσης, όσο

αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα με την ίδια ακριβώς σύνθεση. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Potato Dextrose Agar (PDA).

Όπως παρατηρείται και από τα γραφήματα, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ειδών *Morchella dunalii*, καθώς φαίνεται να αναπτύσσονται περίπου ταυτόχρονα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Παρατηρείται μια μικρή διαφορά στην ημέρα 4 στο μύκητα *Morchella dunalii* 2, όπου αναπτύχθηκε λίγο πιο απότομα σε σχέση με τον μύκητα *Morchella dunalii* 4 την ίδια μέρα.

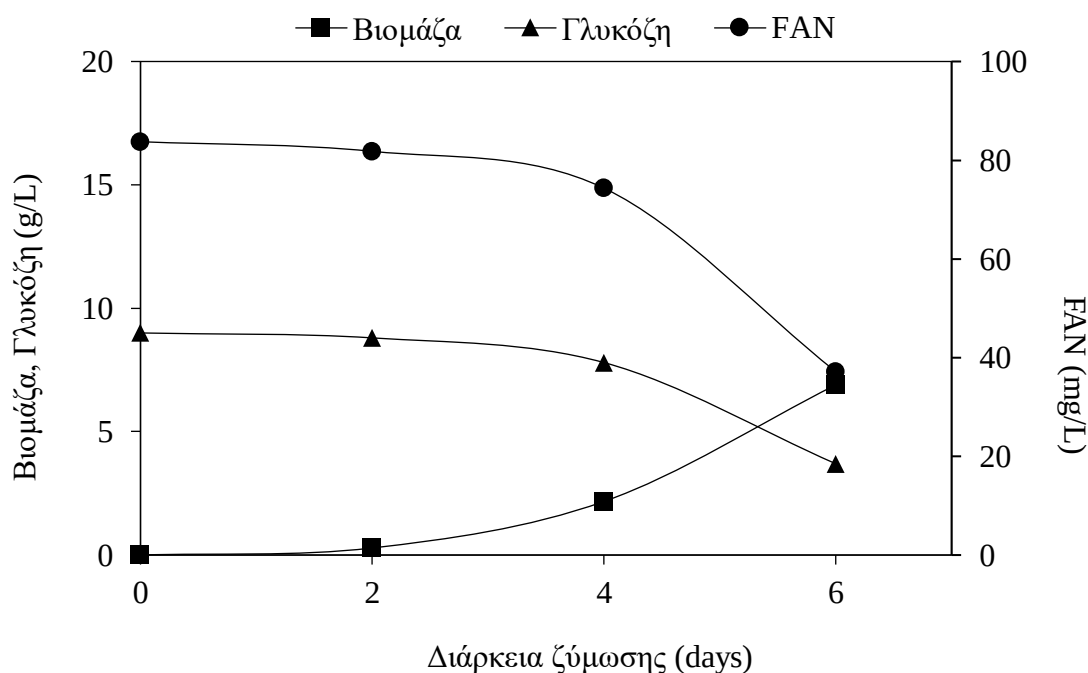
4.2 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικά υποστρώματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε παραγωγή βιομάζας των μακρομυκήτων *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4 σε συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης, ενώ στη συνέχεια έγινε παραλαβή των ενδοπολυσακχαριτών που έχουν παραχθεί.

4.2.1 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης

Πραγματοποιήθηκαν στατικές ζυμώσεις υγρής κατάστασης των μακρομυκήτων στους 26 °C σε συνθετικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και συγκέντρωση 10 g/L. Η δειγματοληψία γινόταν ανά 2 ημέρες με 2 επαναλήψεις στην κάθε μέρα. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το pH, τα mL που καταναλώθηκαν στη ζύμωση και η συγκέντρωση της βιομάζας που σχηματίστηκε μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας.

Αρχικά, δείγματα λήφθηκαν από τη *Morchella dunalii* 4 στις ημέρες ζύμωσης 2, 4 και 6. Το pH είχε αρχική τιμή 6,2 και αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στη τιμή 6,4 και ο όγκος μειώθηκε από τα 30 mL στα 28 mL. Συνολικά, κατά τη ζύμωση παρήχθησαν 6,9 g/L βιομάζας, ενώ καταναλώθηκαν 5,3 g/L γλυκόζης όπως προσδιορίστηκαν μέσω HPLC κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ξεκίνησαν. Από το γράφημα παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η βιομάζα αυξάνεται και η γλυκόζη καταναλώνεται ενώ η παράλληλα παρατηρείται πως η παραγωγή της βιομάζας συμπίπτει με τη μείωση-κατανάλωση του FAN καθώς συνδέεται με τη μικροβιακή αύξηση. Από την συγκέντρωση της γλυκόζης την 6^η μέρα της ζύμωσης φαίνεται ότι η ζύμωση θα μπορούσε να συνεχιστεί, καθώς δεν έχει καταναλωθεί όλη η γλυκόζη του υποστρώματος.

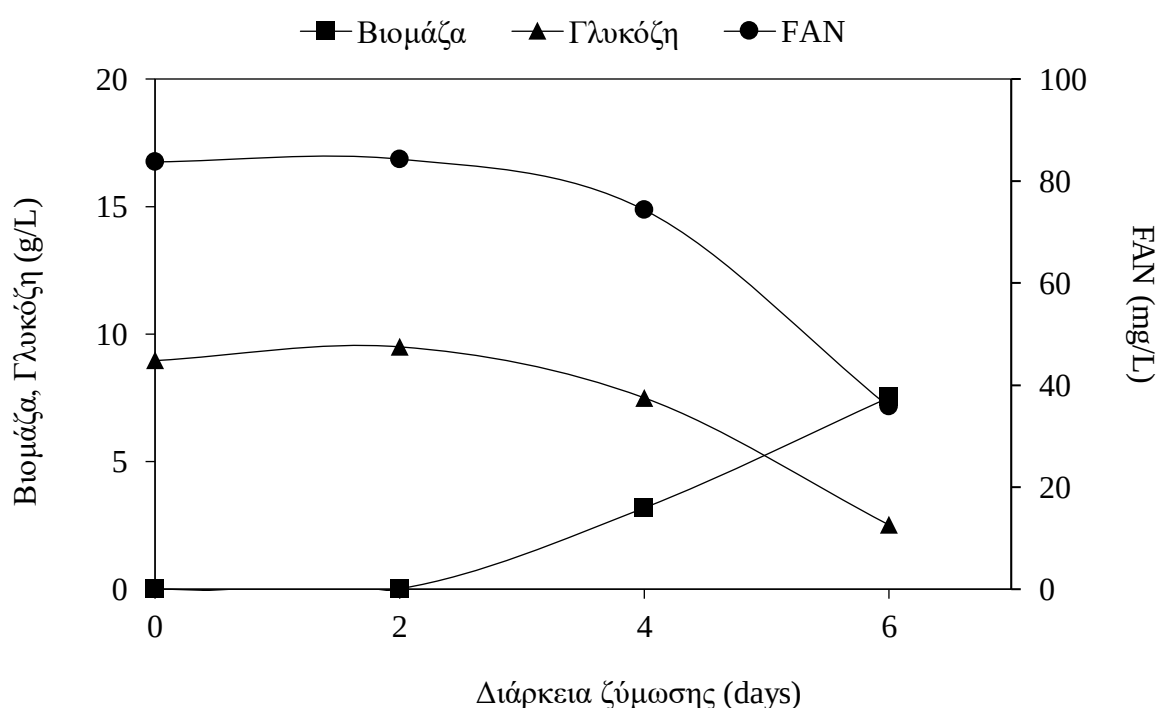


Γράφημα 6: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunalii* 4 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης

Στη συνέχεια, αναφέρονται και τα αποτελέσματα της ζύμωσης υγρής κατάστασης σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης 10 g/L, με ίδιες μέρες δειγματοληψίας και μέτρηση

pH, ml που καταναλώθηκαν και παραγωγή βιομάζας, για το μακρομύκητα *Morchella dunalli* 2.

Το pH αρχικά είχε την τιμή 6,2 και αυξήθηκε μέχρι το 6,3. Επίσης, όγκος του υγρού υποστρώματος από 30 mL μειώθηκε στα 28 mL. Η βιομάζα την 2^η μέρα της ζύμωσης ακόμα δεν είχε παραχθεί και στο τέλος η συγκέντρωσή της ήταν στα 7,5 g/L. Στη ζύμωση αυτή καταναλώθηκαν 6,5 g/L γλυκόζης και 35,8 mg/L FAN το οποίο και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται πως συνάδει με την αύξηση της βιομάζας καθώς ο αυξάνεται ο ρυθμός αύξησης της βιομάζας τη χρονική στιγμή που αυξάνεται ο ρυθμός κατανάλωσης του FAN.



Γράφημα 7: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunali* 2 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης

Από το γράφημα παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η βιομάζα αυξάνεται και η γλυκόζη καταναλώνεται. Και στις δύο περιπτώσεις με το συνθετικό

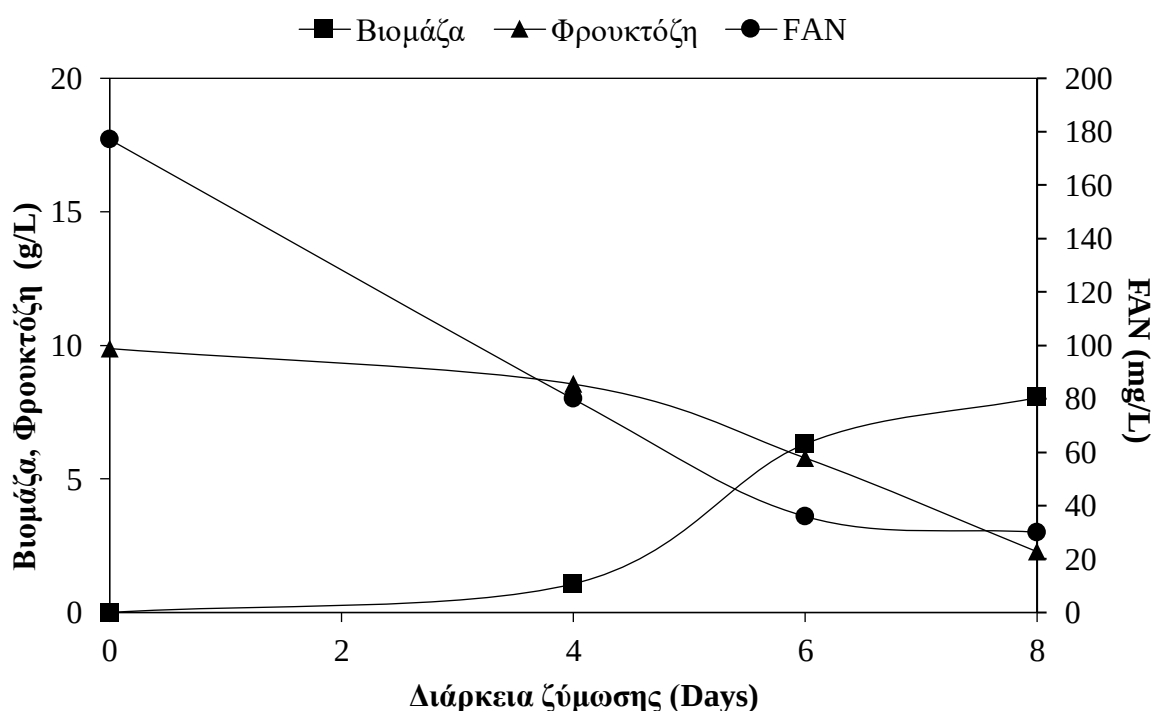
υπόστρωμα γλυκόζης τα δύο είδη *Morchella dunalii* στο τέλος της καλλιέργειας παρήγαγαν τη μέγιστη τιμή βιομάζας. Όμως, στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, φαίνεται να ευνοεί τη *Morchella dunalii* 4 καθώς παράγεται περισσότερο προϊόν σε σχέση με τη *Morchella dunalii* 2. Οι Diamantopoulou et al.(2021) ανέφερε ότι η *Morchella elata* (μαύρη μορχέλα) πέτυχε μέγιστη βιομάζα 5,2 g/L σε στατική καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L. Επίσης, η *Morchella esculenta* (κίτρινη μορχέλα) σε υπόστρωμα γλυκόζης σε στατική καλλιέργεια πέτυχε τιμή βιομάζας 12,70 g/L. Η βιομάζα της *Morchella dunalii* 4 δεν έχει μεγάλη απόκλιση από τη βιομάζα της μαύρης μορχέλας. Πρέπει να έχουμε υπ' όψιν μας όμως ότι στο δικό μας πείραμα η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 10 g/L. Στην παρούσα μελέτη προκύπτει παρόμοια τιμή βιομάζας με την *Morchella elata* σε μικρότερη συγκέντρωση σακχάρων. Έτσι, είναι πιθανό, χρησιμοποιώντας ένα υπόστρωμα με μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων να οδηγούμασταν σε μια ζύμωση μεγαλύτερης διάρκειας κατά την οποία εν δυνάμει θα μπορούσε να έχει παραχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας. Παρόλα αυτά, για κάθε ζύμωση και στέλεχος θα πρέπει να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός συγκέντρωσης σακχάρων ο οποίος θα αποδίδει τη μέγιστη δυνατή παραγωγή βιομάζας, καθώς η ραγδαία αύξηση στη συγκέντρωση των σακχάρων ενδέχεται να αναστείλει τη μικροβιακή αύξηση (Dedousi et al. 2021).

4.2.2 Μελέτη παραγωγής βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση υγρής κατάστασης των μακρομυκήτων σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης 10 g/L στους 26 °C. Η δειγματοληψία έγινε την 4^η, 6^η και 8^η ημέρα με 2 επαναλήψεις στην κάθε μέρα. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το pH, τα mL

που καταναλώθηκαν στη ζύμωση και η συγκέντρωση της βιομάζας που σχηματίστηκε μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας.

Το αρχικό pH του δείγματος ήταν 6,2 και αυξήθηκε στο 6,7, καθώς και ο αρχικός όγκος είχε μετρηθεί στα 30 mL και στο τέλος της ζύμωσης μειώθηκε κατά 2 mL. Η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης ήταν 8 g/L ενώ καταναλώθηκαν 9,3g/L φρουκτόζης. Από τη δειγματοληψία παρατηρείται πως η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας παρήχθη στο τέλος της ζύμωσης. Επίσης, σε σχέση με το συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης η ζύμωση διήρκεσε περισσότερες ημέρες. Αυτό σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση και κατανάλωση FAN και τη μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων οδήγησε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας.



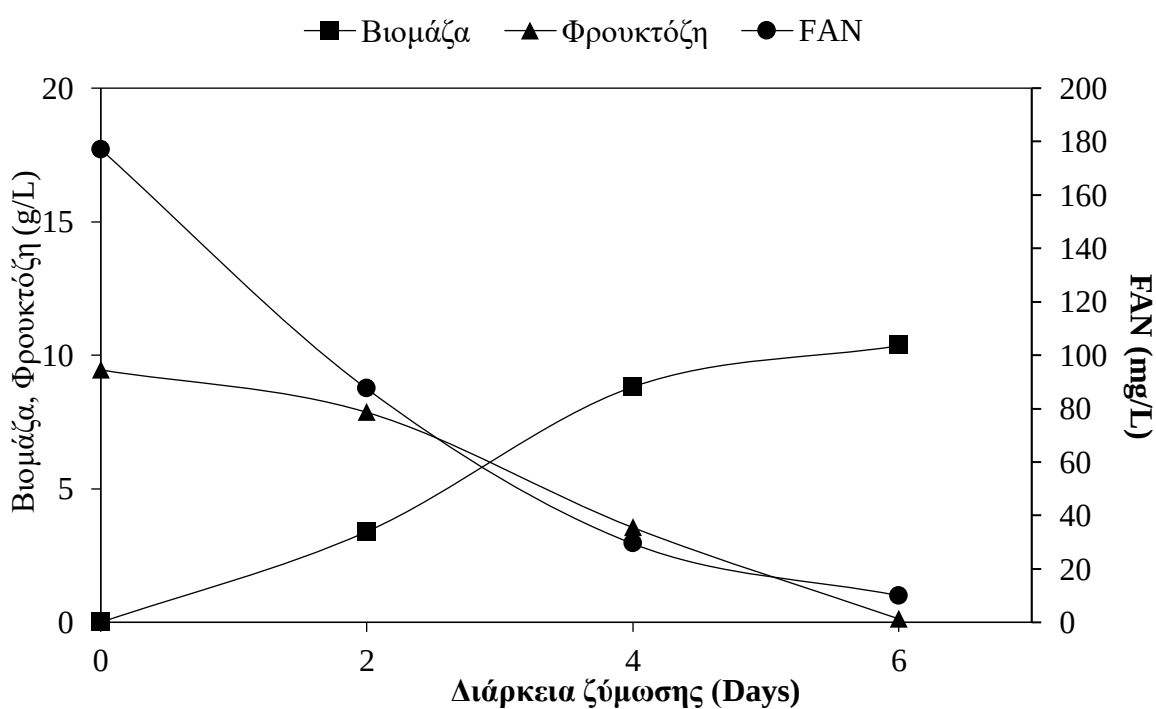
Γράφημα 8: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunalii* 4 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης

Στη συνέχεια, αναφέρονται και τα αποτελέσματα της ζύμωσης σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης 10 g/L, με ίδιες μέρες δειγματοληψίας και μέτρηση pH, ml

που καταναλώθηκαν και παραγωγή βιομάζας, για το μακρομύκητα *Morchella dunalli*

2.

Και σε αυτή τη δειγματοληψία η τιμή του pH ξεκινά από 6,2 και την 8^η μέρα έχει αυξηθεί στο 7,1, καθώς και ο όγκος έχει μειωθεί κατά 2 mL από τα αρχικό 30 mL της ζύμωσης. Η τιμή της ξηρής βιομάζας την 4^η μέρα ήταν 3,4 g/L και την 8^η μέρα ήταν 10,4 g/L. Η κατανάλωση σακχάρων αρχικά ήταν 9,4 g/L και την τελευταία μέρα της ζύμωσης ήταν 0,1 g/L συνεπώς καταναλώθηκαν 9,3 g/L φρουκτόζης, γεγονός το οποίο παράλληλα με την κατανάλωση του FAN οδήγησε και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση τελικής βιομάζας ενώ η κατανάλωση της φρουκτόζης φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή βιομάζας. Παρόλα αυτά οι 2 ζυμώσεις στη φρουκτόζη είχαν παρόμοια Υx/s, δηλαδή 1,06 και 1,1 g/g.



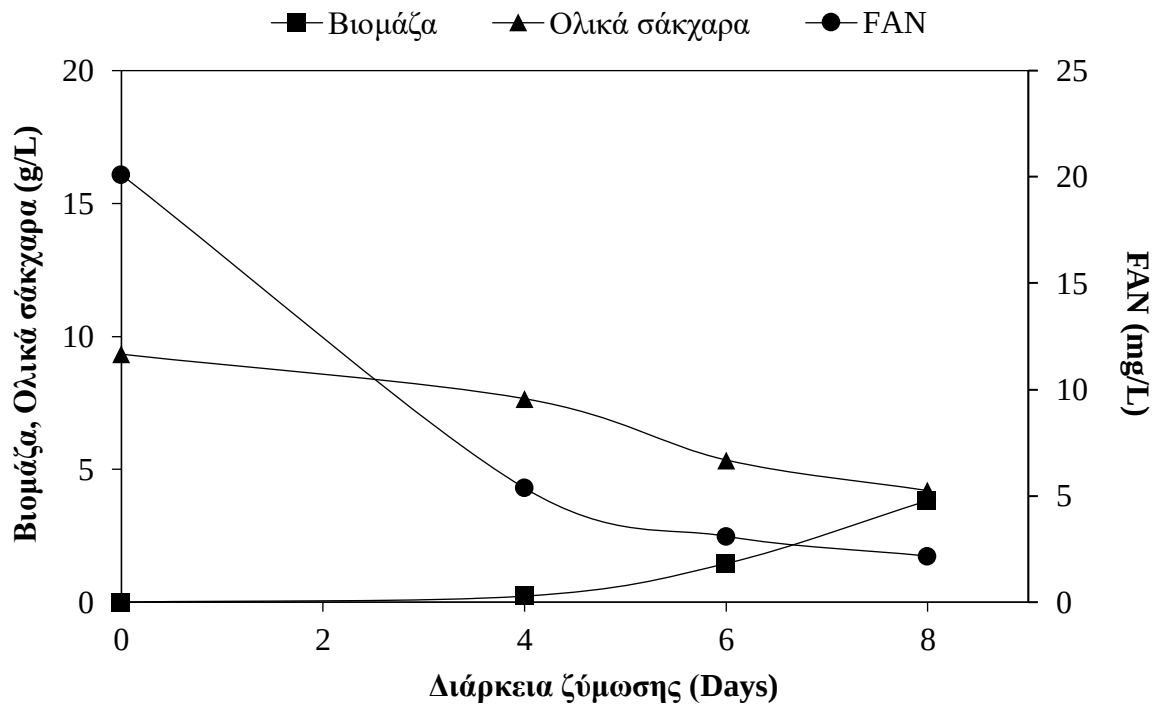
Γράφημα 9: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunalii* 2 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης

4.3 Μελέτη παραγωγής βιομάζας σε υπόστρωμα από στέμφυλα οиноποιίας

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε παραγωγή βιομάζας των μακρομυκήτων *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4 σε απόβλητα στεμφύλων οινολογίας (grape pomace) συγκέντρωσης σε ολικά σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) 10 g/L. Η ζύμωση ήταν υγρής κατάστασης και οι κωνικές επώστηκαν στους 26 °C. Η δειγματοληψία έγινε την 4^η, 6^η και 8^η ημέρα με 2 επαναλήψεις στην κάθε μέρα. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε το pH, τα mL που καταναλώθηκαν στη ζύμωση και η συγκέντρωση της βιομάζας που σχηματίστηκε ομοίως με τη ζύμωση σε συνθετικά υποστρώματα

Αυτά τα δείγματα είχαν αρχική τιμή pH 6,2, το οποίο αυξήθηκε την 8^η μέρα στο 6,7, καθώς και ο όγκος που καταναλώθηκε ήταν 3 mL. Η συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας την 4^η μέρα ήταν 0,2 g/L και την 8^η μέρα 3,8 g/L. Η συγκέντρωση των ολικών σακχάρων ήταν την 4^η μέρα 9,3 g/L και τη 8^η μέρα 4,2 g/L. Στη μέτρηση των ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν με το θρεπτικό υπόστρωμα στεμφύλων παρατηρήθηκαν ποσότητες φρουκτόζης, γλυκόζης και σε μικρή ποσότητα σακχαρόζης.

Από το γράφημα παρατηρείται πως την 8^η μέρα της ζύμωσης δεν έχουν καταναλωθεί όλα τα σάκχαρα που σημαίνει ότι η ζύμωση μπορεί να συνεχιστεί. Επίσης, δεν παράχθηκε αρκετή ποσότητα βιομάζας σε σχέση με τα άλλα υποστρώματα.

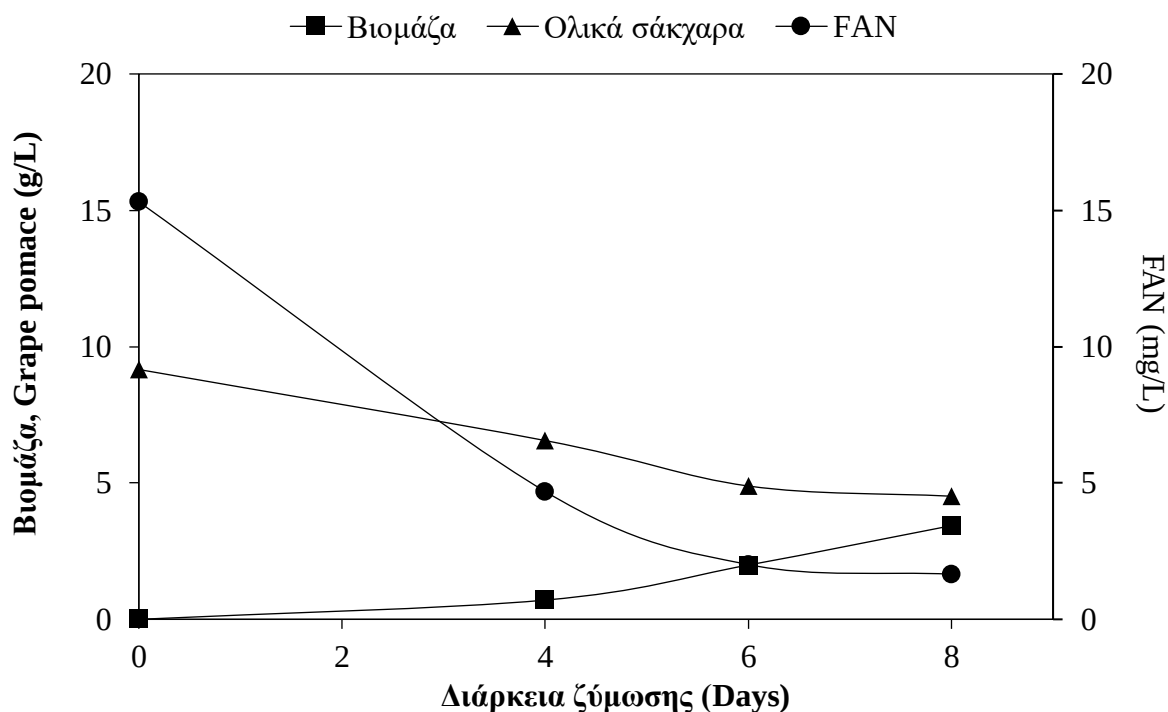


Γράφημα 10: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunalii* 4 σε υπόστρωμα στεμφύλων

Η δειγματοληψία της ζύμωσης με τον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 2 είχαν αρχική τιμή pH 6,2 το οποίο αυξήθηκε στο 6,8 και ο όγκος μειώθηκε κατά 3 mL από τα αρχικά 30 mL που είχαν προστεθεί στη κωνική φιάλη. Συνολικά παρήχθησαν την 8^η μέρα 3,4 g/L βιομάζας και καταναλώθηκαν 4,7 g/L σακχάρων. Στη μέτρηση των ολικών σακχάρων που καταναλώθηκαν με το θρεπτικό υπόστρωμα στεμφύλων παρατηρήθηκαν ποσότητες φρουκτόζης, γλυκόζης και σε μικρή ποσότητα σακχαρόζης.

Τα δύο είδη *Morchella* εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά αύξησης. Με βάσει προγενέστερες μελέτες Dedousi et al., (2021) θα ήταν χρήσιμο να γίνει μελέτη για την παραγωγή βιομάζας των συγκεκριμένων μυκήτων σε υποστρώματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις αρχικών σακχάρων αλλά και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων καθώς όπως φαίνεται στο παράδειγμα της μελέτης αυτής, παρατηρήθηκαν

συγκεντρώσεις βιομάζας μεταξύ 12-18 g/L, σε υπόστρωμα όπου η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 30 g/L.

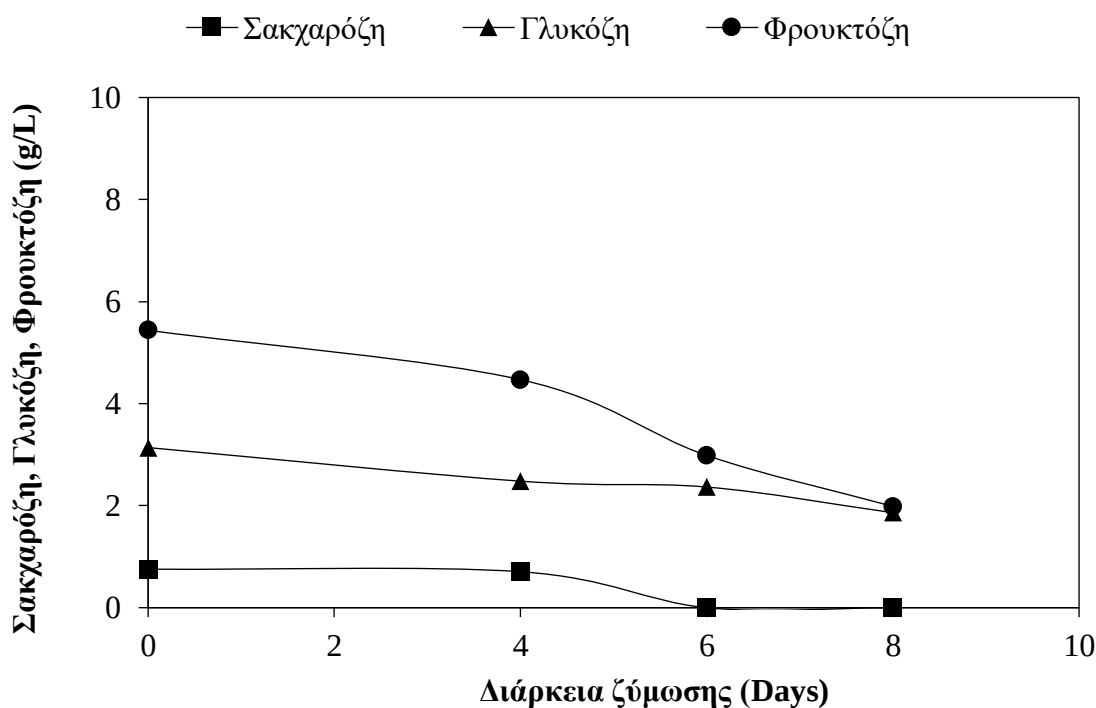


Γράφημα 11: Παραγωγή βιομάζας σε σχέση με κατανάλωση σακχάρων και FAN της *Morchella dunalii* 2 σε υπόστρωμα στεμφύλων

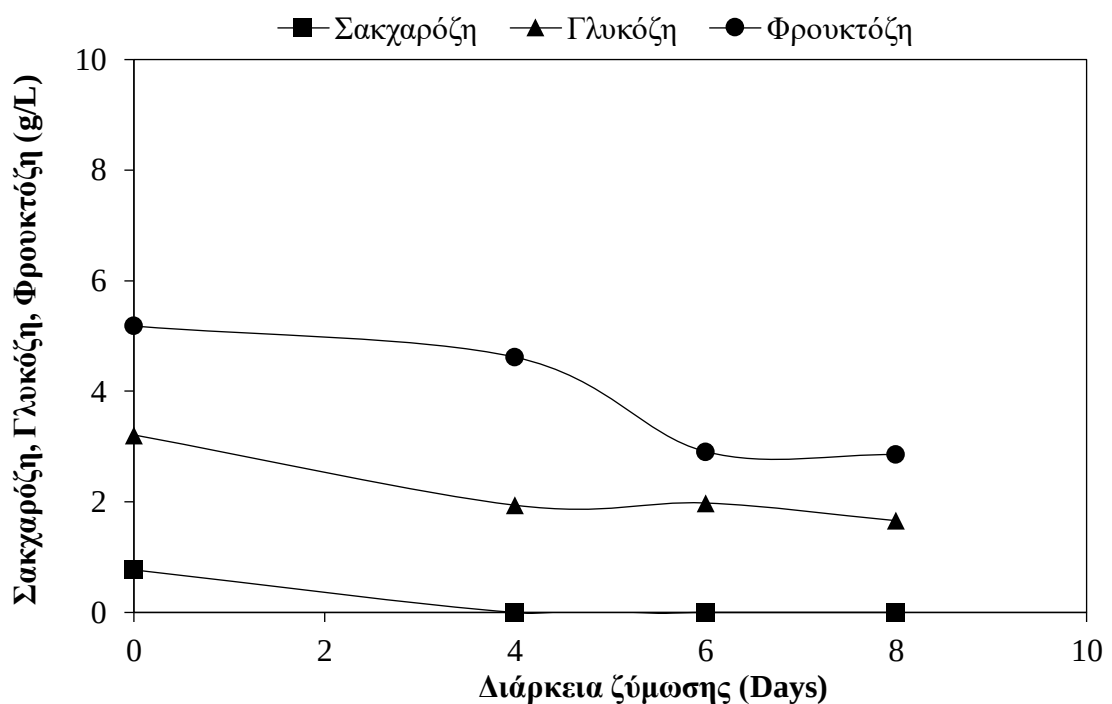
Από την παραγωγή της βιομάζας και στα 3 θρεπτικά υποστρώματα φαίνεται ότι η φρουκτόζη προώθησε περισσότερο από όλα την παραγωγή της βιομάζας. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της βιομάζας στις ζυμώσεις με τη συνθετική φρουκτόζη ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τις ζυμώσεις με το συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης.

Οι υψηλές αποδόσεις καταναλωθέντων σακχάρων σε βιομάζα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στις *M. rotunda*, *M. vulgaris* και *M. conica* φαίνεται να είναι έως 0,8 g/g και παρόμοιο με εμάς, όπου οι τιμές του $Y_{X/S}$ φτάνουν το 1,17 g/g στα συνθετικά και το 0,74 g/g στο απόβλητο το οποίο είναι υψηλό και πολύ θετικό. Τα στελέχη που

χρησιμοποιήθηκαν φάνηκε να δύνανται να αξιοποιήσουν τα σάκχαρα από απόβλητα οινοποιείων ενώ είναι αρκετά υποσχόμενα ώστε να αξιοποιήσουν ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων και αζώτου προς παραγωγή βιομάζας όπως φάνηκε και από τα συνθετικά υποστρώματα. Τέλος όπως προκύπτει από τις ζυμώσεις στα συνθετικά υποστρώματα, τα 2 στελέχη φαίνεται να στρέφονται προς την κατανάλωση της φρουκτόζης καθώς την καταναλώνουν με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ ακόμη και κατά τις ζυμώσεις στο εκχύλισμα στεμφύλων, είναι εμφανής η προτίμησή τους στην κατανάλωση του συγκεκριμένου μονοσακχαρίτη (φρουκτόζη) όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 12 και 13.



Γράφημα 12: Κατανάλωση σακχάρων (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) κατά τη ζύμωση του στελέχους *Morchella dunalii* 4 σε υπόστρωμα εκχυλίσματος στεμφύλων



Γράφημα 13: Κατανάλωση σακχάρων (σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) κατά τη ζύμωση του στελέχους *Morchella dunalii* 2 σε υπόστρωμα εκχυλίσματος στεμφύλων

4.4 Χαρακτηρισμός ενδοπολυσακχαριτών

Μετά την ξήρανση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών τα οποία στη συνέχεια λυοφιλιώθηκαν. Στον Πίνακα 2 απεικονίζεται το ποσοστό εκχύλισης ανά g ξηρής βιομάζας (Yield w/w%) του μακρομύκητα *Morchella dunalii* 4 στις ζυμώσεις υγρής κατάστασης με θρεπτικό υποστρώματα συνθετικής γλυκόζης. Ακόμη τα ξηρά εκχυλίσματα ενδοπολυσακχαριτών που προέκυψαν από τη βιομάζας χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των σύστασης ενδοπολυσακχαριτών με τις μεθόδους Dubois, Lowry και DPPH.

Στη περίπτωση με το θρεπτικό υπόστρωμα φρουκτόζης παρατηρείται ότι η απόδοση εκχυλίσματος είναι μεγαλύτερη στην αρχή της ζύμωσης με τον μακρομύκητα *M. dunalii* 4, ενώ στη *Morchella dunalii* 2 την τελευταία μέρα της ζύμωσης.

Πίνακας 3: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες *Morchella dunalii* 2 και 4 σε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης

	<i>Morchella dunalli</i> 4	<i>Morchella dunalli</i> 2
Ημέρες	(Yield w/w%)	(Yield w/w%)
2	26,8	30,9
4	30,4	26,8
6	27,6	23,8

Πίνακας 4: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες *Morchella dunalii* 2 και 4 σε συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης.

	<i>Morchella dunalli</i> 4	<i>Morchella dunalli</i> 2
Ημέρες	(Yield w/w%)	(Yield w/w %)
4	30,9	12,7
6	26,8	30,6
8	23,8	31,7

Πίνακας 5: Ποσοστό εκχυλίσματος ανά g ξηρής βιομάζας στους μακρομύκητες *Morchella dunalii* 2 και *Morchella dunalii* 4 σε υπόστρωμα στεμφύλων οиноποίησης.

	<i>Morchella dunalli</i> 4	<i>Morchella dunalli</i> 2
Ημέρες	(Yield w/w %)	(Yield w/w %)
4	0	18,7
6	32,5	45,2
8	40,2	44,5

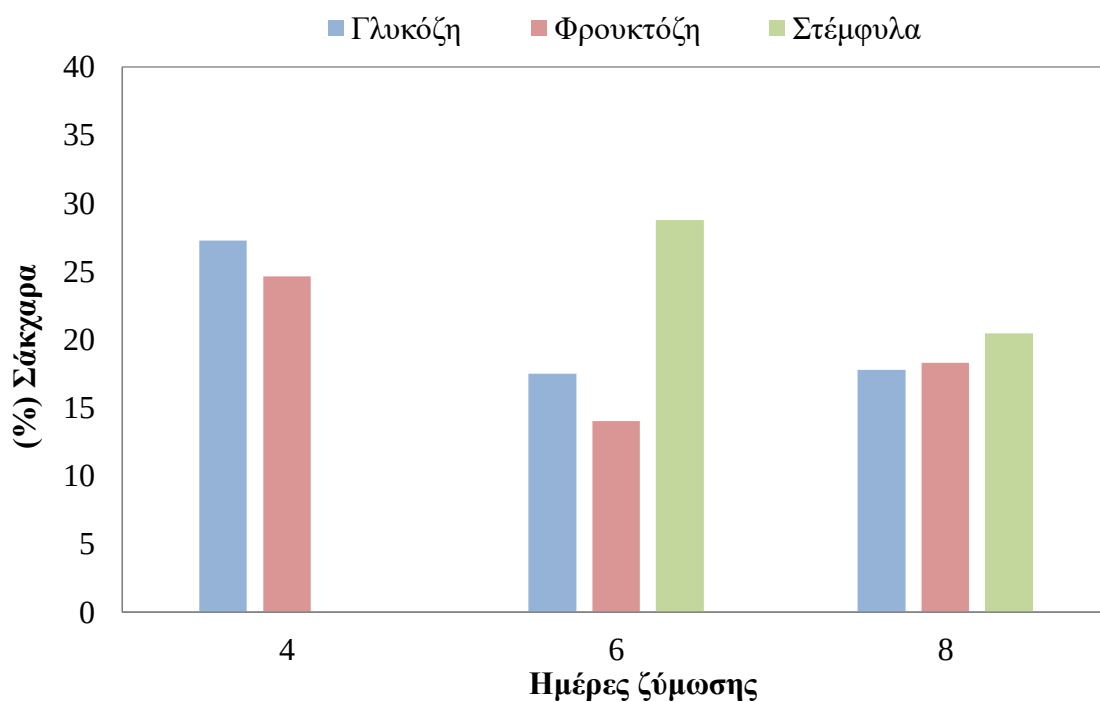
Η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών που παράγονται από τα δύο είδη *Morchella* στις στατικές καλλιέργειες με τα συνθετικά υποστρώματα είναι 31,7-23,8% και στο υπόστρωμα στεμφύλων είναι 44,5-40,2%. Παρατηρείται επίσης, ότι

την 6^η μέρα της ζύμωσης εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές σε σχέση με την 8^η, δηλαδή όσο προχωράει η ζύμωση οι ενδοπολυσακχαρίτες μειώνονται. Συγκρίνοντάς το με τη βιβλιογραφία, στους μύκητες *Morchella* η μέγιστη τιμή των ενδοπολυσακχαριτών κυμαίνεται στις τιμές 28-44% σε συνθετικά υποστρώματα και στο υπόστρωμα αποβλήτου είναι 26-52%.

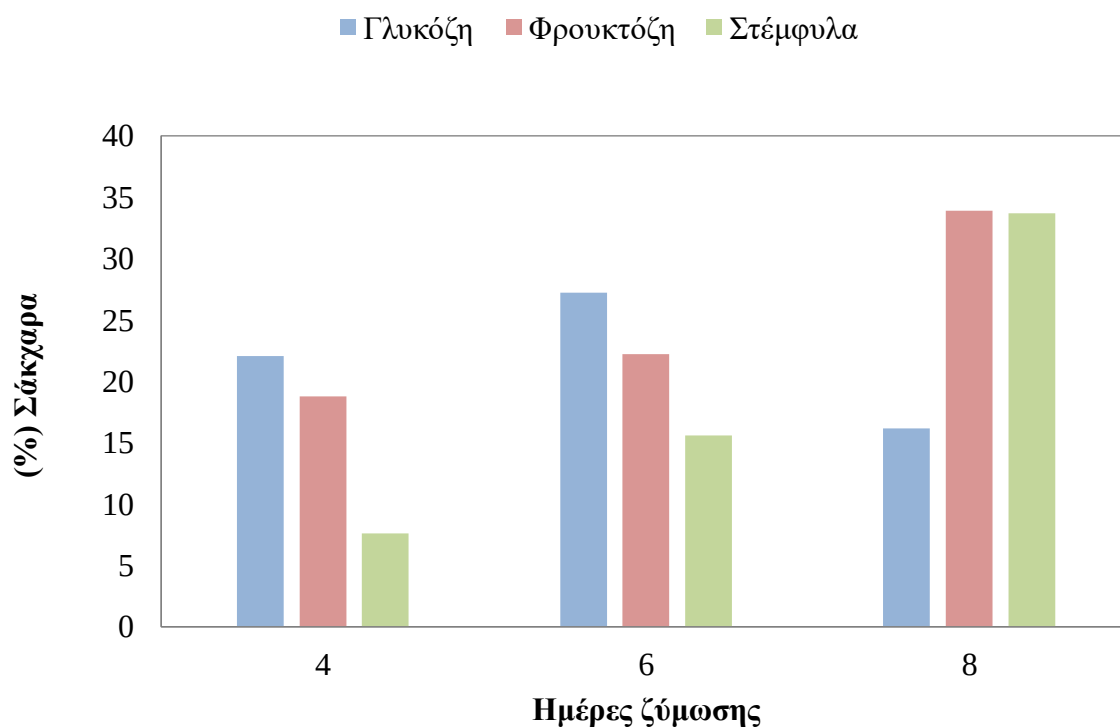
4.4.1 Προσδιορισμός σύστασης εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών σε σάκχαρα

Όπως φαίνεται στα Γραφήματα 14 και 15 η σύσταση των εκχυλισμάτων σε σάκχαρα διαφοροποιείται ανάλογα με την ημέρα της ζύμωσης και το υπόστρωμα. Για τη *Morchella dunalli* 4 φαίνεται πως ενώ στην αρχή της ζύμωσης δεν υπήρχε ποσοστό σακχάρων στο εκχύλισμα για τη ζύμωση στα στέμφυλα κατά την πορεία αυτής το ποσοστό τους άρχισε να αυξάνεται και στις 6 ημέρες ζύμωσης να είναι υψηλότερο (28,76%) σε σχέση με τα άλλα δύο υποστρώματα στα οποία η συγκέντρωση των σακχάρων μειώθηκε (υπόστρωμα γλυκόζης – 17,48% και υπόστρωμα φρουκτόζης – 14,01%). Φτάνοντας στο τέλος των ζυμώσεων όπου το στέλεχος φάνηκε να παράγει εξωπολυσακχαρίτες όμοιας σύστασης σε σάκχαρα καθώς και στη ζύμωση στα στέμφυλα μειώθηκε η συγκέντρωση σε σάκχαρα (20,44%).

Ομοίως, στο Γράφημα 15, τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη *Morchella dunalii* 2 περιέχουν ποσοστό σακχάρων το οποίο διαφοροποιείται και ανάλογα με τη χρονική στιγμή της ζύμωσης αλλά και με το υπόστρωμα της ζύμωσης. Μάλιστα τα τελικά προϊόντα στις 8 ημέρες στη ζύμωση με τη φρουκτόζη (33,89%) και τα στέμφυλα (33,67%) όπου και εκεί καταναλώνεται κυρίως η φρουκτόζη των ολικών σακχάρων, παρατηρείται πως το ποσοστό σακχάρων είναι ίδιο.



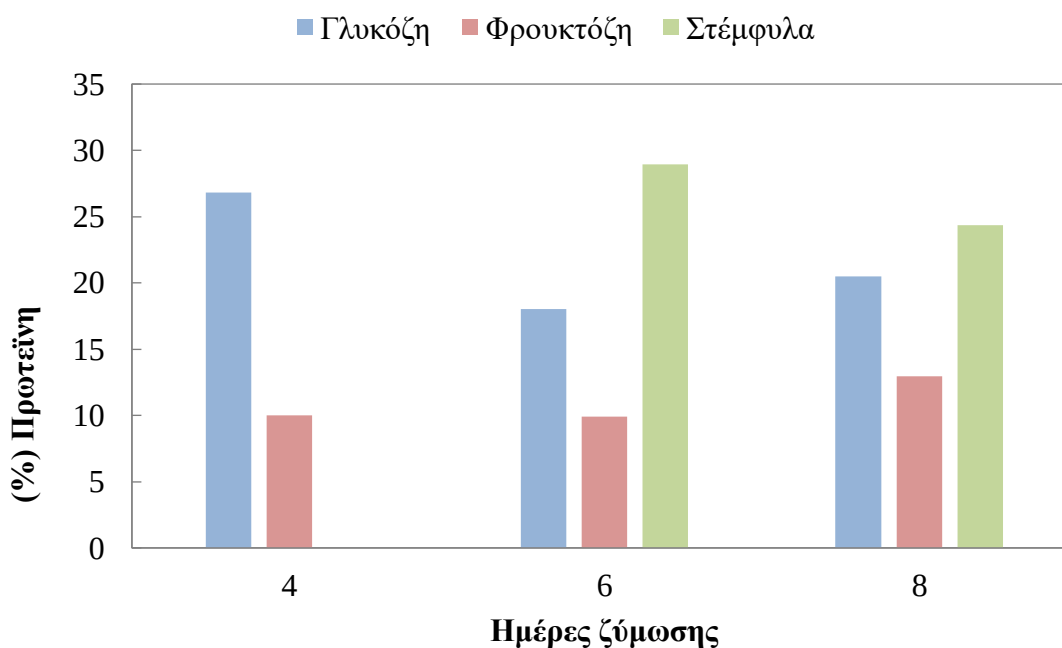
Γράφημα 14: Σύσταση σε σάκχαρα ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.



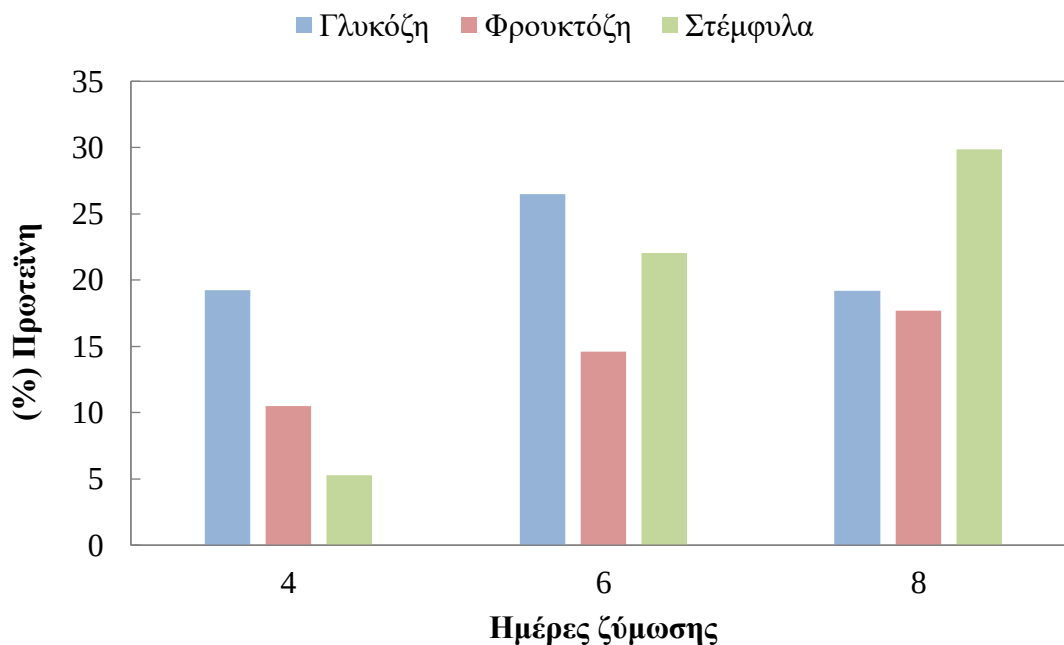
Γράφημα 15: Σύσταση σε σάκχαρα ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

4.4.2 Προσδιορισμός σύστασης εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών σε πρωτεΐνες

Στους δύο μύκητες παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές πρωτεΐνης στα συνθετικά υποστρώματα (*M. dunalii* 4, 20,47% και 12,96%, *M. dunalii* 2, 19,18% και 17,71%) σε σχέση με το ποσοστό πρωτεΐνης στο υπόστρωμα στεμφύλων (*M. dunalii* 4 - 24,35% και *M. dunalii* 2 - 29,87%). Συγκρίνοντας το με τη βιβλιογραφία, η ποσότητα πρωτεΐνης που συντέθηκε από την *M. Conica* (Dedousi et al., 2021) σε συνθετικό υπόστρωμα σακχαρόζης ήταν περίπου 2 % και αυξήθηκε στη ζύμωση με το απόβλητο μελάσας. Επίσης, η βιβλιογραφία αναφέρει (Dedousi et al., 2021) ότι οι μεγαλύτερες τιμές πρωτεΐνης καταγράφηκαν περίπου την 5^η -8^η μέρα της ζύμωσης, κάτι που μπορεί να παρατηρηθεί και στο δικό μας πείραμα. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως οι ποσότητες των μυκήτων *M. dunalii* 4 και *M. dunalii* 2 σε πρωτεΐνη είναι αρκετά υψηλές συγκριτικά με άλλους μύκητες του γένους *Morchella*.



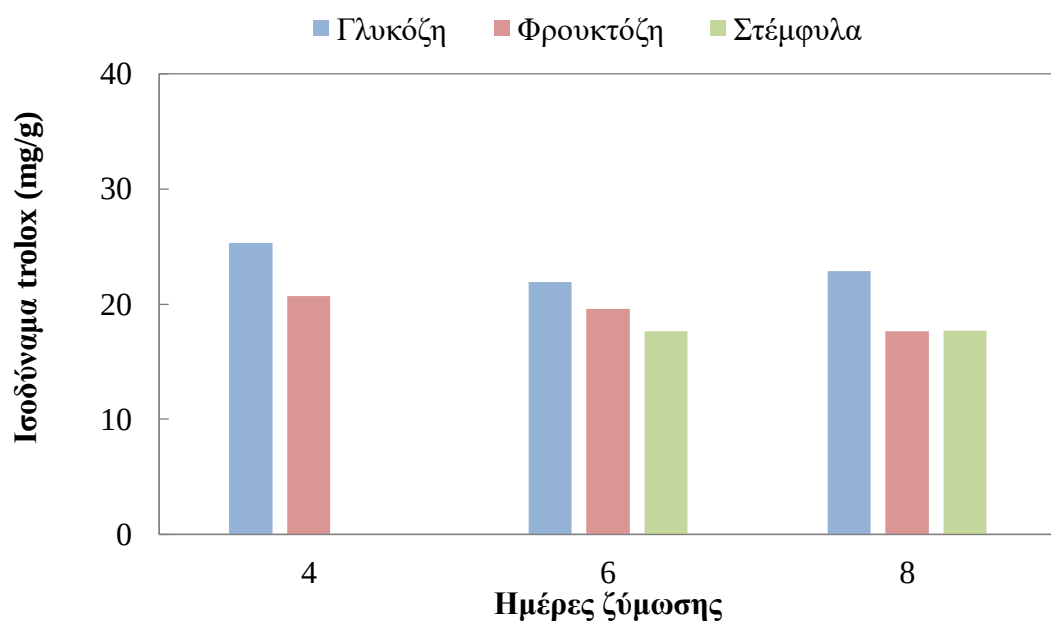
Γράφημα 16: Σύσταση σε πρωτεΐνη ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.



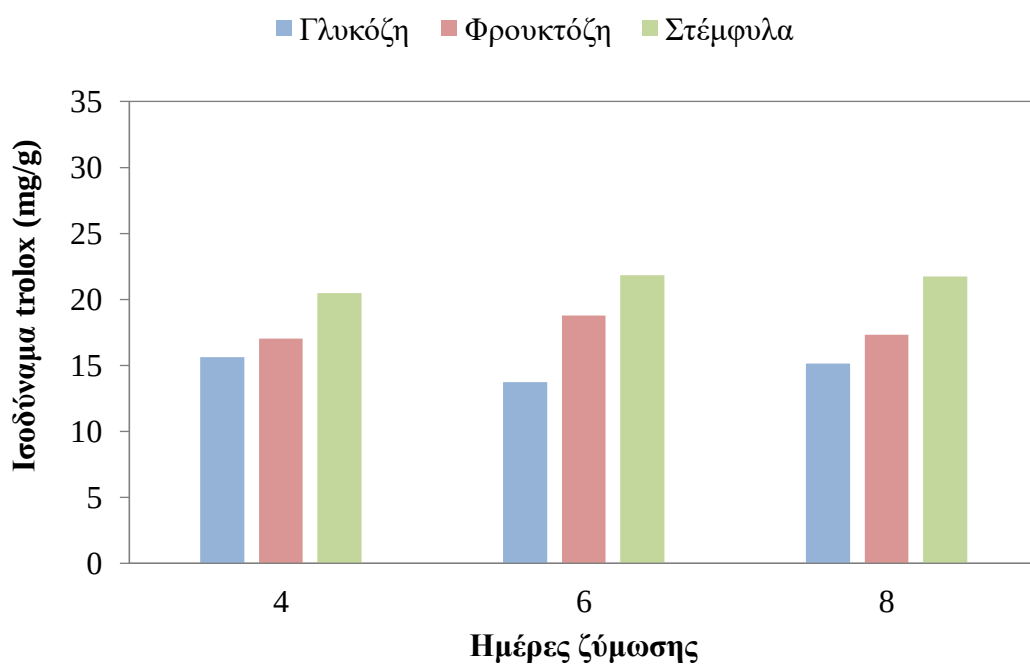
Γράφημα 17: Σύσταση σε πρωτεΐνη ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

4.4.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων ενδοπολυσακχαριτών

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, εκφράζει την ικανότητα δέσμευσής τους από την ελεύθερη ρίζα DPPH. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η *Morchella dunalii* 4 εμφάνισε μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την *Morchella dunalii* 2 στα δύο συνθετικά υποστρώματα. Στο υπόστρωμα στεμφύλων η *Morchella dunalii* 2 εμφάνισε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα την 6^η μέρα με τιμή 21,81 mg/g ξηρού εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο δικό μας πείραμα είναι αρκετά μεγαλύτερες με αποτέλεσμα οι δύο μύκητες όταν αναπτυχθούν σε υπόστρωμα στεμφύλων να δώσουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. (Dedousi et al. 2021).



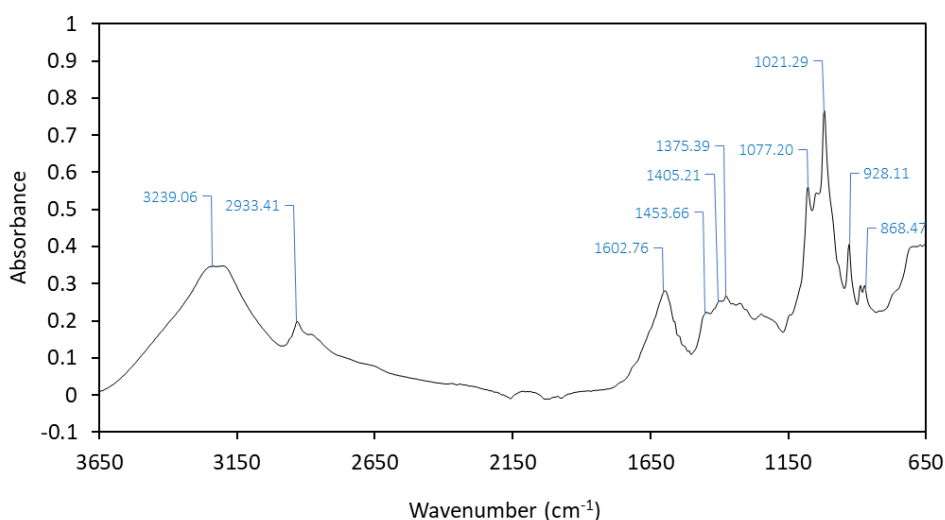
Γράφημα 18: Σύσταση σε ισοδύναμα trolox ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 4 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.



Γράφημα 19: Σύσταση σε ισοδύναμα trolox ανά g ξηρού εκχυλίσματος στον μακρομύκητα *Morchella dunalii* 2 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα.

4.4.3 Προσδιορισμός πολυσακχαριτών με FTIR

Η φασματοσκοπία FTIR είναι μια ισχυρή τεχνική για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών οργανικών ομάδων.



Γράφημα 20: Προσδιορισμός πολυσακχαριτών με FTIR στη *Morchella dunalii* 2.

Η βιβλιογραφία του Lie et al (2017). στη *Morchella esculenta* υποστηρίζει πως υπάρχουν τρεις χαρακτηριστικές απορροφήσεις πολυσακχαριτών, που αντιπροσωπεύονται από μια ευρεία ζώνη απορρόφησης περίπου 3000-3500 cm⁻¹ για δεσμούς O-H και μια ισχυρή κορυφή απορρόφησης 2800-3000 cm⁻¹ για δεσμούς C-H. Η ισχυρή κορυφή απορρόφησης στα 1600-1700 cm⁻¹ έδειξε απορρόφηση του C=O της περιοχής Amide 1 που είναι ενδεικτική της ύπαρξης αμινομάδων στο δείγμα (Glassford S, et al 2013). Η ζώνη στα 890 cm⁻¹ αντιπροσωπεύει χαρακτηριστική απορρόφηση για τον β-γλυκοζιτικό δεσμό, ο οποίος έχει αναφερθεί ότι είναι βασικό δομικό χαρακτηριστικό σε υδατάνθρακες για ανοσοδιεγερτικές και αντικαρκινικές επιδράσεις. Ο Meng et al. (2019) στην έρευνα του βρήκε ότι η *Morchella sextelata* εμφανίζει υπολείμματα γλυκόζης στα 592 cm⁻¹ και α-γλυκοζιτικούς δεσμούς στα 848 cm⁻¹.

Η *Morchella dunalii* 2 δεν έχει υπολείμματα γλυκόζης ούτε α-γλυκοζιτικούς δεσμούς καθώς οι κορυφές της ξεκινούν από 868 cm^{-1} . Επίσης, έχει β- γλυκοζιτικούς δεσμούς με κορυφή στα 928 cm^{-1} συγκριτικά με τη *Morchella sextelata* που έχει σε κορυφή 1027 cm^{-1} . Απορρόφηση των δεσμών C=O είναι εμφανής όπως θα δούμε και στο γράφημα γιατί υπάρχει κορυφή στα 1602 cm^{-1} . Υπάρχει μια κορυφή απορρόφησης στα 2933 cm^{-1} που χαρακτηρίζει τους δεσμούς C-H αλλά είναι πολύ μικρή και μια κορυφή στα 3239 cm^{-1} που χαρακτηρίζει τους δεσμούς O-H, που αφορούν τους υδατάνθρακες, η οποία είναι σε μεγαλύτερη απορρόφηση.

4.5 Μελέτη επίδρασης ενδοπολυσακχαριτών στην ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων

Η χρήση των μυκηλίων σε συνδυασμό με τα προβιοτικά βακτήρια είναι ένα αρκετά ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης. Τα βακτήρια αυτά είναι ικανά να καταναλώσουν διάφορα παράγωγα των μυκηλίων όπως οι β-γλυκάνες και άλλοι πολυσακαρίτες που προκύπτουν από το μεταβολισμό τους. Τα συστατικά αυτά λοιπόν, αξιοποιούνται ως πρεβιοτικοί παράγοντες ώστε τα εξασφαλίσουν την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των προβιοτικών βακτηρίων τα οποία με τη σειρά τους θα αποδώσουν τα λειτουργικά τους οφέλη στην υγεία του ξενιστή (πχ ομαλή λειτουργία πεπτικού συστήματος, μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και σακχάρου κ.α.).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η χρήση του εκχυλίσματος ενδοπολυσακχαριτών σε μια προπαρασκευαστική μελέτη και εξετάστηκε η ικανότητά του να χρησιμοποιηθεί αντί της χρήσης μιας απλούστερης μορφής άνθρακα (γλυκόζης) για την ανάπτυξη των 2 γαλακτικών βακτηρίων που μελετήθηκαν.

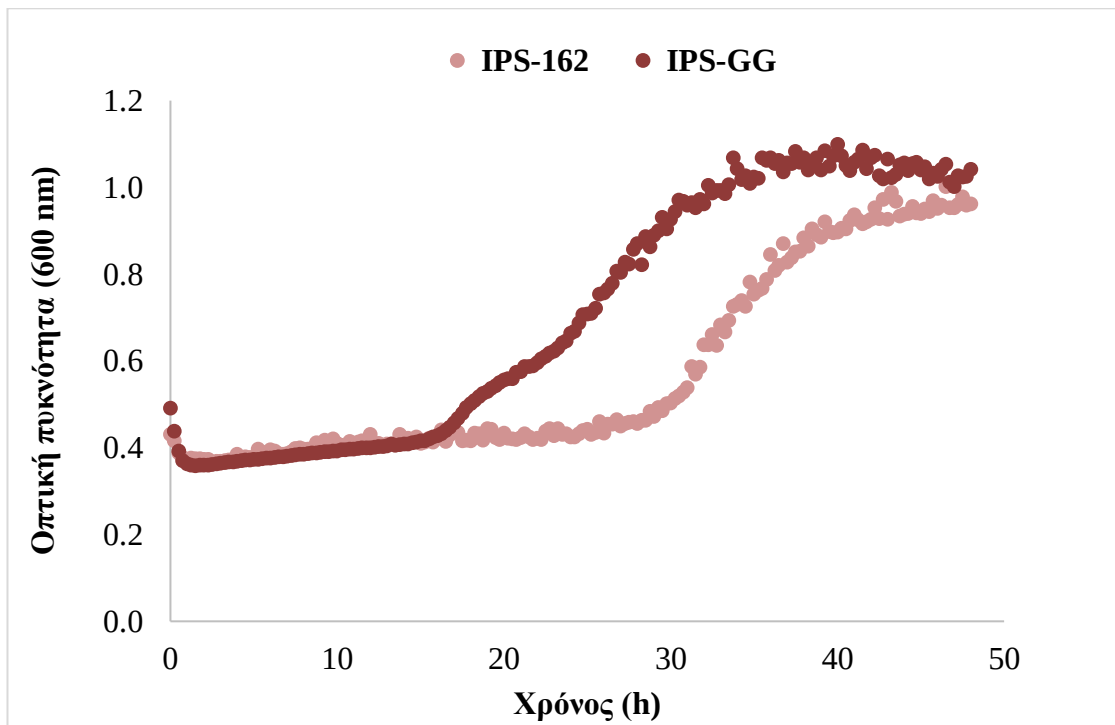
Το γαλακτικό βακτήριο *L. plantarum* F_162 έχει απομονωθεί από δείγμα λευκού τυριού τύπου φέτας από τυροκομείο της Κεφαλονιάς και έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί ως πιθανό προβιοτικό στέλεχος ενώ το στέλεχος *L. rhamnosus* GG έχει

είδη χαρακτηριστεί ως προβιοτικό και αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα προβιοτικά εμπορικά στελέχη.

Το πείραμα αυτό αποτελεί μια αρχική μελέτη, παρόλα αυτά φαίνεται πως και τα δύο στελέχη δύνανται να καταναλώσουν τους ενδοπολυσακχαρίτες. Αυτό, έχει προσδιοριστεί σε φωτόμετρο μικροπλακών όπου καταγράφεται η οπτική πυκνότητα του δείγματος σε συνάρτηση με το χρόνο η οποία είναι ενδεικτική της μικροβιακής αύξησης.

Όπως φαίνεται από το Γράφημα 19 και στα δύο στελέχη φαίνεται να είναι ξεκινάει η απορρόφηση από 0,4 το οποίο οφείλεται στην ύπαρξη συστατικών του υποστρώματος που αυξάνουν τη θολερότητά του δείγματος. Στη συνέχεια του πειράματος φαίνεται ξεκάθαρα η πορεία της ανάπτυξής τους ενώ είναι φανερό πως στην περίπτωση του *L. rhamnosus* GG η μικροβιακή αύξηση εισέρχεται στην εκθετική φάση της αρκετά νωρίτερα (17 ώρες) σε σχέση με το *L. plantarum* F_162 το οποία εισέρχεται στην ίδια φάση μετά από 30 ώρες επώασης. Τα 2 στελέχη φτάνουν στον ίδιο βαθμό αύξησης αφού σημειώνουν ίδιες απορροφήσεις. Παράλληλα με τη μέτρηση της απορρόφησης στα στελέχη που περιέχουν το δείγμα ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε και η απορρόφηση η οποία σημειώθηκε όταν τα ίδια στελέχη αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιείχε όλα τα υπόλοιπα συστατικά εκτός από τους ενδοπολυσακχαρίτες (αζωτούχες ενώσεις, μεταλλικά άλατα) ώστε να εξακριβωθεί πως η μικροβιακή αύξηση που σημειώνεται προέρχεται αποκλειστικά από την κατανάλωση των ενδοπολυσακχαριτών. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε πως η μικροβιακή αύξηση οφείλεται στην παρουσία του ενδοπολυσακχαρίτη και όχι στην παρουσία όλων των άλλων θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προπαρασκευαστική μελέτη με αρκετά ενθαρρυντικά όμως αποτελέσματα. Συνεπώς, είναι αρκετά χρήσιμο να πραγματοποιηθεί περεταίρω έρευνα για την εύρεση κατάλληλων συνθηκών και συγκεντρώσεων για την κατανάλωση του ενδοπολυσακχαρίτη από ωφέλημα βακτήρια.



Γράφημα 21: Ανάπτυξη των γαλατικών βακτηρίων *L.rhamnosus* GG και *L. Plantarum* F_162 από την κατανάλωση ενδοπολυσακχαριτών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη εδώδιμων μυκήτων *Morchella dunalii* 4 και *Morchella dunalii* 2 τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθετικά υποστρώματα με πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη ενώ στη συνέχεια αξιοποιήθηκαν τα σάκχαρα από τα στέμφυλα οиноποίησης ώστε να εξεταστεί η ικανότητα των στελεχών αυτών να παράγουν βιομάζα και ενδοπολυσακχαρίτες. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα έρευνα παρουσιάζονται παρακάτω:

- Οι δύο μύκητες εμφάνισαν σημαντική τιμή απόδοσης της βιομάζας ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα κυρίως στα συνθετικά υποστρώματα.
- Τα σάκχαρα που βρίσκονται στα στέμφυλα δύνανται να αξιοποιηθούν από τους μύκητες της παρούσας μελέτης παρόλα αυτά παραμένει ένα φτωχό σε FAN υπόστρωμα. Είναι συνεπώς αναγκαίος ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με πηγές αζώτου ώστε να προκύψουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας.
- Η μελέτη έδειξε πως οι ενδοπολυσακχαρίτες που ανακτήθηκαν αποτελούνται από σάκχαρα και πρωτεΐνες. Επίσης, εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα.
- Οι ενδοπολυσακχαρίτες φαίνεται να μπορούν να αξιοποιηθούν ως για την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αντωνοπούλου, Π.Χ. (2022). Χαρακτηρισμός και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας με έμφαση στα εμπορικά ένζυμα μέσω ζυμώσεων υγρής κατάστασης με χρήση μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma*, MCs, Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Μαρδίτσα, Μ. (2015). Φαρμακευτικά μανιτάρια ως διαιτητικά συμπληρώματα διατροφής, πτυχιακή εργασία, Καλαμάτα: Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας.
- Μπιστικέα, Ε. (2015). Η καλλιέργεια των εδώδιμων μανιταριών *Agaricus bisporus* & *Pleurotus ostreatus* στην Ελλάδα, πτυχιακή εργασία, Καλαμάτα: Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας.
- Σπαντίδος, Τ. (2015). Τα φαρμακευτικά μανιτάρια και οι βιοδραστικές ουσίες, πτυχιακή εργασία, Καλαμάτα: Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων.
- Ashtarinezhad, A., Panahyab, A., Mohamadzadehasl, B., Vatanpour, H., & Shirazi, F. H. (2015). FTIR microspectroscopy reveals chemical changes in mice fetus following phenobarbital administration. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 14(Suppl), 121.
- Dedousi, M., Fourtaka, K., Melanouri, E. M., Argyropoulos, D., Psallida, C., Diamantis, I., & Diamantopoulou, P. (2021). Detoxification of molasses and production of mycelial mass and valuable metabolites by *Morchella* species. *Applied Sciences*, 11(20), 9481.

de Toledo, V. D. A. A., Ruvoilo-Takasusuki, M. C. C., de Oliveira, A. J. B., Chambó, E. D., & Lopes, S. M. S. (2012). Spectrophotometry as a tool for dosage sugars in nectar of crops pollinated by honeybees. *Edited by Jamal Uddin*, 269.

Dou, H., Chang, Y., & Zhang, L. (2019). Coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 163, 361-381.

Lindequist, U., Kim, H. W., Tiralongo, E., & Van Griensven, L. (2014). Medicinal mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: Ecam*, 2014.

Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12), 2849-2858.

Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 174-179.

Integrative, P. D. Q. (2016). Medicinal Mushrooms (PDQ®). In *PDQ Cancer Information Summaries [Internet]*. National Cancer Institute (US).

Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L. N., & Åman, P. (2000). HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(11), 5216-5219.

Kulshreshtha, S., Mathur, N., & Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB express*, 4, 1-7.

- Li, S., Gao, A., Dong, S., Chen, Y., Sun, S., Lei, Z., & Zhang, Z. (2017). Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 26-34.
- Litchfield, J. H., & Overbeck, R. C. (1965). Submerged culture growth of *Morchella* species in food processing waste substrates. *Proc. 1st Intern. Congr. Food Sci. Technol., London*, 2, 511.
- Malone, T., Swinton, S. M., Pudasainee, A., & Bonito, G. (2022). Economic assessment of morel (*Morchella* spp.) foraging in Michigan, USA. *Economic botany*, 76(1), 1-15.
- Meng, X., Che, C., Zhang, J., Gong, Z., Si, M., Yang, G., ... & Liu, J. (2019). Structural characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from a newly collected wild *Morchella sextelata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 608-614.
- Negi, C. S. (2006). Morels (*Morchella* spp.) in Kumaun Himalaya, Green Page (online), 9 December.
- Ower, R. (1982). Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia*, 74(1), 142-144.
- Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Papanikolaou, S., Philippoussis, A., & Diamantopoulou, P. (2019). Upgrading grape pomace through *Pleurotus* spp. cultivation for the production of enzymes and fruiting bodies. *Microorganisms*, 7(7), 207.

- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-15.
- Sande, D., de Oliveira, G. P., e Moura, M. A. F., de Almeida Martins, B., Lima, M. T. N. S., & Takahashi, J. A. (2019). Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. *Food Research International*, 125, 108524.
- Sánchez, Ó. J., & Montoya, S. (2020). Assessment of polysaccharide and biomass production from three white-rot fungi by solid-state fermentation using wood and agro-industrial residues: A kinetic approach. *Forests*, 11(10), 1055.
- Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Klarić, A. M., & Bucić-Kojić, A. (2024). Effects of Fungal Solid-State Fermentation on the Profile of Phenolic Compounds and on the Nutritional Properties of Grape Pomace. *Microorganisms*, 12(7), 1310.
- Tietel, Z., & Masaphy, S. (2018). True morels (*Morchella*)—nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(11), 1888-1901.
- Ulziijargal, E., Yang, J. H., Lin, L. Y., Chen, C. P., & Mau, J. L. (2013). Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. *Food Chemistry*, 138(1), 70-76.
- Volk, Thomas J., and Thomas J. Leonard (1990). Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94.3, 399-406.
- Zhang, J., Zhao, J., Liu, G., Li, Y., Liang, L., Liu, X., & Wen, C. (2023). Advance in *Morchella* sp. polysaccharides: Isolation, structural characterization and structure-activity relationship: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125819.