

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ : ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΣΤΑΜΑΤΗ ΜΙΧΑΗΛ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Αύγουστος , 2023

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ :
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Το όνομα του επιβλέποντος εδώ

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα και η αξιολόγηση στρατηγικών ζύμωσης για την ανάπτυξη του ιατροφαρμακευτικού μύκητα *Ganoderma lucidum* και την παραγωγή λειτουργικών συστατικών μέσω ελεγχόμενης ζύμωσης.

Ο μύκητας χρησιμοποιήθηκε σε υγρές ζυμώσεις σε στατικές και αναδευόμενες συνθήκες. Η συγκριτική αξιολόγηση τους βασίστηκε στην ικανότητα να αξιοποιούν το υπόστρωμα προς την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και στις διαφορές που εμφάνισαν ως προς τις βασικές παραμέτρους της παραγωγικότητας της βιομάζας (Q_x), τον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων (Q_s) και του συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{x/s}$). Οι αναδευόμενες συνθήκες δημιούργησαν καλύτερο περιβάλλον για την αποτελεσματική ανάπτυξη του μύκητα σε αντίθεση με τις στατικές. Η παραγωγή βιομάζας έδειξε ότι εξαρτάται άμεσα από την αρχική συγκέντρωση λακτόζης του τυρογάλακτος, ενώ η περιεκτικότητα σε άζωτο επηρέασε σημαντικά την εμφάνιση της μέγιστης παραγωγής της. Ακόμα τα πειράματα τα οποία είχαν αυξημένη περιεκτικότητα σε άζωτο εμφάνισαν ταχύτερη παραγωγή μέγιστης βιομάζας. Το πείραμα με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 12 g/L και προσθήκη οργανικού αζώτου εμφάνισε την μέγιστη παραγωγικότητα 0,70 g/L/d και τον μέγιστο συντελεστή απόδοσης $Y_{x/s}=0,58$ g/g. Αντίθετα τις μέγιστες τιμές βιομάζας και ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων, ήτοι 10,5 g/L και 1,58 g/L/d αντίστοιχα, εμφάνισε το πείραμα με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 35 g/L. Το υδατικό εκχύλισμα ενδοπολυσακχαριτών από τις αναδευόμενες καλλιέργειες έδειξε υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH, υποδηλώνοντας τις πιθανές βιολειτουργικές ιδιότητες.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate cheese whey as a low-cost substrate, using various fermentation strategies, for the growth of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum* and the production of bioactive compounds.

The fungal strain was studied under controlled submerged fermentations in static and shaking conditions. The fermentation experiments were evaluated and compared via substrate consumption and biomass production. Likewise, biomass productivity (Q_x), sugar consumption rate (Q_s) and biomass conversion yield ($Y_{x/s}$) were assessed as important parameters associated with the effectiveness of the bioprocess. In general, shaking conditions were beneficial for fungal growth compared to static cultures. Biomass production was related with the initial lactose concentration of cheese whey, whereas organic nitrogen concentration influenced process productivity, since maximum biomass was produced at an earlier fermentation timepoint. In the case of 12 g/L initial lactose and supplemented cheese whey, maximum productivity was obtained, equal to 0,70 g/L/d along with the highest conversion yield, $Y_{x/s}=0,58$ g/g. However, maximum biomass production (10,5 g/L) was obtained in the case of 35 g/L initial lactose, along with the highest lactose consumption rate (1,58 g/L/d). The aqueous intracellular polysaccharide extract of mycelial biomass showed high antioxidant activity against DPPH free radical, hence indicating the bioactive properties.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. Μακρομύκητες.....	1
1.1 Γενικά στοιχεία μακρομυκήτων.....	1
1.2 Μακρομύκητας που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.....	3
1.2.1 Μορφολογία και ταξινόμηση του μύκητα <i>Ganoderma lucidum</i>	3
1.2.2 Καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή καρποσωμάτων και μυκηλιακής βιομάζας.....	4
1.2.3 Ιατροφαρμακευτικές ιδιότητες και βιολειτουργικά συστατικά	8
1.2.4 Παραγωγή ενζύμων από το μύκητα <i>G. lucidum</i>	11
1.2.4.1 Λακάσσες.....	11
1.2.4.2 Κυτταρινάσες.....	11
1.2.4.3 Πρωτεάσες	11
1.2.4.4 Γλυκοζιτικές υδρολάσες	12
1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ορού γάλακτος.....	13
1.3.1 Βιομηχανικά απόβλητα γαλακτοβιομηχανιών.....	13
1.3.2 Σύνθεση ορού γάλακτος	16
1.3.3 Επεξεργασία και διαχείριση ορού γάλακτος.....	18
1.3.3.1 Σκόνη ορού γάλακτος	20
1.3.3.2 Λειτουργικά τρόφιμα	21
1.3.3.3 Βιοαέριο	23
1.3.3.4 Βιοπολυμερή.....	23
1.3.3.5 Εδώδιμες μεμβράνες.....	25
1.3.3.6 Βιοαιθανόλη.....	27
1.3.3.7 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP).....	28
1.4 Αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων για την ανάπτυξη μανιταριών	29
ΣΚΟΠΟΣ	35
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
2.1 Συντήρηση και ανανέωση μύκητα.....	36
2.2 Παρασκευή υγρής προκαλλιέργειας	37
2.3 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος από τα απόβλητα τυροκομίας.....	38
2.4 Συνθήκες ζύμωσης.....	40
2.5 Εκχύλιση ενδοπολυσακχαριτών	40
2.6 Αναλυτικές μέθοδοι	41
2.6.1 Προσδιορισμός pH και βιομάζας.....	41
2.6.2 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων του θρεπτικού υποστρώματος.....	42
2.6.3 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων.....	42
2.6.4 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών.....	43

2.6.5 Προσδιορισμός των πρωτεϊνών	43
2.6.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	44
III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
3.1 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 12 g/L και προσθήκη οργανικού αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη)	45
3.2 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L.....	53
3.3 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L και προσθήκη οργανικού αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη)	55
3.4 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 35 g/L.....	58
3.5 Παραγωγή λειτουργικών συστατικών	62
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΜΕΛΕΤΗ	65
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 1.1. Συστατικά τυρογάλακτος.....	17
Γράφημα 3.1: Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).	47
Γράφημα 3.2: Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια στατικής ζύμωσης του <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).	48
Γράφημα 3.3: Παραγωγικότητα βιομάζας (Q_x ,g/L/d) , Ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων (Q_s , g/L) και συντελεστής απόδοσης ($Y_{x/s}$, g/g).....	52
Γράφημα 3.4: Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L.....	55
Γράφημα 3.5: Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).	56
Γράφημα 3.6: Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 35 g/L.	59
Γράφημα 3.7: Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (TDW, g/L) στις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, με το στέλεχος <i>G. lucidum</i> υπό αναδευόμενες συνθήκες.....	60
Γράφημα 3.8: Υπολογισμός παραγωγικότητας (Q_x ,g/L/d), ρυθμού κατανάλωσης λακτόζης (Q_s , g/L/d) και συντελεστής απόδοσης ($Y_{x/s}$, g/g) στις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, με το στέλεχος <i>G. lucidum</i> υπό αναδευόμενες συνθήκες.....	61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Πίνακας 1.1: Χημική σύνθεση (g/100 g) και pH του ορού γάλακτος από διαφορετικές πηγές γάλακτος και παραγωγής τυριού	18
Πίνακας 1.2: Παραγωγή βιοαιθανόλης από ορό γάλακτος μέσω της χρήσης μικροοργανισμών και ενζύμων	27
Πίνακας 1.3: Είδη γεωργικών απορριμμάτων που χρησιμοποιούνται για τη καλλιέργεια μανιταριών	30
Πίνακας 2.1: Χημική σύσταση προκαλλιέργειας	37
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, παραγωγικότητας και ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων κατά την ανάπτυξη του μύκητα <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L	54
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, παραγωγικότητας και ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων κατά την ανάπτυξη του μύκητα <i>G. lucidum</i> σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L)	57
Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχυλίσματος.....	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα

Σελίδα

Εικόνα 1.1: Τα τέσσερα πιο καλλιεργούμενα βρώσιμα μανιτάρια παγκοσμίως.	3
Εικόνα 1.2 : <i>Ganoderma lucidum</i>	4
Εικόνα 1.3: Παραγωγή καρποσωμάτων του στελέχους <i>G. lucidum</i>	5
Εικόνα 1.4: Βιολειτουργικές ιδιότητες του στελέχους <i>G. lucidum</i>	6
Εικόνα 1.5: Χημικές δομές β-γλυκάνων που έχουν απομονωθεί από μακρομύκητες.	10
Εικόνα 1.6: Ιατροφαρμακευτικές επιδράσεις που σχετίζονται με ύπαρξη τριτερπενοειδών και πολυσακχαριτών.....	12
Εικόνα 1.7: Δομικοί τύποι γανοδερικού οξέος.	13
Εικόνα 1.8: Παραγωγή ορού γάλακτος, δευτερεύοντος ορού γάλακτος και των παραπροϊόντων τους κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού.....	14
Εικόνα 1.9: Επισκόπηση της παραγωγής αποβλήτων της τυροκομίας. Κύριες μορφές αξιοποίησης τους και αναφορά των υφιστάμενων συστημάτων επεξεργασίας.....	16
Εικόνα 1.10: Σκόνη ορού γάλακτος.....	20
Εικόνα 1.11: Διάγραμμα ροής παραγωγής σκόνης ορού γάλακτος.	21
Εικόνα 1.12: Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα υλικά για την παρασκευή εδωδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων.....	26
Εικόνα 1.13: Αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μεμβρανών και επικαλύψεων από την χρήση του ορού γάλακτος.	26
Εικόνα 2.1: Ανανέωση στελέχους <i>G. lucidum</i>	36
Εικόνα 2.2: Υγρή προκαλλιέργεια του μύκητα <i>G. lucidum</i>	38
Εικόνα 2.3: Τυρόγαλα πριν και μετά το στάδιο της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών ..	39
Εικόνα 3.1: Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του μύκητα <i>G. lucidum</i> χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπλουτισμένο τυρόγαλο σε αναδεδυόμενες (α) και στατικές (β) συνθήκες.....	46
Εικόνα 3.2: Μικροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του μύκητα <i>G. lucidum</i> χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τυρόγαλο σε στατικές συνθήκες.	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μακρομύκητες

1.1 Γενικά στοιχεία μακρομυκήτων

Οι μακρομύκητες (προέρχονται από την ελληνική λέξη «μάκρος»), περιλαμβάνουν τόσο τους ασκομύκητες όσο και τους βασιδιομύκητες . Οι ασκομύκητες περιλαμβάνουν τα περισσότερα σε αριθμό είδη μυκήτων με περισσότερα από 64.000. Οι μακρομύκητες, που γενικά αναφέρονται ως μανιτάρια, διανέμονται σε όλο τον κόσμο, με περίπου αναγνωρισμένα 14.000 είδη (Lu et al. 2020) . Περίπου 350 είδη μανιταριών καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο (Barros et al. 2008). Τα τέσσερα πιο καλλιεργούμενα βρώσιμα μανιτάρια είναι το *Agaricus bisporus* , το *Flammulina velutipes* , το *Lentinula edodes* και το *Pleurotus spp.*(Feeney et al. 2014, Valverde et al. 2015, Samsudin et al. 2019, Huang et al. 2016).

Πολλοί είναι οι άνθρωποι που καταναλώνουν τα μανιτάρια λόγω των οφελών που παρέχουν για την υγεία (Agrawal et al. 2020) , αποτελώντας έτσι την κινητήρια δύναμη στην αυξημένη αγοραία αξία των φαρμακευτικών μανιταριών. Τουλάχιστον 270 είδη μακρομυκήτων έχουν διερευνηθεί ως πηγές σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών και έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν ως συμπληρώματα διατροφής για ιατρικές εφαρμογές (Shamtsyan et al. 2010). Παραδοσιακά, αρκετά είδη μανιταριών, συμπεριλαμβανομένων των γενών *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinula*, *Trametes* και *Tremella* χρησιμοποιήθηκαν για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Panda et al. 2022). Μάλιστα, μεγάλος αριθμός από κλινικές μελέτες

έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με τις φαρμακευτικές ιδιότητες βιολειτουργικών συστατικών των μανιταριών (Panda et al. 2022).

Λόγω της αυξανόμενης ζήτησης των μανιταριών, αναμένεται ότι η συνολική αξία της παγκόσμιας αγοράς τους ετησίως θα ξεπεράσει τα 50 δισεκατομμύρια δολάρια τα επόμενα χρόνια (Raman et al. 2018) .

Κάποιες από τις ιδιότητες που προσδίνουν τα μανιτάρια είναι οι αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιυπερτασικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, ανοσοτροποποιητικές και τέλος νευροπροστατευτικές (Hyde et al. 2019, De silva et al. 2012, Badalyan et al. 2021). Αυτές οφείλονται σε πολυάριθμα συστατικά, όπως οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες, τα αλκαλοειδή, τα φαινολικά συστατικά, τα οργανικά οξέα, τα τερπένια και ειδικότερα τα τριτερπένια, τα γανοδερικά οξέα, η λεντινάνη, η σχιζοφυλλάνη και η ψιλοκυβίνη (Panda et al., 2022).

Τα φρέσκα καρποφόρα σώματα των μακρομύκητων έχουν περιεκτικότητα σε υγρασία περίπου 70-95%. Η ξηρή ουσία αποτελείται από υδατάνθρακες (50-65%), πρωτεΐνες (19-35%) και απαραίτητα λιπαρά οξέα (2-6%) με ίχνη βιταμινών και μετάλλων (Rathore et al. 2017). Τα βρώσιμα μανιτάρια αποτελούν πηγή πολλών διαφορετικών θρεπτικών ουσιών όπως: β-γλυκάνων , λεκτίνων, ακόρεστων λιπαρών οξέων, φαινολικών ενώσεων και τοκοφερόλων.



Agaricus bisporus *Flammulina velutipes* *Pleurotus spp* *Lentinula edodes*

Εικόνα 1.1 : Τα τέσσερα πιο καλλιεργούμενα βρώσιμαμανιτάρια παγκοσμίως

1.2 Μακρομύκητας που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

1.2.1 Μορφολογία και ταξινόμηση του μύκητα *Ganoderma lucidum*.

Το στέλεχος *G.lucidum* είναι ένα φαρμακευτικό μανιτάρι που χρησιμοποιείται από τα παλιά χρόνια για την θεραπεία διάφορων ασθενειών όπως ο διαβήτης , ο καρκίνος , η φλεγμονή και το έλκος . Είναι ένας λευκός βασιδιομύκητας που αναπτύσσεται σε αποσυντεθημένους κορμούς δέντρων και βρίσκεται συνήθως σε τροπικές περιοχές με περισσότερα από 80 είδη παγκοσμίως . Ανήκει στην οικογένεια μυκήτων «*polyporacea*» και είναι επίσης γνωστό με το όνομα «μανιτάρι της ευθανασίας» λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του. Η επιφάνεια του είναι πορώδης , γυαλιστερή , έχει ανοιχτό λευκό χρώμα και κατά την ωρίμανση του παράγει κόκκινα σπόρια . Ευδοκίμει σε θερμά και υγρά κλίματα και αναπτύσσεται σε μικτά δάση υποτροπικών έως εύκρατων περιοχών (Wan et al. 2016) .



Εικόνα 1.2 : *Ganoderma lucidum*

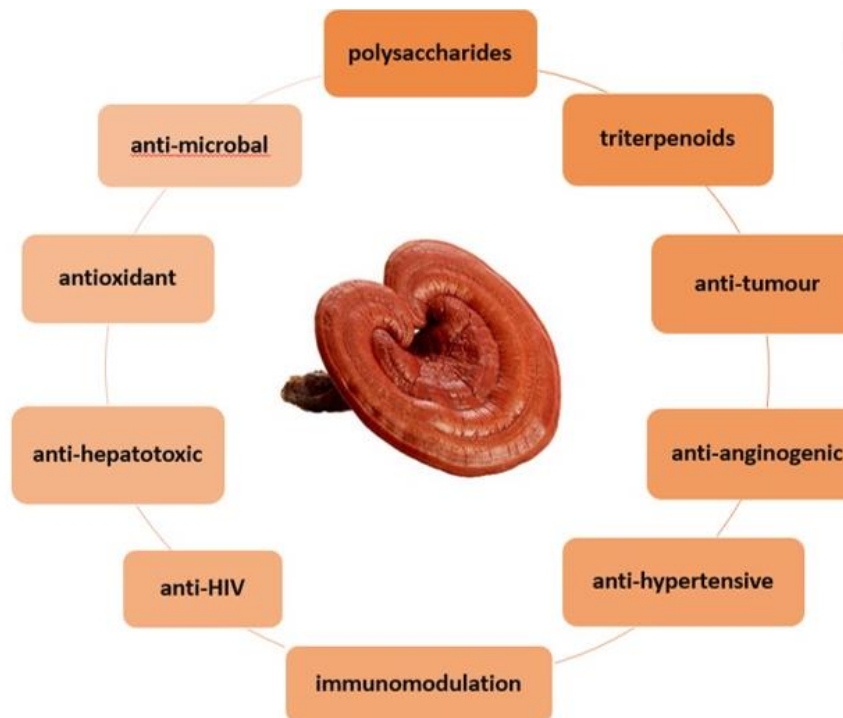
1.2.2 Καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή καρποσωμάτων και μυκηλιακής βιομάζας.

Για την παραγωγή των καρποφόρων σωμάτων, γνωστών και ως καρποσωμάτων, του μύκητα *G.lucidum* απαιτούνται τα ακόλουθα βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία ενός κατάλληλου υποστρώματος, όπως κορμοί σκληρών δέντρων ή γεωργικών απορριμμάτων, πάνω στο οποίο θα αναπτυχθεί ο μύκητας . Τα υποστρώματα αποστειρώνονται πριν την ανάπτυξη του μύκητα για την αποφυγή μολύνσεων. Αφού γίνει η προετοιμασία του υποστρώματος , πραγματοποιείται ο εμβολιασμός. Κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες με συγκεκριμένες απαιτήσεις ως προς τα επίπεδα υγρασίας, θερμοκρασίας και φωτός το μυκήλιο αποικίζει το υπόστρωμα και σταδιακά παράγονται τα καρποσώματα . Η επαρκής κυκλοφορία του αέρα και ο έλεγχος της υγρασίας αποτελούν μείζονος σημασίας για τη βέλτιστη δυνατή παραγωγή των καρποσωμάτων. Η κύρια εφαρμογή καρποσωμάτων από την παραγωγή μανιταριών είναι για τροφικές και φαρμακευτικές χρήσεις (Smith

et al. 2002). Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στον χαρακτηρισμό και την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από διαφορετικά είδη μανιταριών, όπως τα *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus eryngii*, *Poria cocos*, *Pleurotus ostreatus* και *Schizophyllum commune* (Antunes et al. 2020). Ειδικότερα, όσον αφορά στο στέλεχος *Ganoderma*, πληθώρα μελετών της ανοιχτής βιβλιογραφίας έχουν μελετήσει τις βιολειτουργικές ιδιότητες. Στη μελέτη των Cör et al., περιγράφονται οι βιολογικές δράσεις διαφόρων συστατικών που προέρχονται από το στέλεχος *G. lucidum* και αφορούν στην επίδραση έναντι στους όγκους (antitumor), οι αντιμικροβιακές (antimicrobial) και αντιοξειδωτικές (antioxidant) ιδιότητες (Cör et al., 2018). Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται συστατικά όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, φαινολικά συστατικά, στερόλες.



Εικόνα 1.3: Παραγωγή καρποσώματων του στελέχους *G. lucidum*.



Εικόνα 1.4: Βιολειτουργικές ιδιότητες του στέλχους *G.lucidum* (Cör et al. 2018).

Ωστόσο, το μεγαλύτερο τμήμα της βιβλιογραφίας που αφορά στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των συστατικών του *G. lucidum*, αφορά σε ουσίες που προέρχονται από τα καρποσώματα. Από την άλλη πλευρά, αντί να χρησιμοποιούνται καρποφόρα σώματα ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων, η χρήση μυκηλίων που αναπτύσσονται σε ελεγχόμενη υγρή καλλιέργεια, παρουσιάζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα. Ειδικότερα, μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή ομοιόμορφου προϊόντος, ευκολότερος έλεγχος της διαδικασίας σύνθεσης, υψηλότερες παραγωγικότητες και αποφυγή επιμολύνσεων (Bakratsas et al, 2021).

Η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας του *G. lucidum* εστιάζει στην καλλιέργεια και τη συγκομιδή του βλαστικού τμήματος του μύκητα. Οι κύριες τεχνικές που

χρησιμοποιούνται είναι η ζύμωση υγρής καλλιέργειας (submerged fermentations), είτε σε αναδευόμενες είτε σε στατικές συνθήκες, ενώ ενίοτε χρησιμοποιείται και η ζύμωση στερεάς κατάστασης (solid state fermentation) . Όπως προαναφέρθηκε η υγρή ζύμωση παρέχει την δυνατότητα για βελτιστοποίηση των αποδόσεων και επιτρέπει την αλλαγή των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των μεταβολιτών βελτιώνοντας έτσι άμεσα την βιοδραστηκότητά τους (Fazenda et al. 2008). Επιπλέον, καθώς οι περισσότεροι μεταβολίτες συντίθενται εξωκυτταρικά, η ανάκτησή τους είναι ευκολότερη. Αρκετές φορές προστίθενται στο υγρό της ζύμωσης διάφορες ουσίες όπως βιταμίνες ,πηγές άνθρακα κα αζώτου αλλά και διάφορα άλατα με σκοπό τη βέλτιστη μυκηλιακή ανάπτυξη. Επιπλέον τόσο η σωστή ανάδευση όσο και ο κατάλληλος αερισμός εξασφαλίζουν την ομοιόμορφη ανάπτυξη του μύκητα και αποτρέπεται η συσσώρευση του μυκηλίου . Έτσι μόλις φτάσει στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης, συλλέγεται, ξηραίνεται και υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασίες για τις αντίστοιχες εφαρμογές.

Τέλος η θερμοκρασία κατά την οποία η μυκηλιακή βιομάζα μπορεί να αναπτυχθεί αποτελεσματικά είναι μεταξύ 20-25°C . Η υγρασία πρέπει να είναι υψηλή μεταξύ 80-90% και αυτό γιατί η επαρκής περιεκτικότητα σε υγρασία στο περιβάλλον ανάπτυξης βοηθά στην πρόληψη της ξήρανσης του μυκηλίου και προάγει την υγιή ανάπτυξή του. Ακόμη το *G. lucidum* προτιμά να αναπτύσσεται σε ένα ελαφρώς όξινο έως ουδέτερο περιβάλλον με pH μεταξύ του 5,5 και του 7,5. Η διατήρηση του κατάλληλου επιπέδου pH στο μέσο ανάπτυξης ή στο υπόστρωμα βοηθά στη δημιουργία ενός βέλτιστου περιβάλλοντος για τον πολλαπλασιασμό του μυκηλίου.

Όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι αποτελούν μείζονος σημασίας για τη μελέτη και τη βελτιστοποίηση της τεχνολογίας ζύμωσης, καθώς επηρεάζουν τόσο την

ανάπτυξη του μυκηλίου όσο και την παραγωγή μεταβολιτών. Επιπρόσθετα, οι ιδιότητες των διαφορετικών μεταβολιτών ενδέχεται να επηρεάζονται και από τις συνθήκες ζύμωσης. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Li et al., τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάλογα με τη δομή των διαφορετικών κλασμάτων πολυσακχαριτών μεταβάλλονται και τα βιολειτουργικά χαρακτηριστικά τους (Li et al., 2020).

1.2.3 Ιατροφαρμακευτικές ιδιότητες και βιολειτουργικά συστατικά.

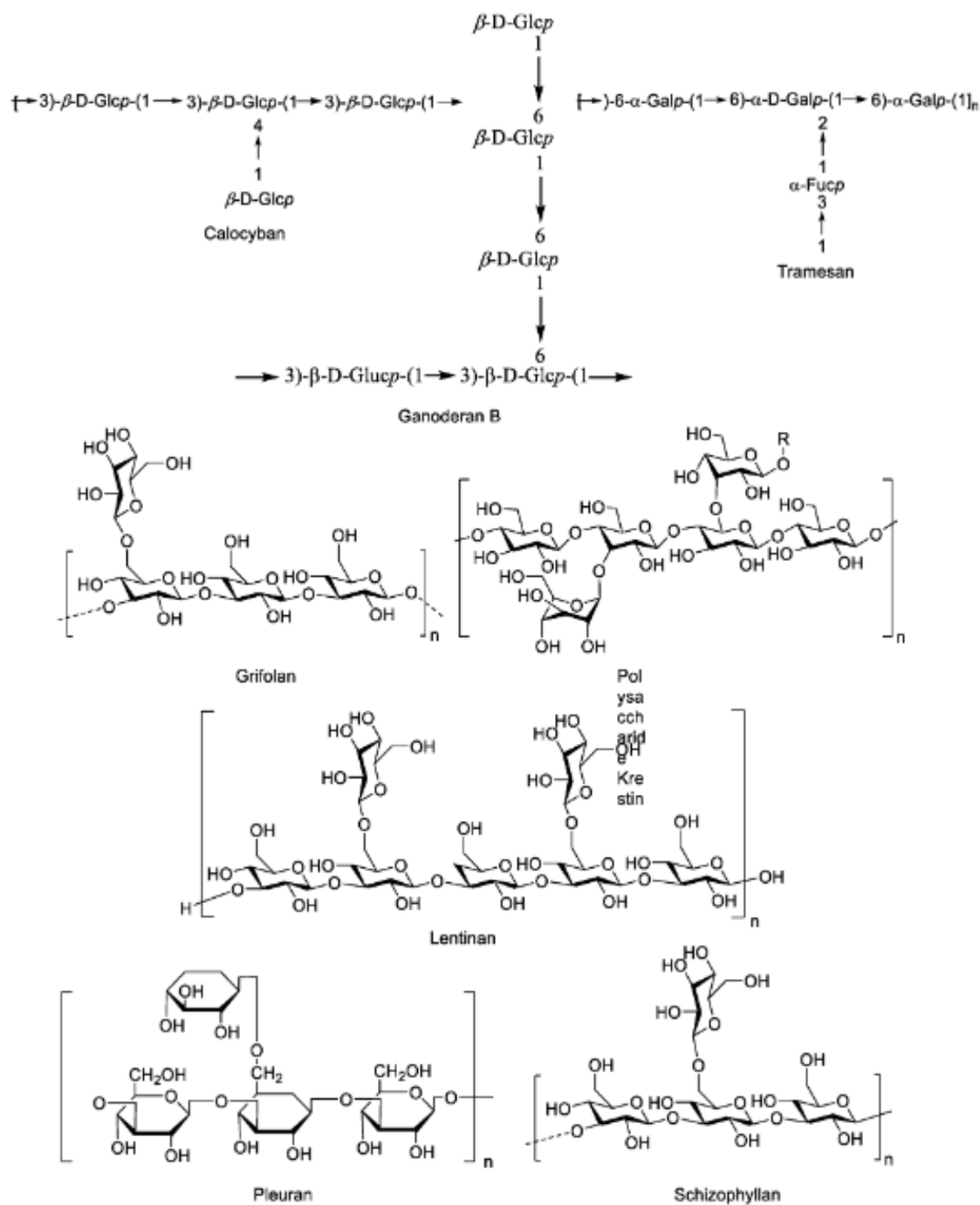
Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως το στέλεχος *G. lucidum* θεωρείται ως ένας βιοδραστικός θεραπευτικός μύκητας. Πολλές από τις επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει πως έχει ευεργετικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων των αντικαρκινικών , αντιοξειδωτικών , αντιβακτηριακών δραστηριοτήτων . Ακόμη έχει υπογλυκαιμική και ανοσορρυθμιστική δράση , βοηθά στην μείωση της αρτηριακής πίεσης , στην αποτοξίνωση του οργανισμού και τέλος στην μείωση της χοληστερίνης (Ekiz et al. 2023).

Αυτές οι βιολογικές δραστηριότητες έχουν αποδοθεί κυρίως στα προϊόντα μεταβολισμού του όπως οι πολυσακχαρίτες και τα τερπενοειδή . Οι πολυσακχαρίτες στο στέλεχος *G. lucidum* δύνανται να παράγονται ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά οπότε και ονομάζονται αντίστοιχα ενδοκυτταρικοί (intracellular) ή εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (extracellular polysaccharides). Οι πολυσακχαρίτες και ιδιαίτερα οι β-γλυκάνες είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος ,καθώς βοηθούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά διάφορες ασθένειες και μολύνσεις. Αποτελούνται κυρίως από γλυκόζη , μαννόζη , γαλακτόζη , φρουκτόζη , ξυλόζη και αραβινόζη με διαφορετικούς συνδυασμούς και τύπους γλυκοσιδικών

δεσμών. Οι δομές αλλά και η αναλογία των σακχάρων επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του υποστρώματος, τις συνθήκες ζύμωσης (π.χ. θερμοκρασία, τιμή pH). Επιπρόσθετα, οι β-γλυκάνες είναι σημαντικό συστατικό καθώς συνδέονται και με πρεβιοτικές ιδιότητες. Ειδικότερα, σε μια πρόσφατη μελέτη οι Yang et al. μελέτησαν την *in vitro* πρεβιοτική δράση ολιγοσακχαριτών από τα σπόρια του στελέχους *G. lucidum*, δεικνύοντας τη θετική επίδραση σε βακτήρια *Lactobacillus* (Yang et al., 2020).

Τα τερπενοειδή από την άλλη πλευρά είναι ποικίλες κατηγορίες οργανικών ενώσεων που συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμα του μύκητα . Το πιο σημαντικό όμως είναι το γεγονός ότι παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων με αποτέλεσμα να έχουν ορισμένες από τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν παραπάνω . Τα κύρια συστατικά τους είναι τα γανοδερικά οξέα , ενώ μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 200 παράγωγα τους τόσο στα μυκήλια όσο και στα καρποφόρα σώματα και τα σπόρια. Ακόμη αξίζει να ειπωθεί ότι η βιοενεργότητα είναι αρκετά μεγαλύτερη στα μυκήλια έναντι σε αυτή των άλλων δύο .

Τέλος κάποιες ακόμα βιοδραστικές ενώσεις των μανιταριών είναι οι λακτόνες,, τα νουκλεοτίδια , τα στεροειδή , τα αλκαλοειδή , τα πεπτίδια και διάφορα λιπαρά οξέα. (Cui et al. 2015, Liang et al. 2019).



Εικόνα 1.5: Χημικές δομές β-γλυκάνων που έχουν απομονωθεί από μακρομύκητες (Niego et al. 2021)

1.2.4 Παραγωγή ενζύμων από το μύκητα *G. lucidum*.

Ο συγκεκριμένος μύκητας θεωρείται πως είναι από τους πιο αποτελεσματικούς μικροοργανισμούς που διασπούν την λιγνίνη στην φύση , το δεύτερο πιο άφθονο οργανικό πολυμερές στον πλανήτη . Τα κυριότερα ένζυμα του *G.lucidum* περιλαμβάνουν τις παρακάτω κατηγορίες.

1.2.4.1 Λακάσες

Αναφέρονται κυρίως ως GLAC και είναι ένζυμα που περιέχουν χαλκό ενώ εμπλέκονται στην οξείδωση ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνίνης.

1.2.4.2 Κυτταρινάσες.

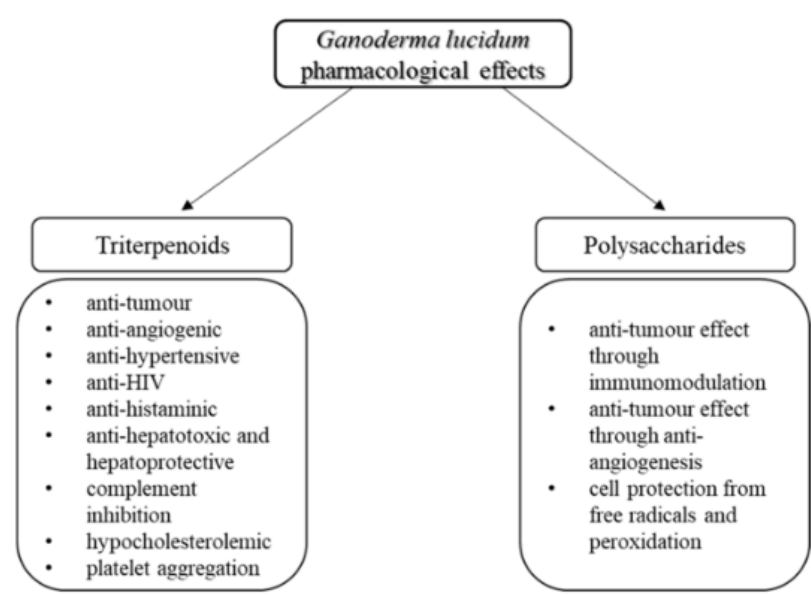
Οι κύριες κυτταρινάσες που παράγονται είναι οι ενδογλυκανάσες ,οι εξογλυκανάσες και οι β-γλυκοσιδάσες . Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι η ενδογλυκανάση 1 όπου υδρολύει τους εσωτερικούς β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς της κυτταρίνης, διασπώντας την σε απλούστερα σάκχαρα.

1.2.4.3 Πρωτεάσες

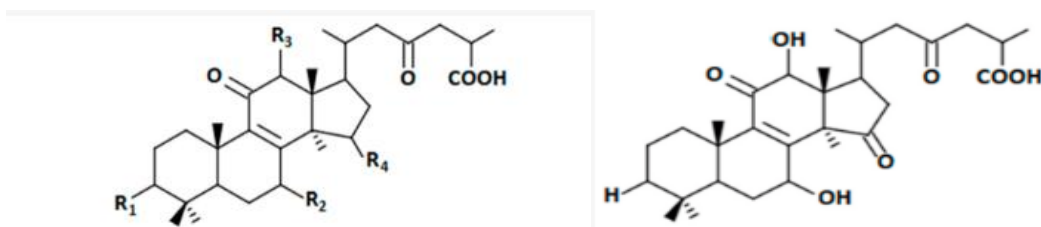
Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς στις πρωτεΐνες, διασπώντας τους σε μικρότερα πεπτίδια ή αμινοξέα με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιεί ο μύκητας τις διάφορες πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου .

1.2.4.4 Γλυκοζιτικές υδρολάσες

Παράγει διάφορες γλυκοζιτικές υδρολάσες, συμπεριλαμβανομένων των β-γλυκοζιδασών, οι οποίες συμβάλλουν στη διάσπαση σύνθετων υδατανθράκων, όπως οι πολυσακχαρίτες (Cör et al. 2018, Sasidhara et al. 2014).



Εικόνα 1.6: Ιατροφαρμακευτικές επιδράσεις που σχετίζονται με ύπαρξη τριτερπενοειδών και πολυσακχαριτών (Cör et al. 2018)



Εικόνα 1.7: Δομικοί τύποι γανοδερικού οξέος (Cör et al. 2018).

1.3 Βιοτεχνολογική αξιοποίηση ορού γάλακτος

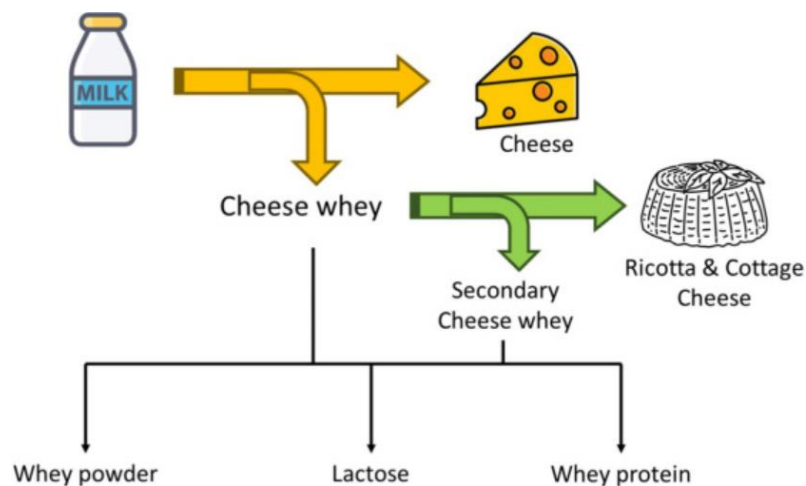
1.3.1 Βιομηχανικά απόβλητα γαλακτοβιομηχανιών

Σύμφωνα με τον FAO (Οργανισμός τροφίμων και γεωργίας) το τυρί είναι ένα από τα κύρια γεωργικά προϊόντα παγκοσμίως . Η Ευρωπαϊκή ένωση κυριαρχεί στη παραγωγή και στην κατανάλωση του , ενώ ακολουθούν οι ΗΠΑ. Από την παραγωγή οποιουδήποτε τύπου τυριού προκύπτουν αξιοσημείωτες ποσότητες λυμάτων με άμεσες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Berruga et al., 1997, Lee et al., 2003) . Σύμφωνα με τους (Demirel et al., 2005) οι τυροκομικές μονάδες αποτελούν μία από τις κύριες πηγές παραγωγής βιομηχανικών λυμάτων στην Ευρώπη καθώς βασίζονται στην επεξεργασία του νωπού γάλακτος για την παραγωγή διαφόρων τύπων τυριού . Ανεξάρτητα από τον τύπο του τυριού, η διαδικασία παρασκευής του περιλαμβάνει κοινές γενικές διαδικασίες που μπορούν να συνοψιστούν ως εξής : Το γάλα που χρησιμοποιείται στην τυροκομία αποθηκεύεται σε χαμηλή θερμοκρασία σε ανοξεϊδωτες δεξαμενές. Στη συνέχεια πήζει με την προσθήκη μικροβιακής ή φυτικής πυτιάς ενώ μετά τον απαιτούμενο χρόνο, το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση παράγει το τυρόπηγμα που κόβεται και μετατρέπεται σε εμπορικό προϊόν. Το τυρόγαλα (CW) που προκύπτει από την παραγωγή σκληρού τυριού επεξεργάζεται για να ληφθεί τυρί cottage. Η σύνθεση των βιομηχανικών λυμάτων μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα τον τελικό τύπο των προϊόντων αλλά και των επεξεργασιών που χρησιμοποιούνται (Janczukowicz et al. 2008).

Η τυροκομία είναι υπεύθυνη για τρεις τύπους λυμάτων :

- 1) Το τυρόγαλα (CW) που προκύπτει από την παραγωγή του τυριού.
- 2) Το δευτερεύον τυρόγαλα (SCW) που προκύπτει από τη παραγωγή τυριού cottage.

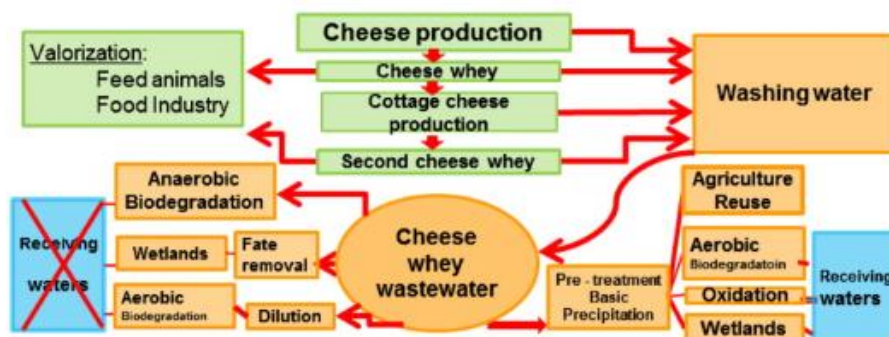
3) Το νερό πλυσίματος (CWW) το οποίο περιέχει διαφορετικά κλάσματα ορού τυρογάλακτος και/ή δευτερεύοντος τυρογάλακτος .



Εικόνα 1.8: Παραγωγή ορού γάλακτος, δευτερεύοντος ορού γάλακτος και των παραπροϊόντων τους κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού (Carvalho et al. 2013)

Περίπου το 80-90% του γάλακτος που εισέρχεται στις εγκαταστάσεις παραγωγής τυριού μετατρέπεται σε ορό γάλακτος, ενώ εκτιμάται ότι παράγονται 180-190 εκατομμύρια τόνοι απορριμμάτων ορού γάλακτος παγκοσμίως κάθε χρόνο (Chandrapala et al. 2015, Flinois et al. 2019). Με βάση την ετήσια αύξηση που υπολογίζεται στο 1-2%, η παραγωγή θα ανέλθει σε περίπου 203-241 εκατομμύρια τόνους το 2030. Από αυτό το σύνολο, 40 εκατομμύρια τόνοι παράγονται μόνο εντός της ΕΕ (Zotta et al. 2020). Οι υψηλοί όγκοι αποβλήτων ορού γάλακτος που παράγονται παρουσιάζουν περιβαλλοντικούς κινδύνους και η επεξεργασία των λυμάτων είναι απαραίτητη εξαιτίας αυτών (Buchanan et al. 2023)

Μερικά από τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα απόβλητα αυτά είναι το σχετικά υψηλό οργανικό φορτίο, αλλά και το BOD (η ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την αποσύνθεση του) και COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο για την οξείδωση της οργανικής ύλης). Σύμφωνα με τους Chatzipaschali et al., το COD μπορεί να κυμανθεί από 50 έως 80 g/L , ενώ το BOD μπορεί να κυμανθεί από 40 έως 60 g/L (Chatzipaschali et al. 2012) . Η παρουσία οργανικής ουσίας οφείλεται κυρίως λόγω των υδατανθράκων που υπάρχουν στο γάλα όπως η λακτόζη αλλά και των πρωτεϊνών όπως η καζεΐνη . Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε λίπος , τα αιωρούμενα στερεά και τα θρεπτικά συστατικά (N και P) συμβάλλουν σημαντικά στα επίπεδα μόλυνσης .Χωρίς την κατάλληλη επεξεργασία τα λύματα ενέχουν σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους (Rivas et al. 2011) , ενώ οι κύριες διεργασίες που προτείνονται για την αντιμετώπιση τους αποτελούν βιολογικής και φυσικοχημικής φύσης (Kushwaha et al. 2010). Τέλος σύμφωνα με την εφαρμογή της ανάλυσης του κύκλου ζωής (LCA) η τυροκόμηση έχει τις υψηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις στην αβιοτική καταστροφή , στην καταστροφή της στοιβάδας του όζοντος και τις σωρευτικές κατηγορίες ενεργειακής ζήτησης κυρίως λόγω των ενεργειακών αναγκών που απαιτούνται σε διαφορετικές παραγωγικές διαδικασίες (Gonzalez-Garcia et al. 2013b).



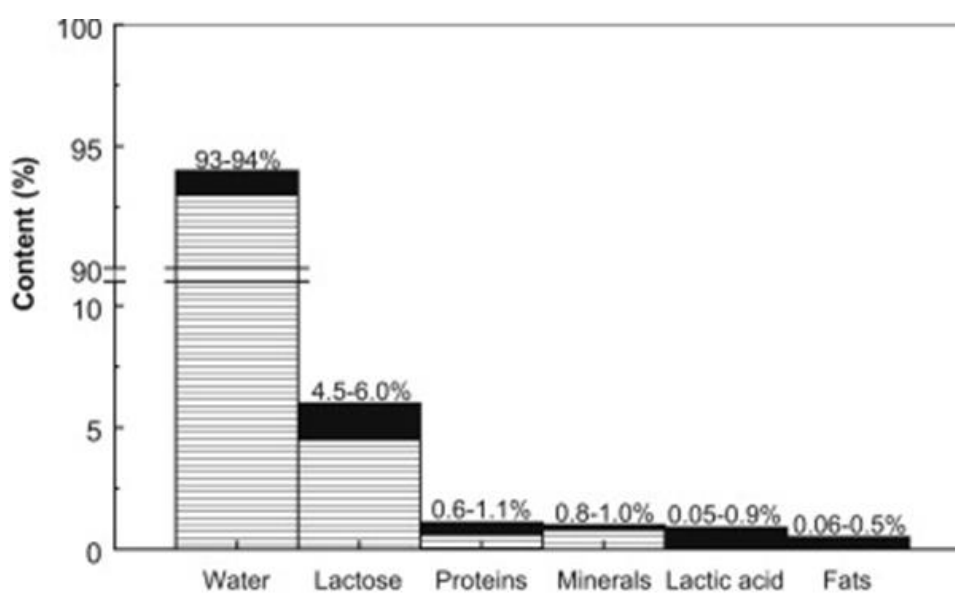
Εικόνα 1.9: Επισκόπηση της παραγωγής αποβλήτων της τυροκομίας. Κύριες μορφές αξιοποίησης τους και αναφορά των υφιστάμενων συστημάτων επεξεργασίας (Carvahlo et al. 2013) .

1.3.2 Σύνθεση ορού γάλακτος

Το τυρόγαλα ή αλλιώς ορός γάλακτος είναι ένα πρασινοκίτρινο υγρό που λαμβάνεται μετά την καθίζηση της καζεΐνης κατά την διαδικασία παραγωγής τυριού. Αποτελεί μείζονος σημασίας για τις γαλακτοβιομηχανίες λόγω του μεγάλου παραγόμενου όγκου. Περίπου το 90% του όγκου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού μετατρέπεται σε ορό γάλακτος, ο οποίος διατηρεί περίπου το 55% των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στο γάλα (Dragone et al., 2009 , Venetsaneas et al., 2009). Ειδικότερα σύμφωνα με τους Lappa et al., για την παραγωγή 1 kg τυριού προκύπτουν περίπου 9 L τυρογάλακτος, Το τυρόγαλα αποτελείται περίπου από 93-94% νερό , 4-4,5 % λακτόζη , 0,6-0,8% διαλυτές πρωτεΐνες , 0,8-1 % άλατα και 0,4-0.5% λιπίδια (Dragone et al., 2011). Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζονται από την ποιότητα του γάλακτος, των ζώων, των ζωοτροφών, της υγείας και άλλων παραγόντων (Prazeres et al., 2012). Έτσι λόγω του τεράστιου παραγόμενου

όγκου τυρογάλακτος , απαιτείται η βέλτιστη διαχείριση του για την αποφυγή σημαντικών οικολογικών προβλημάτων .

Επιπλέον κάτι ακόμη που αξίζει να αναφερθεί είναι πως το τυρόγαλα μπορεί να είναι έως και 100 φορές πιο ρυπογόνο από τα διάφορα άλλα οικιακά λύματα. (Mockaitis et al. 2006; Smithers 2008) .Για αυτόν τον λόγο απαιτείται η συμμόρφωση των βιομηχανιών με την νομοθεσία ως αναφορά την ορθή διαχείριση τού και η εύρεση εναλλακτικών λύσεων για την επαναχρησιμοποίηση του ρεύματος αυτού, ειδικότερα στα πλαίσια της μετάβασης στην κυκλική οικονομία .



Γράφημα 1.1 : Συστατικά τυρογάλακτος (Prazeres et al. 2012)

Πίνακας 1.1 : Χημική σύνθεση (g/100 g) και pH ορού γάλακτος από διαφορετικές πηγές γάλακτος και παραγωγής τυριού (Prazeres et al. 2012)

Κατηγορία	pH	Λίπος	Λακτόζη	Πρωτεΐνη	Συνολικά στερεά
Αγελαδινός ορός γάλακτος	6	0.20	5.00	0.80	6.60
Αγελαδινός ορός γάλακτος (Από cottage)	4.6	0.04	4.90	0.75	5.50
Αγελαδινός ορός γάλακτος (Από γραβιέρα)	6.3	0.60	4.90	0.90	6.90
Αγελαδινός ορός γάλακτος (Από κεφαλοτύρι)	6.4	0.40	4.85	0.80	6.55
Αγελαδινός ορός γάλακτος (Από τύπου φέτα)	6.3	0.25	4.72	0.82	6.32
Βουβαλίσιος ορός γάλακτος	ΔΥ	0.50	4.90	0.73	6.50
Κατσικίσιος ορός γάλακτος	ΔΥ	ΔΥ	4.10	0.40	5.10
Πρόβειος ορός γάλακτος	ΔΥ	1.50	3.70	1.80	9.50
Πρόβειος ορός γάλακτος (Από γραβιέρα)	6.2	0.70	4.99	1.41	7.48
Πρόβειος ορός γάλακτος (Από κεφαλοτύρι)	6.3	1.26	5.27	1.52	8.74
Πρόβειος ορός γάλακτος (Από φέτα)	ΔΥ	0.39	5.33	1.61	7.87

1.3.3 Επεξεργασία και διαχείριση ορού γάλακτος.

Παλαιότερα τα τυροκομία ως επί το πλείστον συνήθιζαν να απορρίπτουν τα λύματα τους σε δημόσια συστήματα αποχέτευσης χωρίς καμία επεξεργασία , να τα αποθηκεύουν σε ειδικά διαμορφωμένες δεξαμενές ή ακόμη και να τα χρησιμοποιούν ως ζωοτροφές. Επιπλέον μια ακόμη εναλλακτική τεχνική ήταν η αραίωση του τυρογάλακτος με οικιακά λύματα . Ωστόσο, ακόμη και τα αραιωμένα λύματα μπορεί να βλάψουν την αποτελεσματικότητα και τη σταθερότητα των μικροοργανισμών σε βιολογικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Σε κάθε περίπτωση , όλες οι προαναφερθείσες λύσεις δεν είναι επαρκώς αποτελεσματικές, ειδικά για τα μικρομεσαίες επιχειρήσεις, καθώς η

διαχείριση των λυμάτων αποτελεί σημαντική πρόκληση λόγω των αυστηρών νομικών απαιτήσεων.

Υπάρχουν τρεις επιλογές για τη διαχείριση των λυμάτων κατά την παραγωγή του τυριού . Η πρώτη βασίζεται στη χρήση τεχνολογίας όπου σκοπός της είναι η ανάκτηση σημαντικών συστατικών όπως οι πρωτεΐνες και η λακτόζη. Σύμφωνα με τους Panesar et al. 2007 , κάθε λίτρο τυρογάλακτος περιλαμβάνει περίπου 50 g λακτόζης και 10 g πρωτεϊνών με σημαντική θρεπτική και λειτουργική αξία. Η παραγωγή σκόνης ορού γάλακτος υπερσχύει επί του παρόντος στις διαδικασίες αξιοποίησης του, ως η προτιμώμενη μέθοδος επεξεργασίας αυτού του παραπροϊόντος.

Η δεύτερη και πολύ υποσχόμενη οδός αξιοποίησης του τυρογάλακτος αφορά στην αξιοποίηση του μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης βιολογικών, χημικών ή και ενζυμικών μεθόδων, οι οποίες μπορεί να συνδυάζονται και με μεθόδους κλασμάτωσης της βιομάζας. Η κλασμάτωση του τυρογάλακτος δύναται να οδηγήσει στην παραγωγή ενός κλάσματος πλούσιου σε πρωτεΐνη και του κλάσματος που είναι πλούσιο σε λακτόζη. Ειδικότερα η διεργασία της ελεγχόμενης ζύμωσης με διάφορα μικροβιακά στελέχη για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση..

Η τρίτη και τελευταία επιλογή είναι η εφαρμογή φυσικοχημικών επεξεργασιών όπως η πήξη-κροκίδωση, ο οζονισμός, η θερμική και ισοηλεκτρική κατακρήμνιση, η όξινη και αλκαλική κατακρήμνιση, η ηλεκτροχημική οξείδωση κ.α. Ακολουθώντας, παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα που αντιστοιχούν σε κάποιες από τις κατηγορίες αυτές.

1.3.3.1 Σκόνη ορού γάλακτος

Η παραγωγή σκόνης ορού γάλακτος είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς τρόπους χρήσης του τυρογάλακτος . Παρόλο που η ξήρανση του ορού γάλακτος αντιπροσωπεύει το 70% της ετήσιας επεξεργασίας του, η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών οδήγησε στην εξερεύνηση εναλλακτικών τρόπων μετατροπής του ορού γάλακτος σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας.



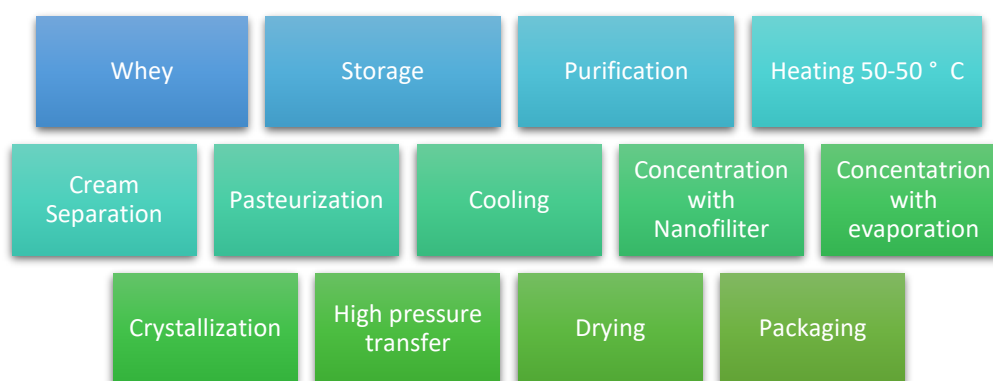
Εικόνα 1.10: Σκόνη ορού γάλακτος.

Η παραγωγή της σκόνης συνήθως περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες:

- A) Την διαύγαση του ορού γάλακτος
- B) Τον διαχωρισμό της κρέμας και στην συνέχεια την παστερίωση
- Γ) Την συγκέντρωση των ολικών στερεών με την χρήση της εξάτμισης
- Δ) Την κρυστάλλωση της λακτόζης και τέλος
- Ε) Την ξήρανση του ορού

Εάν δεν πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση της λακτόζης η παραγόμενη σκόνη είναι κατάλληλη μόνο για ζωοτροφές ως εναλλακτική φθηνή πηγή πρωτεϊνών και

υδατανθράκων υψηλής ποιότητας. Ωστόσο απαιτούνται υψηλές επενδύσεις για την αγορά του απαραίτητου εξοπλισμού και υψηλή κατανάλωση ενέργειας κατά την παραγωγή (Dragone et al. 2011) .



Εικόνα 1.11:Διάγραμμα ροής παραγωγής σκόνης ορού γάλακτος

(www.farkprocess.com)

1.3.3.2 Λειτουργικά τρόφιμα

Τα λειτουργικά τρόφιμα και ποτά είναι μια από τις πιο φιλόδοξες και καινοτόμες κατηγορίες στη βιομηχανία τροφίμων που συνεχίζουν να προκαλούν μεγάλο ενδιαφέρον σε πολλούς καταναλωτές καθώς προσφέρουν οφέλη για την υγεία πέρα από τη βασική καθημερινή διατροφή. Την τελευταία δεκαετία , ο ορός γάλακτος και τα συστατικά του χρησιμοποιούνται στην παραγωγή λειτουργικών ποτών και τροφίμων, είτε μόνα τους είτε με προσθήκη χυμών φρούτων , γάλακτος , πρόσθετων θρεπτικών συστατικών και πρεβιοτικών (Özer and Evrendilek 2022) . Ως εκ τούτου υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα ροφήματα πρωτεΐνης στην αγορά τα οποία έχουν ως βάση το τυρόγαλα. Ένα καινοτόμο παράδειγμα από τους (Kadyan et al. 2021) αποτελεί η

δημιουργία ενός ανθρακούχου ροφήματος με καλή αντιμικροβιακή ιδιότητα έναντι παθογόνων στελεχών . Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί πως η αντιμικροβιακή του δράση επηρεάστηκε άμεσα από το στέλεχος το οποίο χρησιμοποιήθηκε λόγω της παραγωγής βακτηριοσινών και οξέων . Παρόλα αυτά οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν θα μπορούσαν εύκολα να ενσωματωθούν στις γραμμές παραγωγής των βιομηχανιών , ελαχιστοποιώντας έτσι τον όγκο των λυμάτων και το κόστος επεξεργασίας τους . Μερικά ακόμη παραδείγματα λειτουργικών προϊόντων περιλαμβάνουν τις πρωτεϊνικές μπάρες ,τα γιαούρτια και τα παγωτά με έξτρα πρωτεΐνη , τις μπάρες δημητριακών και τα βρεφικά παρασκευάσματα.

Από την άλλη πλευρά η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών για την ζύμωση του ορού γάλακτος θα μπορούσε να παρέχει ποτά με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό οξύ ή τονωτικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη, τα οποία θεωρούνται προϊόντα προστιθέμενης αξίας για τη γαλακτοκομική βιομηχανία , ικανοποιώντας έτσι και την αυξημένη ζήτηση για τα γαλακτοκομικά προϊόντα παγκοσμίως. Μερικά παραδείγματα ποτών που παράγονται με αερόβιες ζυμώσεις περιλαμβάνουν τη κομπούχα ή το κεφίρ τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα (οξικό και γαλακτικό οξύ αντίστοιχα). Τέλος σύμφωνα με τους (Marcus et al. 2021) κάποια στελέχη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν και θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικά για την παραγωγή νέων προϊόντων προστιθέμενης αξίας είναι τα : *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Dekkera anomala*, *Brettanomyces claussenii* και *Brettanomyces bruxellensi* .

1.3.3.3 Βιοαέριο

Η χρήση των αποβλήτων για τη παραγωγή βιοαερίου και στην μετέπειτα χρήση του για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μπορεί να παρέχει τόσο περιβαλλοντικά όσο και οικονομικά οφέλη. Ωστόσο λόγω της υψηλής οργανικής και χαμηλής ρυθμιστικής του ικανότητας, η αναερόβια χώνευση του τυρογάλακτος οδηγεί σε έκλυση οξέος και χαμηλή παραγωγή βιοαερίου. Επομένως για την αύξηση της παραγωγικότητας ο ορός γάλακτος θα πρέπει να αναμιγνύεται με άλλους τύπους αποβλήτων (Jasko et al. 2011) .

1.3.3.4 Βιοπολυμερή

Η χρήση της λακτόζης του τυρογάλακτος ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοαποδομήσιμων πολυμερών έχει έρθει πρόσφατα στο επίκεντρο, με απώτερο στόχο την αντικατάσταση των συμβατικών πετροχημικών πλαστικών. Πληθώρα μελετών αφορούν στη μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ (lactic acid) μέσω διεργασιών ζύμωσης με διάφορα στελέχη του είδους *Lactobacillus* (Mollea et al. 2013). Το παραγόμενο γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις πολυμερισμού για την παραγωγή πολύ-γαλακτικού οξέος (Polylactid acid, PLA) . Τα PLA που παράγονται με αυτόν τον τρόπο μπορούν να βρουν χρήση στις βιομηχανίες τροφίμων, στο γεωργικό τομέα και σε προϊόντα αυτοματισμού, ενώ σημαντικό χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται ως GRAS και μπορούν να βρουν εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων . (Chalermthai et al. 2021).

Μια ακόμη κατηγορία βιοπολυμερών που μπορούν να παραχθούν από το τυρόγαλα, είναι οι πολυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs). Πρόκειται για

βιοπολυμερή που συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά στους μικροοργανισμούς όταν βρίσκονται σε συνθήκες περιοριστικές για την ανάπτυξη τους, ενώ υπάρχει περίσσεια πηγή άνθρακα. Έχουν την μορφή κόκκων και τα χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί με σκοπό την επιβίωση τους. Κυρίαρχη ομάδα αποτελεί ο πολυδροξυβουτιρικός εστέρας (PHB). Τα PHAs έχουν παρόμοιες μηχανικές και φυσικές ιδιότητες με τα συνθετικά πολυμερή αλλά διαφέρουν κυρίως ως προς την βιοσυμβατότητα τους και την βιοαποικοδόμηση τους. Επομένως μέσω της αξιοποίησης του τυρογάλακτος για την εμπορική παραγωγή των PHAs και την εφαρμογή τους στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, ενισχύεται η έννοια της κυκλικής οικονομίας και της βιώσιμης ανάπτυξης (Bosco et al. 2021).

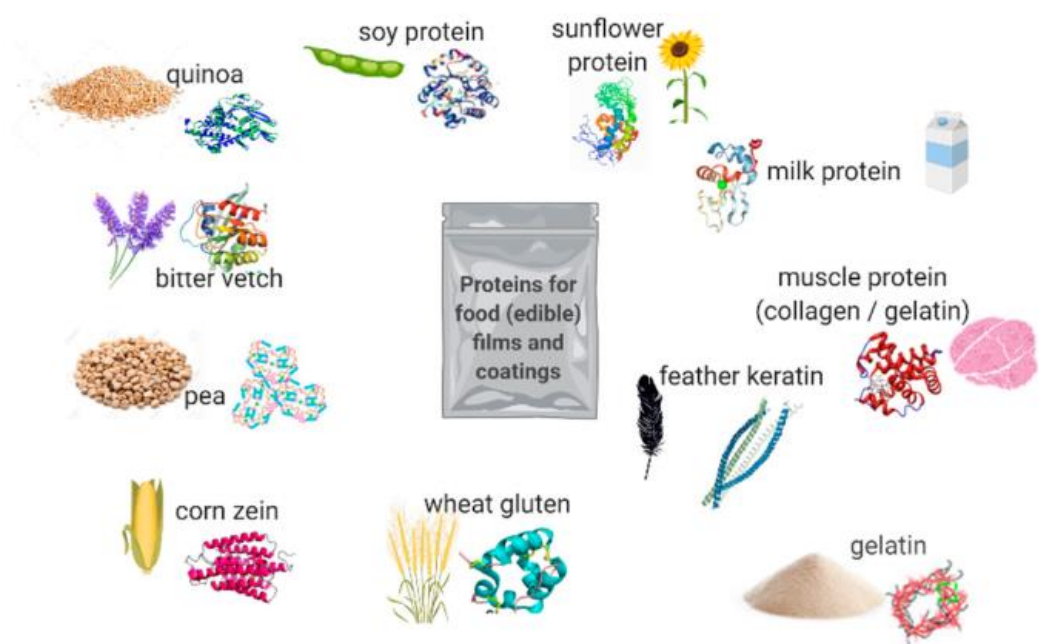
Ακόμη, το τυρόγαλο έχει αξιολογηθεί για την παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης, η οποία είναι ένα βιοπολυμερές με μεγάλο εύρος πιθανών εφαρμογών, το οποίο περιλαμβάνει τη βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακοβιομηχανία και τον τομέα των καλλυντικών. Ωστόσο, η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης από τη λακτόζη του τυρογάλακτος παρουσιάζει χαμηλή παραγωγικότητα σε σύγκριση με τα συνθετικά υποστρώματα, γεγονός που αυξάνει το κόστος παραγωγής και καθιστά την διεργασία μη συμφέρουσα (Kolesovs et al. 2020).

1.3.3.5 Εδώδιμες μεμβράνες

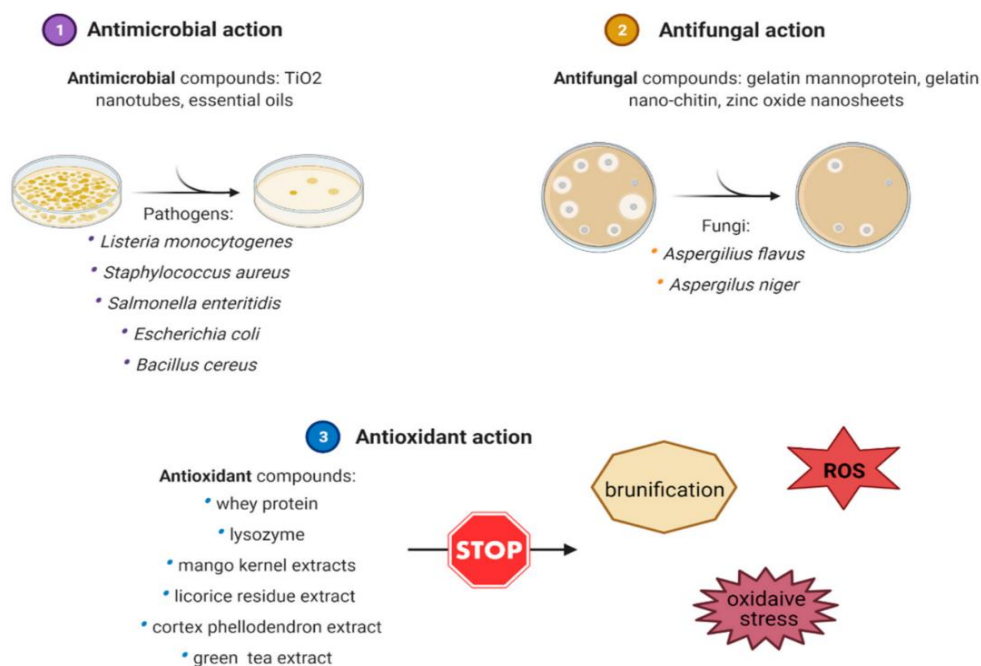
Η αυξημένη ζήτηση για συσκευασίες φιλικές προς το περιβάλλον έχει επιταχύνει την έρευνα για τις συσκευασίες βιολογικής προέλευσης. Οι βρώσιμες ή βιοαποικοδομήσιμες μεμβράνες αποτελούν πράσινες εναλλακτικές των πετροχημικών πλαστικών και βοηθούν επίσης στη μετρίαση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Μερικά

από τα βασικότερα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι ότι μπορούν να αντικαταστήσουν ή να ενισχύσουν τα υπάρχοντα φυσικά στρώματα, να διατηρήσουν την υπάρχουσα υγρασία , να αποτρέψουν την απώλεια σημαντικών πτητικών συστατικών και το κυριότερο από όλα μπορούν να καταναλωθούν μαζί με το προϊόν χωρίς να χρειαστεί η αφαίρεση τους (De Castro et al. 2017) .

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2. οι μεμβράνες που προέρχονται από ορό γάλακτος παρουσιάζουν μια πληθώρα πλεονεκτημάτων και ξεχωρίζουν επίσης όσον αφορά αυξημένες ιδιότητες φραγμού οξυγόνου . Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά βιοδιασπώμενα υλικά για την αντικατάσταση των παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων μεμβρανών από νάilon ή πολυεστέρα . Ωστόσο σύμφωνα με τους (Basiak et al. 2017) για την ανάπτυξη νέων οικολογικά αποδοτικών προϊόντων συσκευασίας τροφίμων με αυξημένη αντοχή στη μεταφορά και την απορρόφηση της υγρασίας, το τυρόγαλα πρέπει να αναμειχθεί με κατάλληλους πλαστικοποιητές όπως σορβιτόλη ή η γλυκερόλη .



Εικόνα 1.12: Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα υλικά για την παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων (Mihalca et al. 2021).



Εικόνα 1.13: Αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μεμβρανών και επικαλύψεων από την χρήση του ορού γάλακτος (Mihalca et al. 2021)

1.3.3.6 Βιοαιθανόλη

Η παραγωγή βιοαιθανόλης αποτελεί μια ακόμη εναλλακτική λύση . Το γεγονός ότι δεν παράγονται τοξικές ουσίες κατά την παραγωγή της , την κάνουν να είναι και αποτελεσματική όσον αφορά στη μείωση της μόλυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα αλλά και στη μετρίαση της παγκόσμιας υπερθέρμανσης του πλανήτη. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί πως η άμεση αξιοποίηση της λακτόζης και των άλλων συστατικών του τυρογάλακτος σε βιοαιθανόλη είναι ελάχιστα ανταγωνιστική σε σύγκριση με τις τρέχουσες υπάρχουσες τεχνολογίες οι οποίες χρησιμοποιούν για παράδειγμα την λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα ως πρώτη ύλη , διότι παράγονται αρκετά χαμηλές ποσότητες (απόδοση=2-3%) και απαιτούνται αρκετά υψηλές επενδύσεις (Das et al. 2016) .

Πίνακας 1.2: Παραγωγή βιοαιθανόλης από ορό γάλακτος μέσω της χρήσης μικροοργανισμών και ενζύμων (Okamoto et al. 2019)

Υπόστρωμα	Μικροοργανισμός/Ενζύμο
Ακατέργαστος ορός γάλακτος	Γενετικά τροποποιημένο στέλεχος <i>S.cerevisiae</i>
Ακατέργαστος ορός γάλακτος	<i>K. marxianus</i> ETP87
Ορός γάλακτος	<i>S. fragilis</i> IZ 275
Σκόνη ορού γάλακτος	<i>E. coli</i>
Σκόνη ορού γάλακτος	<i>K. lactis</i> β-galactosidase
Σκόνη ορού γάλακτος	<i>K. marxianus</i> και <i>S.cerevisiae</i>

1.3.3.7 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP)

Η παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) αποτελεί ένα από τα βήματα για την επίλυση του προβλήματος της αυξανόμενης ζήτησης για καινοτόμες και εναλλακτικές πηγές τροφίμων. Η μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP) αναφέρεται σε έναν τύπο πρωτεΐνης που παράγεται από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζυμομύκητες, μύκητες ή φύκια, και μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα πρωτεΐνης σαν εναλλακτική λύση για την αντικατάσταση ακριβών συμβατικών πηγών όπως το κρέας σόγιας και το κρέας ψαριού (Celik K et al. 2016) .

Η χρήση ορού γάλακτος ως υπόστρωμα για την παραγωγή SCP μπορεί να μειώσει σημαντικά την περιβαλλοντική ρύπανση και να οδηγήσει στην παραγωγή προϊόντος προστιθέμενης αξίας. Τόσο ο ορός γάλακτος όσο και το διήθημα του αποτελούν ένα υπόστρωμα το οποίο μπορούν να αξιοποιήσουν οι μικροοργανισμοί μέσω της άμεσης κατανάλωσης της λακτόζης ή έμμεσα μετά από την υδρόλυση της με την χρήση κατάλληλων χημικών ή βιολογικών διεργασιών. Τα στελέχη *Kluyveromyces marxianus* και *Kluyveromyces fragilis* είναι αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο για την παραγωγή SCP από ορό γάλακτος .

Ωστόσο, στα πλαίσια της μετάβασης στη βιοοικονομία και της ανάπτυξης προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, επιδιώκεται η ενσωμάτωση βιοδιεργασιών για την αξιοποίηση του τυρογάλακτος οι οποίες θα συνδράμουν και στην οικονομική ανάπτυξη των επιχειρήσεων και τη διασφάλιση της βιωσιμότητας.

1.4 Αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων για την ανάπτυξη μανιταριών.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της βιομηχανίας επεξεργασίας και μεταποίησης τροφίμων παράγει διάφορα απόβλητα ρεύματα και παραπροϊόντα, τα οποία ωστόσο είναι πηγή πλούσιων θρεπτικών συστατικών. Υπάρχουν αρκετές επιλογές για την διαχείριση και την απόρριψη τους ωστόσο δεν υπάρχει κάποια ενιαία διαδικασία η οποία να εφαρμόζεται σε όλους τους τύπους αποβλήτων. Η τάση που επικρατεί είναι να μετατρέπονται σε χρήσιμα προϊόντα (π.χ. βασικά ή ενδιάμεσα χημικά, βιοπολυμερή, βιοκαύσιμα) μέσω της χρήσης μικροοργανισμών, ώστε να σχεδιάζονται διαδικασίες αξιοποίησης τους στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας. Υπάρχει συνεπώς μεγάλη ζήτηση για την εδραίωση μεθόδων οι οποίες θα είναι οικονομικά αποδοτικές και θα παράλληλα στην αντιμετώπιση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Η αξιοποίηση των αποβλήτων για την καλλιέργεια μυκήτων πληροί αυτές τις προϋποθέσεις .

Διάφορες μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν ασχοληθεί με τη χρησιμοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων ως θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη μανιταριών. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα παραπροϊόντα είναι οι πυρήνες των φρούτων, το άχυρο σίτου , το άχυρο ρυζιού , η μελάσα , το άχυρο καφέ , τα φύλλα μπανάνας , τα φύλλα τσαγιού , το άχυρο βαμβακιού, τα απόβλητα της οινοποίησης κ.α. Στην συνέχεια παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα με διάφορα στελέχη μανιταριών (Kamthan et al. 2017)

Πίνακας 1.3: Είδη γεωργικών απορριμμάτων που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια μανιταριών. (Munekata et al., 2021, Tropea, 2022, Karimi et al., 2018)

Γεωργικά απόβλητα	Στελέχη
Κόκκοι ρυζιού	<i>Pleurotus sp.</i>
Αχυρο σίτου	<i>Pleurotus sp.</i>
Φύλλα τσαγιού	<i>Pleurotus sp.</i>
Φύλλα μπανάνας	<i>Pleurotus sp.</i>
Αχυρο σίτου	<i>Agaricus bisporus</i>
Πίτουρο ρυζιού	<i>Lentinula edodes</i>
Πολτός καφέ	<i>Lentinula edodes</i>
Φύλλα τσαγιού	<i>Volvallaella</i>
Πριονίδια	<i>Ganoderma</i>

Ο πυρήνας είναι το κύριο υπόλειμμα που παράγεται από το πάτημα των φρούτων και των ελιών για τη λήψη χυμών και ελαιόλαδου, αντίστοιχα. Αυτό το υπόλειμμα είναι ετερογενές και μπορεί να περιέχει σπόρους, πολτό, μίσχους και φλούδες, ανάλογα με την πηγή . Όσον αφορά την παγκόσμια παραγωγή χυμών και ελαιόλαδου, η ποσότητα του πυρηνέλαιου που παράγεται κάθε χρόνο φτάνει σε αρκετά εκατομμύρια τόνους. Η υψηλή περιεκτικότητά του σε οργανική ύλη, θρεπτικά συστατικά και υγρασία ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών για την αποσύνθεση αυτού του υπολείμματος (δημιουργία αερίων θερμοκηπίου, δυσάρεστες οσμές και μόλυνση των υπόγειων υδάτων) και μπορεί να προσελκύσει παράσιτα, γεγονός που

τελικά οδηγεί σε σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Επιπλέον, η κατανάλωση χυμών και ελαιόλαδου αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια. Υπό αυτή την έννοια, τα υπολείμματα από αυτούς τους δύο κλάδους της βιομηχανίας τροφίμων αναμένεται να αυξηθούν (Munekata et al., 2021)

Έτσι η αξιοποίηση των πυρήνων και των υπολειμμάτων αυτών καθίσταται μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για την ανάπτυξη μανιταριών. Ειδικότερα, στη μελέτη των Diamantis et al., μελετήθηκε η χρησιμοποίηση λυμάτων ελαιοτριβείων σε διάφορες συγκεντρώσεις, εμπλουτισμένα με γλυκόζη, ως μέσο ανάπτυξης του στελέχους *Pleurotus pulmonarius* μέσω υγρής ζύμωσης. Οι συγγραφείς διερεύνησαν την ικανότητα του μύκητα να αναπτύσσεται σε μέσα που περιέχουν τοξικές ενώσεις και τον αντίκτυπο που έχουν αυτές στην παραγωγή βιομάζας, την κατανάλωση της γλυκόζης, τη συσσώρευση πολυσακχαριτών (IPS) και τη συνολική κυτταρική βιοσύνθεση των λιπιδίων. Επίσης εξετάστηκε η παραγόμενη ποσότητα των συνολικών φαινολικών ενώσεων (TPC) και των αντιοξειδωτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η προσθήκη της γλυκόζης έδειξε θετικά αποτελέσματα στη παραγωγή βιομάζας, στα IPS και στην παραγωγή λιπιδίων, οδηγώντας έτσι σε μια αυξημένη συγκέντρωση ακόρεστων λιπαρών οξέων και TPC. Συνολικά, τα ευρήματα υποδηλώνουν την πιθανή χρήση του στελέχους *P. pulmonarius* για την αξιοποίηση των λυμάτων των ελαιοτριβείων (Diamantis et al. 2022). Σε μια αντίστοιχη μελέτη, οι Diamantopoulou et al. ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη του στελέχους *Ganoderma resinaceum* στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς την προσθήκη γλυκόζης. Μάλιστα, μελετήθηκε η παραγωγή πολυσακχαριτών, η αντιοξειδωτική ικανότητα της βιομάζας και η σύνθεση της λακάσσης. Το στέλεχος αυτό έδειξε σημαντική αποτελεσματικότητα

στη μείωση των φαινολικών ενώσεων κατά 94,5 % και στο αποχρωματισμό του υγρού της ζύμωσης κατά 76,5 % . Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την αποτελεσματική ικανότητα του στελέχους στη διάσπαση και την απομάκρυνση των φαινολικών ουσιών που συχνά υπάρχουν τα λύματα των ελαιοτριβείων και μπορεί να είναι επιβλαβείς για το περιβάλλον, καθιστώντας το έτσι ικανό για την αποτελεσματική χρήση όσον αφορά την ορθή διαχείριση τέτοιων αποβλήτων (Diamantopoulou et al. 2021).

Οι Munekata et al. ανέφεραν μια ενδιαφέρουσα ανασκόπηση σχετικά με τη χρήση του πυρήνα των μήλων , των σταφυλιών και των ελιών για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω διεργασιών ζύμωσης για τη λήψη καροτενοειδών, λιπαρών οξέων, λινολενικού οξέος και πολυφαινολών. Ακόμη μια άλλη μελέτη έδειξε ότι μέσω της αξιοποίησης του ελαιοπυρήνα από τα απόβλητα που παράγονται από τις βιομηχανίες ελαιόλαδου, μπορεί να παραχθεί ένα σημαντικό ένζυμο , η ταννάση , που ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών . Η ταννάση χρησιμοποιείται συνήθως στις βιομηχανίες τροφίμων, ζωοτροφών, ποτών, φαρμακευτικών και χημικών για την παραγωγή γαλλικού οξέος, στιγμιαίου τσαγιού, και διάφορων ποτών (Mahmoud et al. 2018). Ένα ακόμη σχετικό παράδειγμα που υποστηρίζει τη χρήση αυτού του πυρήνα στην παραγωγή ενζύμων είναι η μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Leite et al. 2003 . Σε αυτή την περίπτωση, οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν τον πυρήνα μέσω ζύμωσης με τη χρήση του μύκητα *Aspergillus niger* για τη παραγωγή ξυλανάσης και κυτταρινάσης.

Από την άλλη πλευρά η παραγωγή μικροβιακών χρωστικών για τη βιομηχανία τροφίμων αυξάνεται σταδιακά και η αξιολόγηση του ορού γάλακτος ως εναλλακτικού χαμηλού κόστους βιώσιμο ζυμωτικό υπόστρωμα έχει διερευνηθεί από τους Mehri et al.

Η μελέτη αναφέρεται στην παραγωγή χρωστικών από το στέλεχος *Monascus purpureus*, χρησιμοποιώντας αποπρωτεϊνωμένο ορό γάλακτος ως υποστρώματα με ταυτόχρονη υδρόλυση και ζύμωση. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν έρευνα σχετικά με την αξιολόγηση πολλών παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή χρωστικής, όπως το pH της ζύμωσης, η αρχική συγκέντρωση λακτόζης, η συγκέντρωση γλουταμικού μονονάτριου (MSG) ως πηγή αζώτου, η αναλογία εμβολιασμού και η κινητική της σύνθεσης χρωστικής του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Αυτή η μελέτη επεσήμανε ότι ο ορός γάλακτος είναι ένα βιώσιμο υπόστρωμα στη διαδικασία ζύμωσης για την παραγωγή της κόκκινης χρωστικής από το συγκεκριμένο στέλεχος. (Mehri et al. 2021). Η παραγωγή βιοχρωστικών μέσω της χρήσης μυκήτων έχει μελετηθεί και από τους Kantifedaki et al., όπου αξιολογήθηκαν απόβλητα εσπεριδοειδών (φλούδες πορτοκαλιού) για την ανάπτυξη των στελεχών *Monascus purpureus* και *Penicillium purpurogenum* (Kantifedaki et al. 2018).

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για την αξιολόγηση του τυρογάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μανιταριών, ωστόσο είναι σχετικά περιορισμένες. Για παράδειγμα, οι Lee et al. 2003 εφάρμοσαν πειραματικό σχεδιασμό για να αξιολογήσουν την επίδραση της τιμής pH και της θερμοκρασίας κατά την ανάπτυξη του στελέχους *G. lucidum* για την παραγωγή μυκηλίου και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκε σε pH=4.2 και θερμοκρασία 28,5 °C (Lee et al. 2003). Αντίστοιχα, πειραματικός σχεδιασμός συμπεριλήφθηκε και στη μελέτη των Song et al., σε ζύμωση στερεάς κατάστασης για την ανάπτυξη του *G. lucidum* και οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης, η τιμή pH και η θερμοκρασία (Song et al. 2007). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η

ανάπτυξη επηρεάστηκε σημαντικά από την τιμή pH και τη θερμοκρασία αλλά όχι από τη συγκέντρωση λακτόζης. Η λακτόζη από τυρόγαλα χρησιμοποιήθηκε και στη μελέτη των Tang and Zhong, ως θρεπτικό υπόστρωμα σε συνθήκες ημι-διαλείποντος έργου για την παραγωγή γανοδερικού οξέος, ενδο- και εξωπολυσακχαριτών, επιτυγχάνονται μέγιστη παραγωγή βιομάζας 21.89 ± 0.35 and 20.95 ± 0.01 g dry weight/L στο βιοαντιδραστήρα και σε κωνικές φιάλες αντίστοιχα (Tang & Zhong, 2002).

Συμπερασματικά και σύμφωνα με τις μελέτες της βιβλιογραφίας, το τυρόγαλο δύναται να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ελεγχόμενη υγρή ζύμωση για την ανάπτυξη του μύκητα *G.lucidum*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Δεδομένης της βιβλιογραφικής ανασκόπησης που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, εύκολα παρατηρείται ότι είναι περιορισμένες οι μελέτες που αφορούν στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την ανάπτυξη του μύκητα *G. lucidum* σε υγρές ζυμώσεις προς την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας καθώς επίσης και πολυσακχαριτών. Για το λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσει τη χρήση του τυρογάλακτος καθώς επίσης την επίδραση παραμέτρων, όπως η ανάδευση, η προσθήκη οργανικού αζώτου και η αρχική συγκέντρωση λακτόζης. Η ανάπτυξη του μύκητα αξιολογήθηκε μέσω της μέτρησης της βιομάζας ή ολικού ξηρού βάρους και της κατανάλωσης σακχάρων. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναδευόμενες και στατικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών καθώς επίσης η σύσταση τους αναφορικά με το ποσοστό ολικών υδατανθράκων και πρωτεΐνης αλλά και της πιθανής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, η οποία συσχετίζεται με τη βιολειτουργική δράση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συντήρηση και ανανέωση μύκητα

Για την παρούσα εργασία, επιλέχθηκε το στελέχος μύκητα *Ganoderma lucidum*, το οποίο έχει απομονωθεί από το νησί της Κεφαλονιάς. Ο συγκεκριμένος μύκητας διατηρείται στη τράπεζα μυκήτων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Ιονίου Πανεπιστημίου με έδρα το Αργοστόλι. Αφού αναπτύχθηκε σε καθαρές καλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα potato dextrose agar (PDA) , λήφθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες δίσκοι διαμέτρου 6 mm και διατηρήθηκαν με σε φιαλίδια με απιονισμένο νερό στους 5 °C .

Πριν την έναρξη της ζύμωσης απαιτείται η διαδικασία ανανέωσης του στελέχους . Επομένως αρχικά παραλαμβάνονται δισκία από τα φιαλίδια με το νερό και τοποθετούνται σε καθαρό αποστειρωμένο τρυβλίο Petri το οποίο περιέχει θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Αφού επωαστεί στους 25 °C και αναπτυχθεί πλήρως, λαμβάνονται ασηπτικά δίσκοι διαμέτρου 6 mm οι οποίοι και θα χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας.



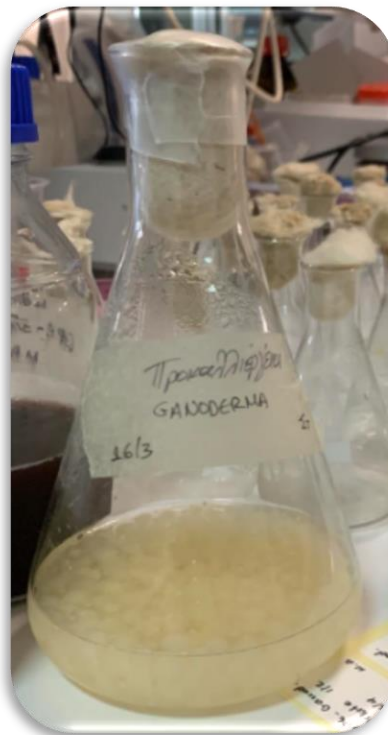
Εικόνα 2.1 : Ανανέωση στελέχους *G. lucidum*

2.2 Παρασκευή υγρής προκαλλιέργειας

Απαραίτητο βήμα πριν την έναρξη της ζύμωσης του θρεπτικού υποστρώματος είναι η παρασκευή υγρών προκαλλιεργειών οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό των κωνικών . Οι προκαλλιέργειες παρασκευάστηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 500 mL με ενεργό όγκο 150 mL. Η σύσταση τους παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 3.1 που ακολουθεί. Αφού ρυθμίστηκε το pH στο 6,2 , τοποθετήθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ για 20 min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός των κωνικών υπό ασηπτικές συνθήκες με 2 δίσκους διαμέτρου 6 mm στη κάθε μια. Τέλος τοποθετήθηκαν προς επώαση σε αναδευόμενο κλίβανο στους $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ και 150 rpm.

Πίνακας 2.1 : Χημική σύσταση προκαλλιέργειας

Συστατικά	Ποσότητα (g/L)
Γλυκόζη	10
Εκχύλισμα ζύμης	1,5
Πεπτόνη	1,5
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,23
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,08



Εικόνα 2.2 : Υγρή προκαλλιέργεια του μύκητα *G. lucidum*

2.3 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος από τα απόβλητα τυροκομίας

Το τυρόγαλα που εξετάστηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα παρελήφθη από το τοπικό τυροκομείο του Αργοστολίου (Γαλιατσάτος, Κεφαλονιά), έπειτα από την παραγωγή μυζήθρας. Τα βήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του θρεπτικού υποστρώματος ήταν τα εξής : Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των πρωτεϊνών με την διαδικασία της αποπρωτεΐνωσης , σύμφωνα με την μέθοδο των Kachrimanidou et al. 2022 ; MURPHY and MULVIHLL, 1988. Ειδικότερα, το υγρό απόβλητο υποβλήθηκε αρχικά σε θέρμανση στους 55-60°C, και η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 4,7 (NaOH 5 M), που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Στην συνέχεια το τυρόγαλα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1 ,

τοποθετήθηκε σε φιάλες Duran , οι οποίες αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά στους 121°C , ώστε να πραγματοποιηθεί η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 2.3: Τυρόγαλα πριν και μετά το στάδιο της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών

Έπειτα τοποθετήθηκαν για 12 ώρες (overnight) στους 4 °C για τον καλύτερο διαχωρισμό του ιζήματος . Εν συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση με ηθμό και αντλία κενού για καλύτερη διαύγαση. Μετά και το στάδιο της διήθησης, το τυρόγαλο (cheese whey permeate, CWP) αραιώθηκε με απιονισμένο νερό ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση λακτόζης και η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 6,2. Τοποθετήθηκε σε κωνικές τύπου Erlenmeyer (100mL) , οι οποίες πωματίστηκαν και τοποθετήθηκαν προς αποστείρωση ώστε εν συνεχεία να εμβολιαστούν με φρέσκια προκαλλιέργεια (10%, v/v).

2.4 Συνθήκες ζύμωσης

Μετά τον εμβολιασμό των κωνικών με το θρεπτικό υπόστρωμα, οι κωνικές τοποθετήθηκαν προς επώαση σε θερμοστατούμενο κλίβανο σε στατικές και αναδευόμενες συνθήκες ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) για να μελετηθεί η επίδραση της ανάδευσης στην ανάπτυξη του μύκητα. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δύο κωνικές για την αξιολόγηση της ανάπτυξης τού και την κατανάλωση του υποστρώματος. Επομένως τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αντιστοιχούν στο μέσο όρο των δυο αυτών μετρήσεων. Ακόμη, μελετήθηκε η αρχική συγκέντρωση λακτόζης τυρογάλακτος. Το αρχικό τυρόγαλο μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών διαθέτει αρχική συγκέντρωση λακτόζης 45-50 g/L. Το ρεύμα αυτό αραιώθηκε κατάλληλα ώστε να ρυθμίζεται η αρχική συγκέντρωση λακτόζης, ανάλογα με το πείραμα. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα που αφορούσαν στην επίδραση της προσθήκης οργανικού αζώτου, όπου προστέθηκε εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, 2,5 g/L) και πεπτόνη (peptone, 3,5 g/L) στο θρεπτικό υπόστρωμα από το τυρόγαλο.

2.5 Εκχύλιση ενδοπολυσακχαριτών

Οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (IPS) προσδιορίστηκαν με υδατική και αιθανολική εκχύλιση. Αρχικά, για την υδατική εκχύλιση, λήφθηκε 1 gr ξηρής βιομάζας με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και προστέθηκαν 10mL απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν για μια ώρα στους 100°C σε συνθήκες ανάδευσης. Μετά το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε διήθηση του δείγματος σε προζυγισμένο falcon. Το εκχύλισμα τοποθετήθηκε στην κατάψυξη και στη συνέχεια λυωφιλώθηκε (freeze

drying), ενώ το στερεό της εκχύλισης τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο χαρτί και τρυβλίο petri για ξήρανση. Η θερμοκρασία του φούρνου ορίστηκε στους 50°C.

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για την αιθανολική εκχύλιση. Ειδικότερα λήφθηκε 0,5gr ξηρής βιομάζας από το δείγμα με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, και προστέθηκαν 15mL αιθανόλης. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 72h σε αναδευόμενες συνθήκες.

2.6 Αναλυτικές μεθόδους

2.6.1 Προσδιορισμός pH και βιομάζας

Για την μέτρηση της τιμής pH των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε φορητό πεχάμετρο (pH meter, HANNA HI 8424).

Η βιομάζα ή ολικό ξηρό βάρος (Total dry weight, TDW) προσδιορίστηκε βαρυμετρικά. Ειδικότερα για κάθε δείγμα που λήφθηκε, αρχικά καταγράφηκε ο όγκος του δείγματος με ογκομετρικό κύλινδρο και στη συνέχεια η βιομάζα του μύκητα διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης με χρήση φίλτρου υπό κενό (Whatman No 1, England). Στην συνέχεια εκπλύθηκε με απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε σε φούρνο ξήρανσης ($60 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) μέχρι την απόκτηση σταθερού βάρους, το οποίο μετρήθηκε σε ζυγό ακριβείας. Το υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων, του αζώτου των ελεύθερων και για τον προσδιορισμό των εξωπολυσακχαριτών (EPS). Αντίστοιχα, η βιομάζα του μύκητα, χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών (intracellular polysaccharides).

2.6.2 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων του θρεπτικού υποστρώματος

Η συγκέντρωση των αρχικών και των καταναλωθέντων σακχάρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης προσδιορίστηκε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography) με σύστημα HPLC, Agilent. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη ROA-organic acid H⁺ (300 μήκος x 7.8 mm εσωτερική διάμετρο, Phenomenex), η οποία είναι συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer) και ροή 0,6 mL/min κάτω από συγκεκριμένη πίεση. Η θερμοκρασία φούρνου ορίστηκε στους 65°C για την ανάλυση της λακτόζης. Η κινητή φάση αποτελούταν από διάλυμα H₂SO₄ 10 mM. Πριν την ανάλυση πραγματοποιήθηκε κατάλληλη αραίωση και φιλτράρισμα των δειγμάτων με φίλτρο (Whatman®, 0.2 µm).

2.6.3 Προσδιορισμός αζώτου ελεύθερων αμινομάδων

Ο προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Free Amino Nitrogen (FAN) σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη της βιβλιογραφίας (Kachrimanidou et al., 2023). Ειδικότερα, 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστήριου χρώσης (color reagent). Τα δείγματα πωματίστηκαν, αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 16 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 20 °C, προστέθηκαν 2,5 mL από το αντιδραστήριο αραίωσης και ακολούθησε ανάδευση του κάθε δείγματος. Τέλος η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm

(Helios Omega UV/Vis, ThermoScientific, USA) και τα αποτελέσματα προέκυψαν με βάση πρότυπη καμπύλη διαλύματος γλυκίνης.

2.6.4 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Ο προσδιορισμός σε ολικά φαινολικά συστατικά (Total Phenolic Content, TPC) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu με βάση προηγούμενη μελέτη (Aikaterini Papadaki et al., 2022). Ειδικότερα, 50 μL δείγματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, αφού πρώτα φυγοκεντρήθηκαν. Στη συνέχεια προστέθηκε 450 μL απιονισμένο νερό και 2,5 mL από το διάλυμα Folin-Ciocalteu 0.2 N. Ακολούθησε έντονη ανάδευση των δειγμάτων για 1 λεπτό, και προστέθηκε 2 mL Na_2CO_3 75 g/L. Τέλος, τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά και παρέμειναν σε ηρεμία για 1,5h στους 30°C. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 765nm (Helios Omega UV/Vis, ThermoScientific, USA), και τα αποτελέσματα σε κάθε δείγμα προκύπτουν από τον μέσο όρο των δύο απορροφήσεων

2.6.5 Προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Lowry σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Lowry et al. 1951). Ειδικότερα 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στην συνέχεια προστέθηκε 1 mL σύνθετου αντιδραστηρίου, αποτελούμενο από τα εξής διαλύματα: 2% (w/v) Na_2CO_3 , 1% (w/v) CuSO_4 και 2% (w/v) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 100:1:1 αντίστοιχα. Στην συνέχεια τα δείγματα πωματίστηκαν, αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινές συνθήκες για 10 min. Έπειτα προστέθηκαν 100 μL

αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu 1 N σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα οι οποίοι πωματίστηκαν, αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν ξανά σε σκοτεινές συνθήκες για άλλα 30 min . Μετά το πέρας του σταδίου αυτού και την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος , μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 540 nm (Helios Omega UV/Vis, ThermoScientific, USA) και τα αποτελέσματα προέκυψαν με βάση πρότυπη καμπύλη διαλύματος αλβουμίνης ορού βοειδών (BSA) .

2.6.6 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) . Πιο συγκεκριμένα 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια προστέθηκαν 3,9 mL φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος DPPH . Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 90 min. Τέλος η απορρόφηση μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 517 nm (Helios Omega UV/Vis, ThermoScientific, USA) και τα αποτελέσματα προέκυψαν με βάση την διαφορά της απορρόφησης των δειγμάτων από αυτήν της DPPH .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

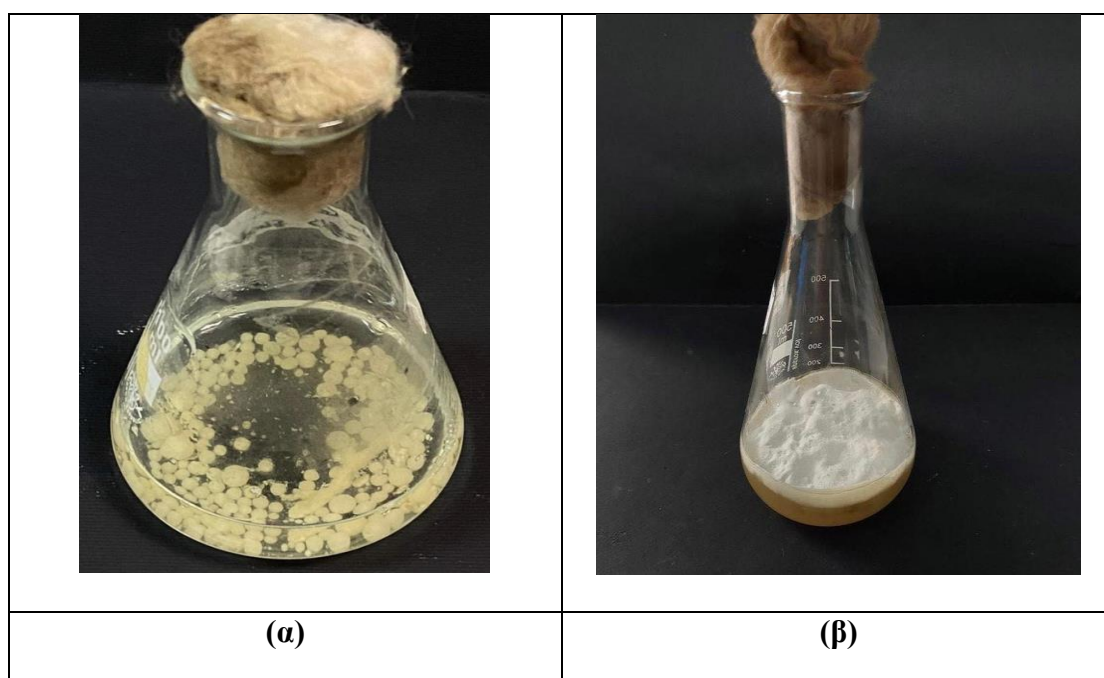
3.1 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με προσθήκη οργανικού αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη)

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση του τυρογάλακτος χωρίς τις κατάλληλες τροποποιήσεις μπορεί να μην αποφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα, όσον αφορά στην ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή μεταβολιτών. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τη διεργασία της ζύμωσης είναι η αρχική περιεκτικότητα σε λακτόζη και σε άζωτο. Επομένως η αλλαγή της χημικής σύστασης του υποστρώματος για την αποτελεσματική μυκηλιακή ανάπτυξη καθίσταται αναγκαία.

Το τυρόγαλο μετά την απομάκρυνση του κλάσματος της πρωτεΐνης περιέχει περίπου ~50 g/L λακτόζη και χαμηλή συγκέντρωση αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN), περίπου 150-200 mg/L. Σε προηγούμενα πειράματα της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου αξιολογήθηκε η ανάπτυξη του μύκητα *G. lucidum* σε συνθετικό υπόστρωμα και σε λακτόζη τυρογάλακτος, με αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~10 g/L. Επόμενο βήμα λοιπόν αποτέλεσε η μελέτη προσθήκης οργανικού αζώτου στο θρεπτικό υπόστρωμα με το τυρόγαλο, ώστε να προσομοιάζει το συνθετικό και να μελετηθεί η επίδραση του αζώτου στην ανάπτυξη του *G. lucidum*. Ο εμπλουτισμός του τυρογάλακτος έγινε με την προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3.5 g/L) και οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναδευόμενες και στατικές συνθήκες . Δείγματα λήφθηκαν ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αξιολογήθηκε η

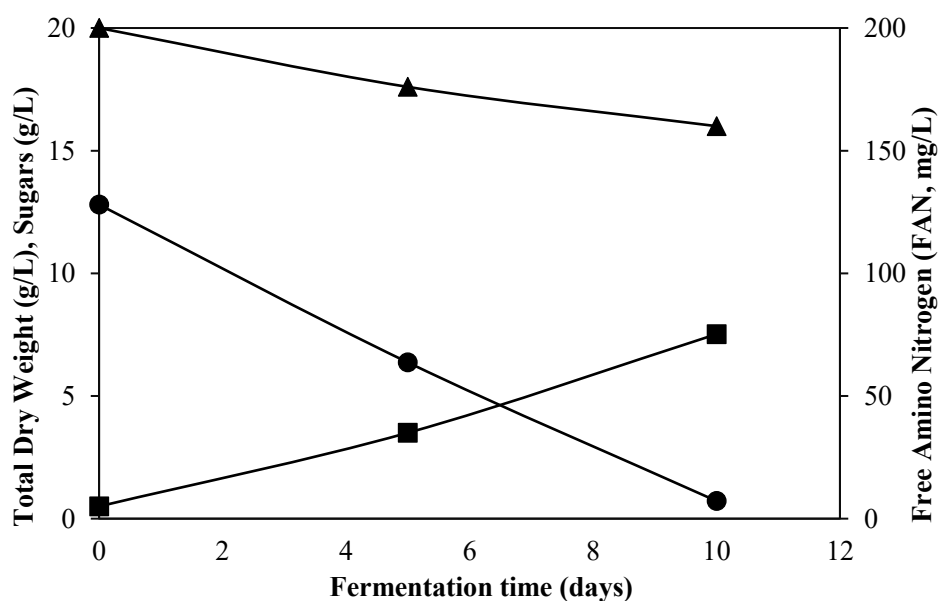
παραγωγή βιομάζας και η κατανάλωση σακχάρων . Επίσης μελετήθηκε η επίδραση των δυο διαφορετικών συνθηκών ζύμωσης όσο αφορά στο ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων (Q_s), την παραγωγικότητα (Q_x) και τον συντελεστή απόδοσης της βιομάζας ($Y_{x/s}$).

Αρχικά παρουσιάζεται η μακροσκοπική παρατήρηση του μύκητα κατά την καλλιέργεια σε αναδευόμενες και στατικές συνθήκες. Εύκολα διαφαίνεται ότι η ανάδευση επηρέασε τη μορφολογία του μύκητα καθώς στην αναδευόμενη καλλιέργεια παράχθηκαν σφαιρίδια (pellets) ενώ στην περίπτωση της στατικής καλλιέργειας, αναπτύχθηκε μυκήλιο με υφές σε όλη την επιφάνεια της κωνικής φιάλης. Προηγούμενες μελέτες έχουν αντίστοιχα αναφέρει την επίδραση της ανάδευσης στη μορφολογία του μύκητα *G. lucidum* προς το σχηματισμό pellet καθώς επίσης και στην παραγωγή εξω-πολυσακχαριτών (Fraga et al., 2014; Supramani et al., 2019).

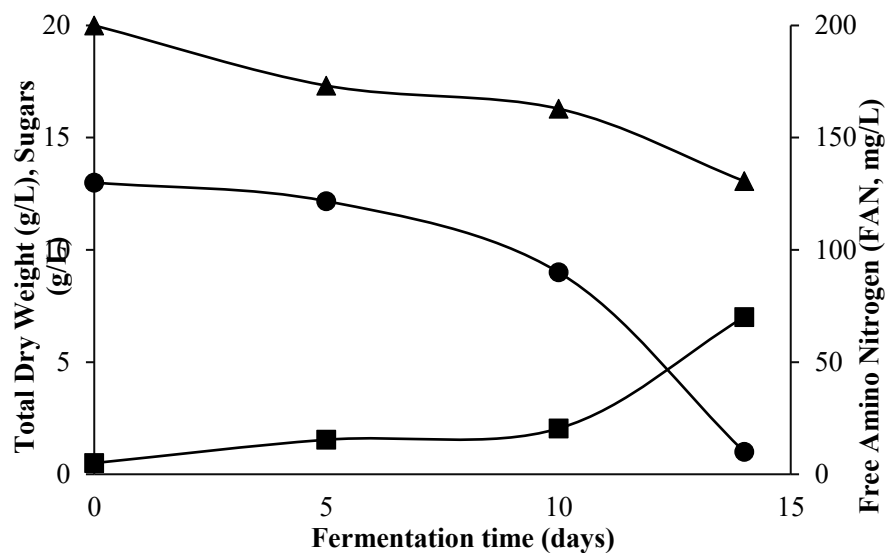


Εικόνα 3.1: Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του μύκητα *G. lucidum* χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπλουτισμένο τυρόγαλο σε αναδευόμενες (α) και στατικές (β) συνθήκες

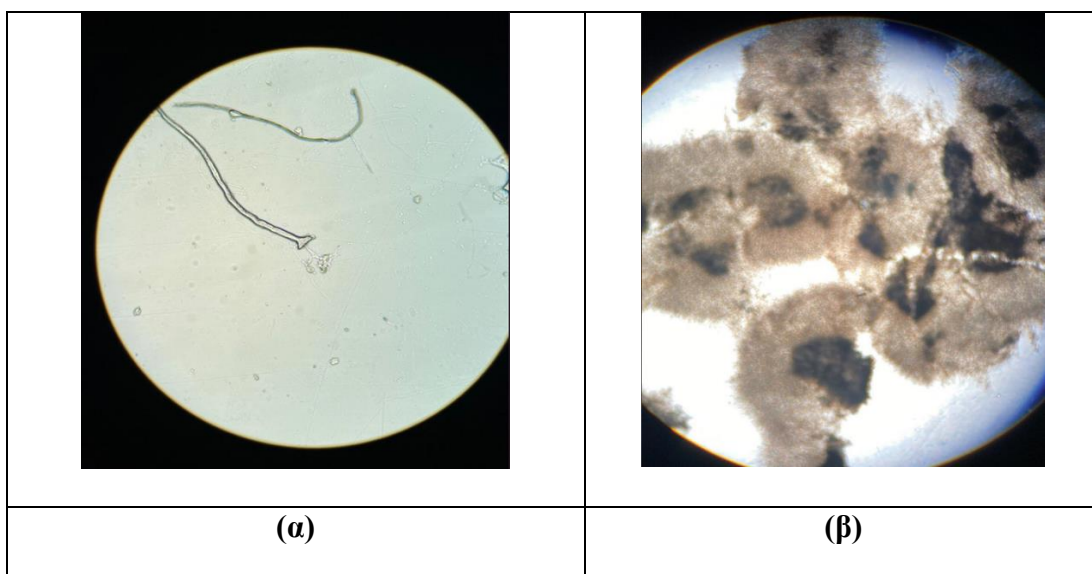
Στο Γράφημα 3.1 παρουσιάζεται η κατανάλωση λακτόζης και FAN και η παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (Total Dry Weight, TDW) σε αναδευόμενες συνθήκες και αντίστοιχα στο Γράφημα 3.2 παρουσιάζονται οι ίδιες παράμετροι για τις στατικές καλλιέργειες.



Γράφημα 3.1 : Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του *G. lucidum* σε τυρόγαλο και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).



Γράφημα 3.2 : Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια στατικής ζύμωσης του *G. lucidum* σε τυρόγαλο και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).



Εικόνα 3.2: Μικροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του μύκητα *G. lucidum* χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τυρόγαλο σε στατικές συνθήκες.

Όπως αναφέρθηκε η αρχική συγκέντρωση λακτόζης ήταν ~12 g/L. Η κατανάλωση ξεκίνησε τις πρώτες ημέρες στην αναδεδυόμενη ενώ η στατική παρουσίασε μια φάση υστέρησης. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε για τις αναδεδυόμενες και στατικές συνθήκες την 10^η και 14^η μέρα αντίστοιχα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εφαρμογή ανάδευσης υποβοηθά την καλύτερη ομογενοποίηση των θρεπτικών ουσιών και ενισχύει τον ρυθμό μεταφοράς του οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα επιταχύνεται η μικροβιακή ανάπτυξη και οι μεταβολικές δραστηριότητες του μύκητα και επιτυγχάνεται νωρίτερα η μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Ωστόσο είναι σημαντικό το γεγονός πως και στις δυο περιπτώσεις η προσθήκη του οργανικού αζώτου βοήθησε την διαδικασία της ζύμωσης καθώς η αυξήθηκε η παραγωγή βιομάζας (σε σύγκριση με πρότερα πειράματα) καθώς η κατανάλωση λακτόζης. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται και με το ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων καθώς και την παραγωγικότητα της διεργασίας (ήτοι ρυθμός παραγωγής βιομάζας). Για τον υπολογισμό αυτών των παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L/d:

$$Q_s = \frac{(S_t - S_0)}{T_f}$$

Q_s = Ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων, S_t = η συγκέντρωση λακτόζης σε συγκεκριμένο χρόνο ζύμωσης t , S_0 = η αρχική συγκέντρωση λακτόζης, T_f = ο συνολικός χρόνος ζύμωσης.

Αντίστοιχα, υπολογίστηκε η παραγωγικότητα της βιομάζας:

$$Q_x = \frac{(X_t - X_0)}{T_f}$$

Όπου: Q_x = Η παραγωγικότητα της διαδικασίας, X_t = η συγκέντρωση βιομάζας σε συγκεκριμένο χρόνο ζύμωσης t , X_0 = η αρχική συγκέντρωση βιομάζας, T_f = ο συνολικός χρόνος ζύμωσης.

Κατά τις αναδευόμενες συνθήκες παρατηρήθηκε υψηλότερος ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων με τιμή 1,20 έναντι του 0,86 g/L/d στις στατικές συνθήκες. Αυτό επηρεάζεται άμεσα από την ανάδευση, καθώς κατά τις συνθήκες αυτές υπάρχει βελτιωμένη διασπορά των θρεπτικών συστατικών. Σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες, η ανάδευση διασφαλίζει την ομοιόμορφη παροχή θρεπτικών ουσιών στο μικροβιακό πληθυσμό καθώς επίσης επηρεάζει και τη μορφολογία του μύκητα (Bakratsas et al., 2021). Τέλος όπως ειπώθηκε και προηγουμένως η αυξημένη μεταφορά οξυγόνου προάγει την μεταβολική δραστηριότητα, συμβάλλοντας έτσι στην αυξημένη τιμή του ρυθμού κατανάλωσης των σακχάρων.

Η παραγωγικότητα αντιστοιχεί σε μια θεμελιώδη παράμετρο υπό βελτιστοποίηση καθώς είναι αντίστοιχη της οικονομικής βιωσιμότητας μιας βιοδιεργασίας. Η παρατηρούμενη διαφορά στην παραγωγικότητα της βιομάζας μεταξύ των αναδευόμενων και στατικών συνθηκών, 0,70 έναντι 0,54 g/L/d αντίστοιχα, οφείλεται σε διάφορους παράγοντες που διαμορφώνουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Η αυξημένη παραγωγικότητα σε αναδευόμενες συνθήκες αποδίδεται κυρίως στην αυξημένη μεταφορά οξυγόνου, η οποία ενισχύει το μεταβολικό σθένος. Στις στατικές συνθήκες, ο συνδυασμός της χαμηλής μεταφοράς οξυγόνου με το γεγονός ότι μέρος της μεταβολιζόμενης λακτόζης θα γλυκοζυλιωθεί για να ενεργοποιήσει το οπερόνιο Lac και να δημιουργήσει την β-γαλακτοσιδάση, δημιουργεί συνθήκες που επηρεάζουν

αρνητικά το στέλεχος (δηλαδή συνθήκες στρες), με αποτέλεσμα τη χαμηλή παραγωγικότητα.

Ο συντελεστής απόδοσης έχει ύψιστη σημασία στην αξιολόγηση των διεργασιών ζύμωσης, χρησιμεύοντας ως βασικός δείκτης της χρήσης των πόρων και της αποδοτικότητας της διαδικασίας. Υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

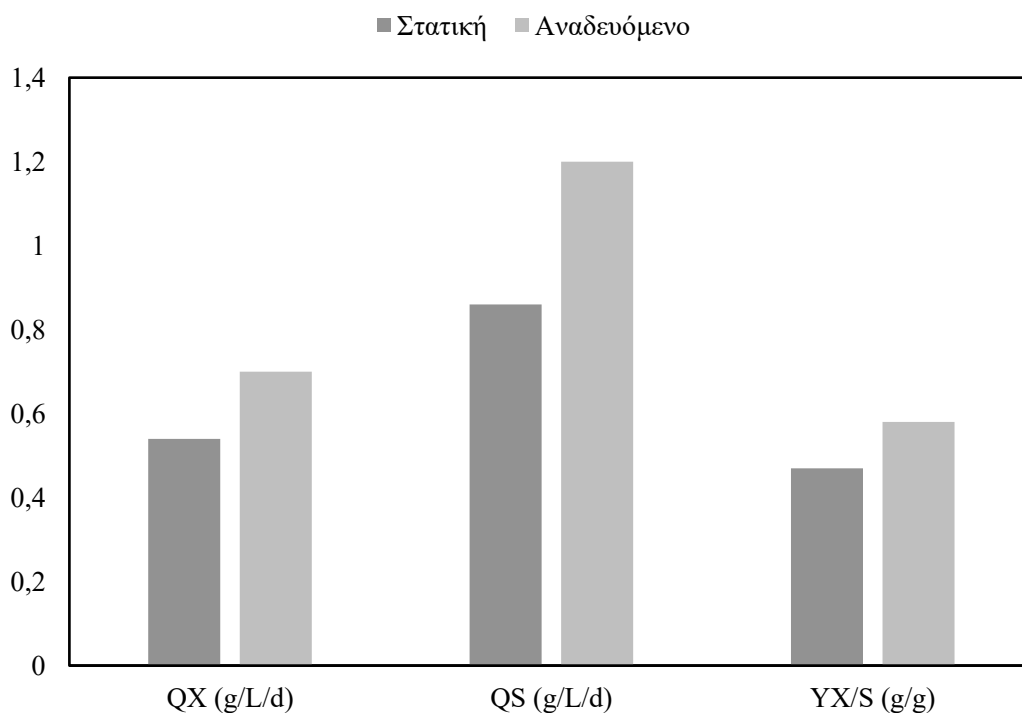
$$Y_{X/S} = \frac{(X_F - X_0)}{(S_F - S_0)}$$

Όπου: $Y_{X/S}$ = Ο συντελεστής απόδοσης, X_F = η τελική συγκέντρωση βιομάζας κατά την ζύμωση, X_0 = η αρχική συγκέντρωση βιομάζας, S_F = η τελική ποσότητα λακτόζης και S_0 η αρχική ποσότητα λακτόζης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρείται υψηλότερος συντελεστής απόδοσης στην αναδευόμενη ζύμωση με τιμή 0,58 έναντι της στατικής ζύμωσης με τιμή 0,47 g/g. Υψηλός συντελεστής απόδοσης υποδηλώνει μια πιο αποτελεσματική χρήση των διαθέσιμων πόρων καθώς και ότι ένα σημαντικό ποσοστό του υποστρώματος μετατράπηκε επιτυχώς σε βιομάζα. Ενώ και οι δύο αποδόσεις υποδεικνύουν επιτυχημένο σχηματισμό προϊόντος, η διαφορά αυτή υπογραμμίζει τον αντίκτυπο των συνθηκών καλλιέργειας που ακολουθούνται στην αποδοτικότητα της διεργασίας ζύμωσης.

Οι προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας που χρησιμοποίησαν συνθετικό υπόστρωμα με λακτόζη ή τυρόγαλο για την ανάπτυξη του *G. lucidum* είναι σχετικά περιορισμένες. Στη μελέτη των Tang and Zhong, παρουσιάστηκε παραγωγή 18,4 g/L βιομάζας, με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 35 g/L σε συνθετικό μέσο με την προσθήκη οργανικών πηγών αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης) κατά την

καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου (Tang and Zhong, 2002). Στην περίπτωση αυτή, οι συγγραφείς ανέφεραν συντελεστή απόδοσης 0,54 g/g, τιμή η οποία συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Σε μια άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλο ως υπόστρωμα, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις (25-45 g/L) σε ζυμώσεις στερεής κατάστασης, όπου μελετήθηκε η επίδραση της τιμής pH και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη (Song et al., 2007). Αντίστοιχα, στη μελέτη των Lee et al. όπου χρησιμοποιήθηκε τυρόγαλο μετά την απομάκρυνση της πρωτεΐνης σε αρχική συγκέντρωση 57 g/L λακτόζης, οι συγγραφείς ανέφεραν την παραγωγή ~17 g/L ξηρής βιομάζας (Lee et al., 2003).



Γράφημα 3.3 : Παραγωγικότητα βιομάζας (Q_x , g/L) , Ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων (Q_s , g/L) και συντελεστής απόδοσης ($Y_{x/s}$, g/g)

Συνοψίζοντας , όπως φαίνεται και στο γράφημα 3.3 κατά τη σύγκριση των δυο μεθόδων ζύμωσης υπό στατικές και αναδευόμενες συνθήκες, πλεονεκτεί η αναδευόμενη ζύμωση όσον αφορά στην παραγωγικότητα της βιομάζας, τον ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος και τον συντελεστή απόδοσης. Η αλληλεπίδραση της μηχανικής ανάδευσης και της βελτιωμένης μεταφορά οξυγόνου οδηγούν συλλογικά στην ανώτερη μικροβιακή ανάπτυξη αλλά και την ταχύτερη αξιοποίηση του υποστρώματος και τον σχηματισμό προϊόντων.

3.2 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L

Το δεύτερο πείραμα περιλαμβάνει την αξιολόγηση του τυρογάλακτος με υψηλότερη συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L. Ομοίως και σε αυτήν την περίπτωση οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε στατικές και αναδευόμενες συνθήκες, λήφθηκαν δείγματα ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αξιολογήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών ζύμωσης στον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων (Qs), στην παραγωγικότητα της βιομάζας (Qx) και στον συντελεστή απόδοσης της βιομάζας (Yx/s). Οι εν λόγω παράμετροι υπολογίστηκαν με τις προαναφερόμενες εξισώσεις.

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης ,η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε για τις στατικές συνθήκες την 14^η μέρα. Ωστόσο η βιομάζα που παράχθηκε ήταν μόλις 2,62 g/L πράγμα που σημαίνει πως υπήρξε πολύ χαμηλή παραγωγικότητα. Ακόμη η κατανάλωση της λακτόζης ήταν ελάχιστη και σε συνδυασμό με τον μικρό ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων , υποδηλώνει πως οι συνθήκες ζύμωσης δεν ήταν οι κατάλληλες ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί ο μύκητας . Επιπλέον η χαμηλή

περιεκτικότητα σε άζωτο αποτέλεσε έναν ακόμη λόγο για τον οποίο δεν παρήχθησαν θετικά αποτελέσματα.

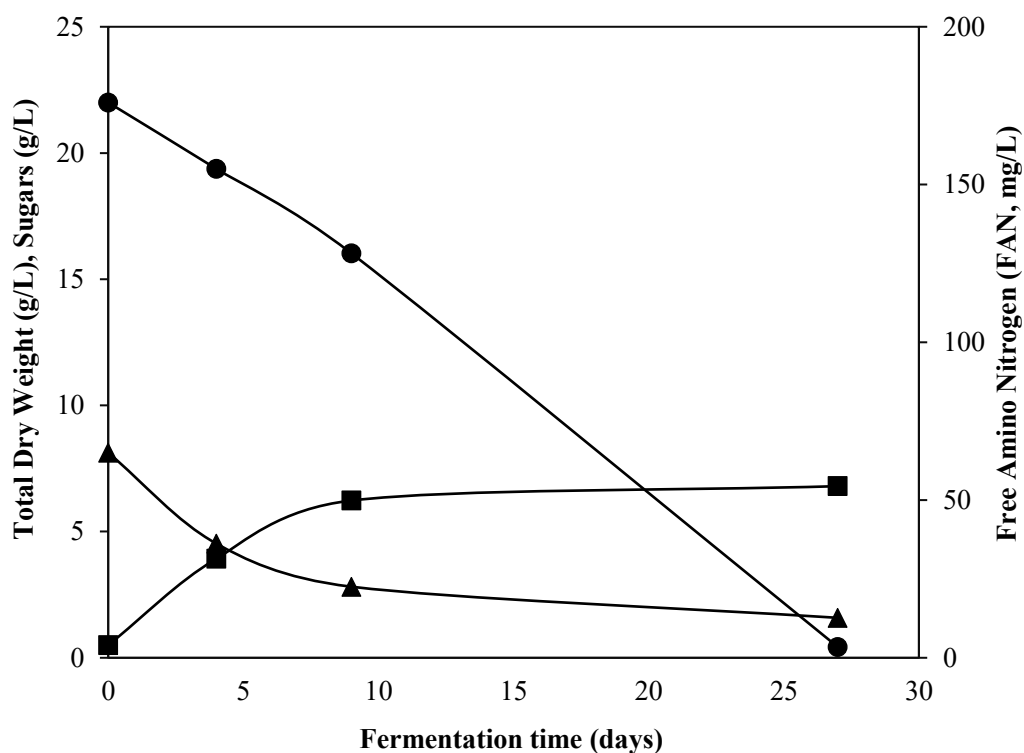
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, παραγωγικότητας και ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων κατά την ανάπτυξη του μύκητα *G. lucidum* σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L.

TDW(g/L)	2,62±0,11
Q_x (g/L/d)	0,15±0,07
Q_s (g/L/d)	0,07±0,01

Από την άλλη πλευρά, οι αναδευόμενες συνθήκες ανέδειξαν πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Όπως φαίνεται και στο γράφημα 3.4 η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε την 27^η μέρα της ζύμωσης και η βιομάζα που παράχθηκε ήταν 6,80 g/L. Η υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη και η χαμηλή συγκέντρωση αζώτου καθυστέρησε τον ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας και της κατανάλωσης των σακχάρων. Η παραγωγικότητα της βιομάζας ήταν 0,23 g/L/d ενώ ο συντελεστής απόδοσης 0,29 g/g. Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων ζύμωσης. Ακόμη αξίζει να αναφερθεί πως η χαμηλή περιεκτικότητα αζώτου επηρέασε σημαντικά τις ζυμώσεις τόσο για τις στατικές όσο και για τις αναδευόμενες συνθήκες.

Συγκριτικά με το προηγούμενο πείραμα, φαίνεται πως η χαμηλότερη συγκέντρωση λακτόζης με την προσθήκη οργανικού αζώτου επέφεραν καλύτερα αποτελέσματα κατά την πορεία των ζυμώσεων. Ακόμη οι αναδευόμενες συνθήκες δημιούργησαν ιδανικότερο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μύκητα. Έτσι τα επόμενα

πειράματα σκοπεύουν στην αξιολόγηση ακόμη δυο διαφορετικών συνδυασμών για την σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, υπό αναδευόμενες ωστόσο συνθήκες.

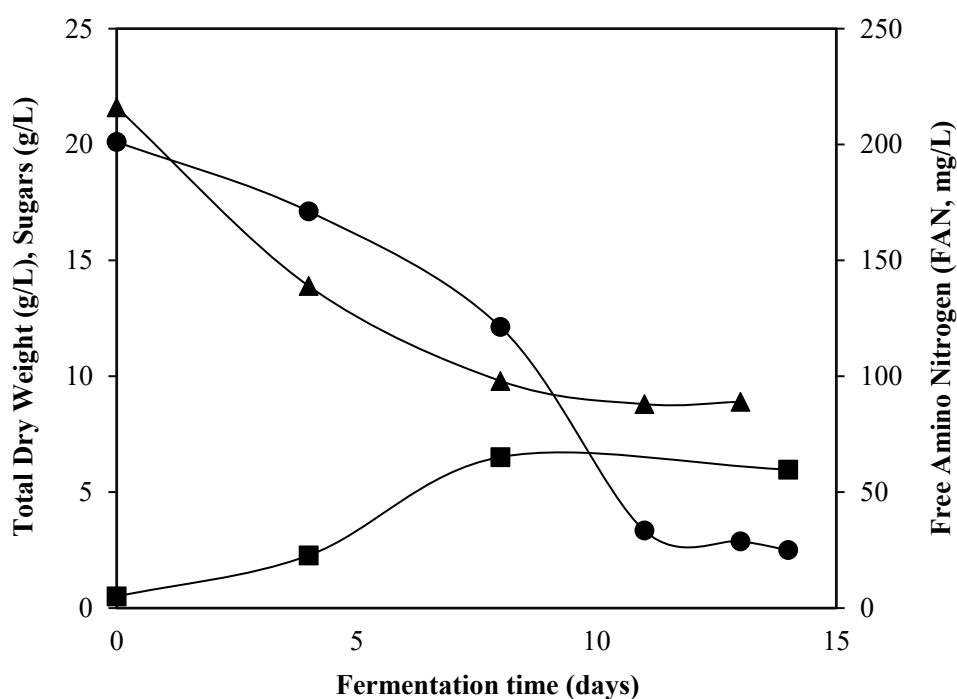


Γράφημα 3.4 : Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του *G. lucidum* σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L.

3.3 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με περιεκτικότητα σε λακτόζη 20 g/L και προσθήκη οργανικού αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη)

Βάση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων είναι εμφανές πως οι αναδευόμενες συνθήκες δημιουργούν ένα αποτελεσματικότερο περιβάλλον για το μύκητα το οποίο ευνοεί την μικροβιακή ανάπτυξη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της αυξημένης μεταφοράς οξυγόνου σε όλο το υλικό της ζύμωσης και η καλύτερη διασπορά των συστατικών του

υποστρώματος, ενισχύει την μεταβολική δραστηριότητα. Δεδομένων των συνθηκών, το πείραμα αυτό στοχεύει να αξιολογήσει την επίδραση του οργανικού αζώτου όταν αυτό προστίθεται στο τυρόγαλα με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L. Ομοίως και εδώ ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική και οι ζητούμενοι παράμετροι υπολογίστηκαν με τις ανάλογες μαθηματικές εξισώσεις .



Γράφημα 3.5 : Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του *G. lucidum* σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παράχθηκε την 11^η μέρα σε ποσότητα ίση με 8,00 g/L. Η υψηλότερη συγκέντρωση αζώτου φαίνεται πως υποβοήθησε την ζύμωση και σε αυτήν την περίπτωση καθώς η μέγιστη βιομάζα παρατηρήθηκε αρκετά νωρίτερα από την 27^η μέρα του προηγούμενου πειράματος. Ακόμη όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2 επιτεύχθηκε ο μεγαλύτερος ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων και σχετικά υψηλή παραγωγικότητα. Τέλος ο συντελεστής απόδοσης ήταν 0,32 g/g, γεγονός που υποδεικνύει μια πιο αποτελεσματική μετατροπή της αρχικής λακτόζη σε επιθυμητή μυκηλιακή βιομάζα. Συνολικά οι παρατηρούμενες θετικές επιδράσεις σε όλες τις παραμέτρους υπογραμμίζουν τον κεντρικό ρόλο του οργανικού αζώτου στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας της ζύμωσης .

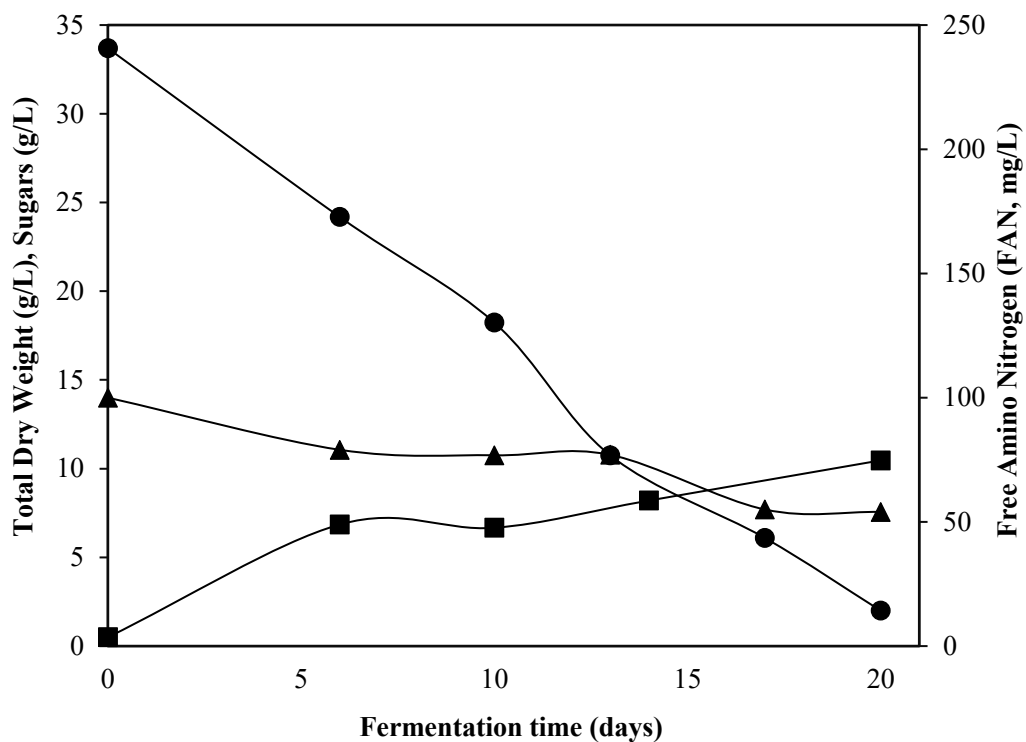
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας, παραγωγικότητας και ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων κατά την ανάπτυξη του μύκητα *G. lucidum* σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L και προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης (2,5 g/L) και πεπτόνης (3,5 g/L).

TDW(g/L)	8,00
Q_x (g/L/d)	0,39
Q_s (g/L/d)	1,33

3.4 Αξιολόγηση τυρογάλακτος με περιεκτικότητα σε λακτόζη 35 g/L

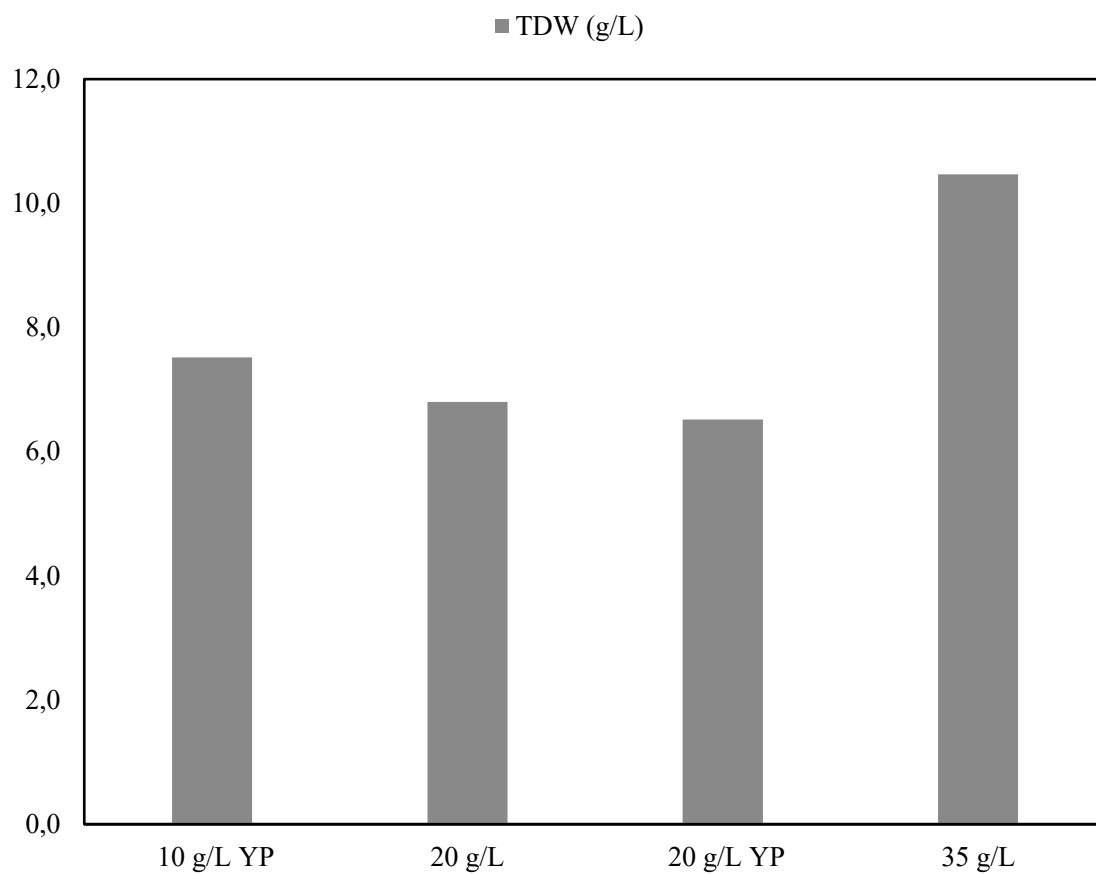
Στο τελευταίο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση λακτόζης, δηλαδή 35 g/L, μέσω της μικρότερης αραιώσης του αρχικού τυρογάλακτος. Στόχος του πειράματος ήταν να διερευνηθεί αν η υψηλότερη αρχική συγκέντρωση σακχάρου θα παρεμποδίσει την ανάπτυξη του μύκητα ή αν θα παρουσιάσει θετική επίδραση στη διεργασία. Αντίστοιχα, αξιολογήθηκε η παραγωγή βιομάζας και η κατανάλωση σακχάρων (ήτοι λακτόζης) και FAN, καθώς επίσης υπολογίστηκαν οι συντελεστές της παραγωγικότητας και του ρυθμού κατανάλωσης σακχάρων, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε κατά την 20η ημέρα ζύμωσης, όπου είχε καταναλωθεί σχεδόν πλήρως η λακτόζη από το υπόστρωμα, ενώ παρήχθησαν ~10,5 g/L βιομάζας. Η παραγωγικότητα της διεργασίας ήταν 0,49 g/L/d και ο ρυθμός κατανάλωσης λακτόζης 1,58 g/L/d. Αντίστοιχα, ο συντελεστής απόδοσης υπολογίστηκε 0,31 g/g, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι η χαμηλή περιεκτικότητα οργανικού αζώτου καθυστέρησε τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας.

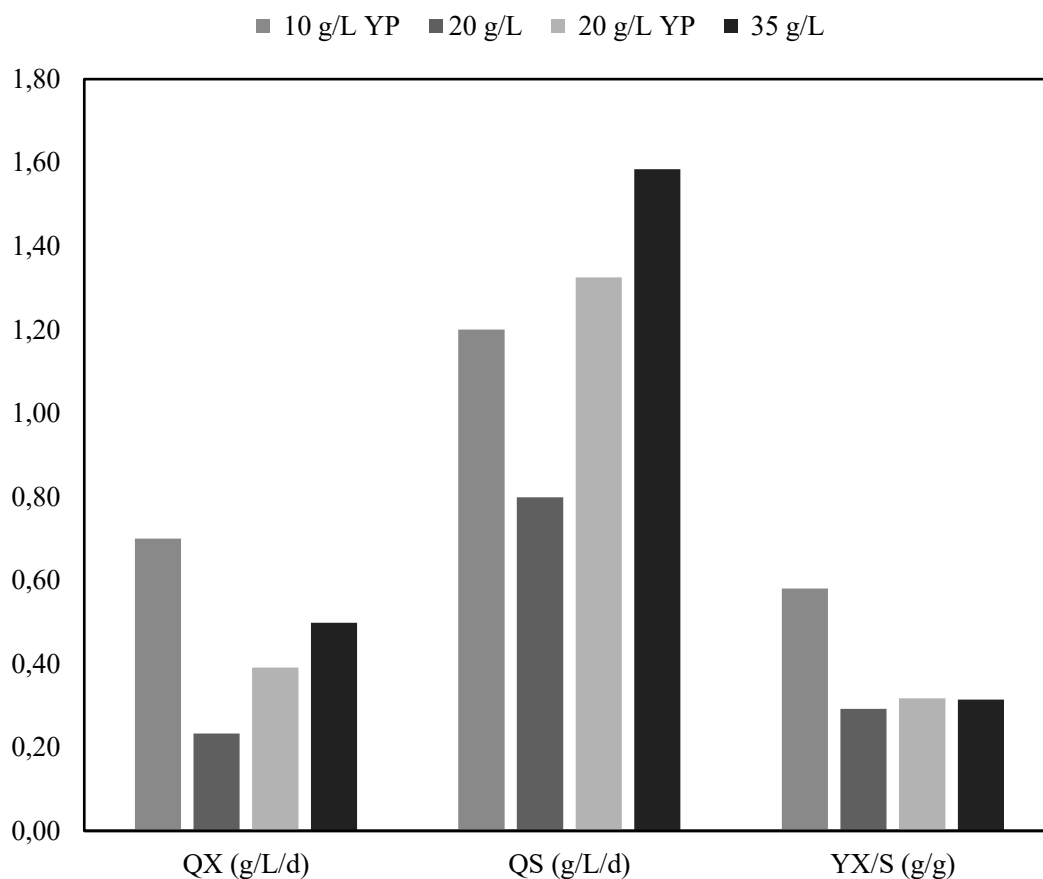


Γράφημα 3.6 : Κατανάλωση λακτόζης (●) και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) (▲) και παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (■) κατά την διάρκεια αναδευόμενης ζύμωσης του *G. lucidum* σε τυρόγαλο με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 35 g/L.

Το Γράφημα 3.7 και το Γράφημα 3.8 παρουσιάζει τη σύγκριση μεταξύ όλων των διαφορετικών πειραμάτων της τρέχουσας μελέτης αναφορικά με τις παραμέτρους που μελετήθηκαν.



Γράφημα 3.7: Παραγωγή ολικού ξηρού βάρους (TDW, g/L) στις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, με το στέλεχος *G. lucidum* υπό αναδευόμενες συνθήκες.



Γράφημα 3.8: Υπολογισμός παραγωγικότητας (Q_x , g/L/d), ρυθμού κατανάλωσης λακτόζης (Q_s , g/L/d) και συντελεστής απόδοσης ($Y_{x/s}$, g/g) στις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, με το στέλεχος *G. lucidum* υπό αναδεδυόμενες συνθήκες.

Σύμφωνα με αυτά, η υψηλότερη συγκέντρωση λακτόζης παρουσίασε θετική επίδραση όσον αφορά στην μέγιστη παραγωγής βιομάζας και στον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων. Ωστόσο η χαμηλή ποσότητα αζώτου καθυστέρησε την εμφάνιση της μέγιστης βιομάζας. Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη οργανικού αζώτου σε χαμηλότερη συγκέντρωση λακτόζης δημιούργησε ευνοϊκότερο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μύκητα. Αυτό συνδέεται άμεσα και με την επίτευξη υψηλότερων

τιμών τόσο στην παραγωγικότητα της διεργασίας όσο και στον συντελεστή παραγωγής βιομάζας. Όπως ειπώθηκε και νωρίτερα, οι παράμετροι αυτοί αποτελούν μείζονος σημασίας για την οικονομική βιωσιμότητα της διεργασίας και για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας της διαδικασίας ζύμωσης. Ακόμη ο συντελεστής απόδοσης είναι απαραίτητος για την μεγιστοποίηση της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Για τους λόγους αυτούς το πρώτο πείραμα καθίσταται ιδανικότερο για την αποτελεσματικότερη ανάπτυξη του μύκητα.

3.5 Παραγωγή λειτουργικών συστατικών

Στις προηγούμενες ενότητες αναφέρθηκε η επίδραση του υποστρώματος στην παραγωγή βιομάζας και στις παραμέτρους που σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της διεργασίας. Εν συνεχεία, μελετήθηκε η εκχύλιση των ενδοπολυσακχαριτών (intracellular polysaccharides, IPS) από τη μυκηλιακή βιομάζα ως συστατικά υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τα συστατικά αυτά είναι μείζονος σημασίας καθώς δύνανται να παρουσιάζουν λειτουργικές ιδιότητες, λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας καθώς επίσης και του ποσοστού σε πρωτεΐνη και υδατάνθρακες.

Συνεπώς σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα για το βέλτιστο πρωτόκολλο εκχύλισης, δεδομένου της πληθώρας μεθόδων στη βιβλιογραφία. Μελετήθηκε η αιθανολική εκχύλιση από τη βιομάζα (σε χρονική διάρκεια 72 h) καθώς και η υδατική εκχύλιση, (1 hour). Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μελετήθηκε αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο DPPH αλλά και με το ποσοστό ανάκτησης IPS από τη βιομάζα. Στην αιθανολική εκχύλιση, η ικανότητα του εκχυλίσματος να αδρανοποιεί τη

ρίζα της DPPH· ήταν αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με την υδατική, καθώς στην πρώτη περίπτωση παρουσιάστηκε ~30-35% παρεμπόδιση (%I) ενώ στην υδατική εκχύλιση ήταν >50%. Συνεπώς επιλέχθηκε η υδατική εκχύλιση, η οποία δίνει και το πλεονέκτημα της μελλοντικής εφαρμογής σε τρόφιμα σε σύγκριση με την αιθανόλη ή/και τη μεθανόλη. Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης της βιομάζας εξαρτάται από το γένος και είδος του μύκητα αλλά και από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν δείξει ότι υπερτερεί η υδατική εκχύλιση ενώ σε άλλες περιπτώσεις, τα βέλτιστα αποτελέσματα παρουσίασε η αιθανολική ή η μεθανολική εκχύλιση.

Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης για το εκχύλισμα που προήλθε από την αναδεδυόμενη καλλιέργεια του τυρογάλακτος εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη και αρχική συγκέντρωση λακτόζης ~20 g/L στο χρονικό σημείο με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε το ποσοστό σε πολυσακχαρίτες με τη μέθοδο Dubois και το ποσοστό σε πρωτεΐνη με τη φωτομετρική μέθοδο Lowry.

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων εκχυλίσματος

<i>IPS production (g/L)</i>	1,92
<i>IPS content (g IPS/ g dry weight)</i>	0,32
<i>IPS productivity (g/L/d)</i>	0,138
<i>I_{DPPH} (%)</i>	95,9
<i>μg Trolox/mg extract</i>	3,69
<i>Polysaccharides (%)</i>	49,8
<i>Protein content (%)</i>	29,1

Εύκολα παρατηρείται η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος (>95%), το οποίο υποδηλώνει λειτουργικές ιδιότητες. Επίσης, οι τιμές που αφορούν στην παραγωγή IPS συνάδουν με προηγούμενες μελέτες. Για παράδειγμα, οι Fang και Zhong ανέφεραν την παραγωγή 1,2 g/L IPS χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη και γλυκόζη, ενώ σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε η παραγωγή 2,4-2,49 g/L σε αναδευόμενες φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα αντίστοιχα, με εμπορική λακτόζη (Tang and Zhong, 2002)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, που αφορούν στην αξιοποίηση του τυρογάλακτος για την ανάπτυξη του μύκητα *G. lucidum* σε υγρές ζυμώσεις, μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα :

- Το τυρόγαλο δύναται να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μανιταριών
- Οι αναδεδυόμενες συνθήκες σε σύγκριση με τις στατικές δημιούργησαν καλύτερο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μύκητα.
- Η υψηλή περιεκτικότητα αζώτου του υποστρώματος επιτάχυνε την μέγιστη παραγωγή βιομάζας.
- Η υψηλή συγκέντρωση λακτόζης ευνόησε την επίτευξη μεγαλύτερων τιμών ξηρής βιομάζας.
- Η υδατική εκχύλιση ήταν περισσότερο αποτελεσματική, ενώ παρατηρήθηκε υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος (>95%).

Περαιτέρω μελέτες που θα μπορούσαν να γίνουν αφορούν την πρόσθετη βελτιστοποίηση του υποστρώματος ή του παραγόμενου προϊόντος. Όσον αφορά στο υπόστρωμα, θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση πρόσθετων βιταμινών ή ουσιών οι οποίες ευνοούν την μυκηλιακή ανάπτυξη και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Επιπλέον η προσθήκη ανόργανης πηγής αζώτου ή ο συνδυασμός του με το οργανικό άζωτο αποτελεί μια άλλη εναλλακτική προσέγγιση, ή ακόμη και η μελέτη της επίδρασης της επιφάνειας ανάπτυξης του μύκητα κατά τις στατικές συνθήκες. Τέλος μια ακόμη πιθανή μελέτη που αφορά το προϊόν σχετίζεται με τον τύπο των

υδατανθράκων που παράγονται στο κλάσμα των ένδο- και εξωπολυσακχαριτών και την πιθανή πρεβιοτική και αντιμικροβιακή τους δράση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berruga, M. I., A. Jaspe, and C. SanJose. "Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents." *International biodeterioration & biodegradation* 40.2-4 (1997): 119-123.
2. Lee, Hwanyoung, et al. "Production of Ganoderma lucidum mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics." *Biochemical engineering journal* 15.2 (2003): 93-99.
3. Demirel, Burak, Orhan Yenigun, and Turgut T. Onay. "Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review." *Process biochemistry* 40.8 (2005): 2583-2595.
4. Janczukowicz, W., M. Zieliński, and M. Dębowski. "Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production." *Bioresource technology* 99.10 (2008): 4199-4205.
5. Rivas, Javier, Ana R. Prazeres, and Fatima Carvalho. "Aerobic biodegradation of precoagulated cheese whey wastewater." *Journal of agricultural and food chemistry* 59.6 (2011): 2511-2517.
6. Kushwaha, Jai Prakash, Vimal Chandra Srivastava, and Indra Deo Mall. "Treatment of dairy wastewater by inorganic coagulants: Parametric and disposal studies." *Water research* 44.20 (2010): 5867-5874.
7. Dragone, Giuliano, et al. "Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation." *Food Chemistry* 112.4 (2009): 929-935.
8. Venetsaneas, Nikolaos, et al. "Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches." *Bioresource technology* 100.15 (2009): 3713-3717.
9. Dragone, Giuliano, et al. "Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder." *biomass and bioenergy* 35.5 (2011): 1977-1982.
10. Prazeres, Ana R., Fátima Carvalho, and Javier Rivas. "Cheese whey management: A review." *Journal of environmental management* 110 (2012): 48-68.
11. Sala, Serenella, et al. "Water footprint in the context of sustainability assessment. Report on the application of life cycle-based indicators of water consumption in the context of integrated sustainability impact analysis." (2013).
12. Fantin, Valentina, et al. "Life cycle assessment of Italian high quality milk production. A comparison with an EPD study." *Journal of cleaner production* 28 (2012): 150-159.
13. nzález-García, Sara, et al. "Environmental life cycle assessment of a Galician cheese: San Simon da Costa." *Journal of cleaner production* 52 (2013): 253-262.

14. Chatzipaschali, Aspasia A., and Anastassios G. Stamatis. "Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: current status and prospects." *Energies* 5.9 (2012): 3492-3525.
15. González-García, Sara, et al. "Environmental performance of a Portuguese mature cheese-making dairy mill." *Journal of cleaner production* 41 (2013): 65-73.
16. Panesar, Parmjit S., et al. "Bioutilisation of whey for lactic acid production." *Food chemistry* 105.1 (2007): 1-14.
17. Dragone, Giuliano, et al. "Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder." *biomass and bioenergy* 35.5 (2011): 1977-1982.
18. Jasko, Janis, et al. "Biogas production from cheese whey in two phase anaerobic digestion." *Engineering for Rural Development* 26 (2011): 373-376.
19. Lappa, Iliada K., et al. "Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications." *Foods* 8.8 (2019): 347.
20. Chalermthai, Bushra, et al. "Life cycle assessment of bioplastic production from whey protein obtained from dairy residues." *Bioresource Technology Reports* 15 (2021): 100695.
21. Bosco, Francesca, et al. "PHA production from Cheese Whey and "Scotta": Comparison between a consortium and a pure culture of *Leuconostoc mesenteroides*." *Microorganisms* 9.12 (2021): 2426.
22. Das, Monami, Aryama Raychaudhuri, and Sadhan Kumar Ghosh. "Supply chain of bioethanol production from whey: A review." *Procedia Environmental Sciences* 35 (2016): 833-846.
23. Mussatto, Solange I., et al. "Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes." *Industrial waste* 274 (2012).
24. Couto, Susana Rodríguez, and José Luis Toca Herrera. "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review." *Biotechnology advances* 24.5 (2006): 500-513.
25. Kozarski, Maja, et al. "Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*." *Journal of food composition and analysis* 26.1-2 (2012): 144-153.
26. Lu, Hongyun, et al. "Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19.5 (2020): 2333-2356.
27. Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L.M.; Ferreira, I.C.F.R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 2742–2747.
28. Feeney, M.J.; Dwyer, J.; Hasler-Lewis, C.M.; Milner, J.A.; Noakes, M.; Rowe, S.; Wach, M.; Beelman, R.B.; Caldwell, J.; Cantorna, M.T.; et al. Mushrooms and health summit proceedings. *J. Nutr.* **2014**, 144, 1128S–1136S.

29. Valverde, M.E.; Hernández-Pérez, T.; Paredes-López, O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *Int. J. Microbiol.* **2015**, *2015*, 1–14.
30. Samsudin, N.I.P.; Abdullah, N. Edible mushrooms from Malaysia; a literature review on their nutritional and medicinal properties. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26*, 11–31.
31. Huang, J.; Ou, Y.; Yew, T.W.D.; Liu, J.; Leng, B.; Lin, Z.; Su, Y.; Zhuang, Y.; Lin, J.; Li, X.; et al. Hepatoprotective effects of polysaccharide isolated from *Agaricus bisporus* industrial wastewater against CCl₄-induced hepatic injury in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *82*, 678–686.
32. Agrawal, S.; Jha, K.N. Medicinal mushrooms. *J. Crit. Rev.* **2020**, *7*, 1401–1407.
33. Shamtsyan, M. Bioactive compounds in mushrooms. In *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*; Heldman, D., Wheeler, M., Hoover, D., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp. 76–81.
34. Raman, J.; Lee, S.-K.; Im, J.-H.; Oh, M.-J.; Oh, Y.-L.; Jang, K.-Y. Current prospects of mushroom production and industrial growth in India. *J. Mushrooms* **2018**, *4*, 239–249. ghghrtyhyrth
35. Hyde, K.D.; Xu, J.; Rapior, S.; Jeewon, R.; Lumyong, S.; Niego, A.G.T.; Abeywickrama, P.D.; Aluthmuhandiram, J.V.S.; Brahmanage, R.S.; Brooks, S.; et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers.* **2019**, *97*, 1–136.
36. De Silva, D.D.; Rapior, S.; Fons, F.; Bahkali, A.H.; Hyde, K.D. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: An approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Divers.* **2012**, *55*, 1–35.
37. Badalyan, S.M.; Rapior, S. The neurotrophic and neuroprotective potential of macrofungi. In *Medicinal Herbs and Fungi*; Springer Nature Singapore: Singapore, 2021; pp. 37–77.
38. Rathore, Himanshi, Shalinee Prasad, and Satyawati Sharma. "Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review." *PharmaNutrition* 5.2 (2017): 35-46.
39. Varghese, R.; Dalvi, Y.B.; Lamrood, P.Y.; Shinde, B.P.; Nair, C.K.K. Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: An overview. *3 Biotech* **2019**, *9*, 362
40. Wan, Wan Abd Al Qadr Imad, Safuan Ab Kadir, and Nazamid Saari. "The morphology of *Ganoderma lucidum* mycelium in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production." *Biotechnology Reports* 11 (2016): 2-11.
41. Cui, Mei-lin, Huan-yi Yang, and Guo-qing He. "Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 16.12 (2015): 998.

42. Liang, Chengyuan, et al. "Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y." *European Journal of Medicinal Chemistry* 174 (2019): 130-141.
43. Cör, Darija, Željko Knez, and Maša Knez Hrnčič. "Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review." *Molecules* 23.3 (2018): 649.
44. Sasidhara, R., and T. Thirunalasundari. "Lignolytic and lignocellulosic enzymes of *Ganoderma lucidum* in liquid médium." *European Journal of Experimental Biology* 4.2 (2014): 375-379.
45. Smith J.E., Rowan N.J., Sullivan R. Medicinal mushrooms: A rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnol. Lett.* 2002; 24:1839–1845. doi: 10.1023/A:1020994628109.
46. Antunes F, Marçal S, Taofiq O, Morais AMMB, Freitas AC, Ferreira ICFR, Pintado M. Valorization of Mushroom By-Products as a Source of Value-Added Compounds and Potential Applications. *Molecules*. 2020 Jun 9;25(11):2672.
47. Fazenda M.L., Seviour R., McNeil B., Harvey L.M. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 2008;63:33–103.
48. Mockaitis G, Ratusznei SM, Rodrigues JAD, Zaiat M, Foresti E (2006) Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *J Environ Manag* 79:198–206.
49. Smithers GW (2008) Whey and whey proteins-from ‘gutter-togold’. *Int Dairy J* 18:695–704.
50. Niego, Allen Grace, et al. “Macrofungi as a nutraceutical source: Promising bioactive compounds and market value.” *Journal of Fungi* 7.5 (2021): 397.
51. Carvalho, Fátima, Ana R. Prazeres, and Javier Rivas. “Cheese whey wastewater: Characterization and treatment.” *Science of the total environment* 445 (2013): 385-396.
52. Buchanan, Dominic, et al. “Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives.” *International Journal of Dairy Technology* 76.2 (2023): 291-312.
53. Ryan, Michael P., and Gary Walsh. “The biotechnological potential of whey.” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 15 (2016): 479- 498.
54. Prazeres, Ana R., Fátima Carvalho, and Javier Rivas. “Cheese whey management: A review.” *Journal of environmental management* 110 (2012): 48-68.

55. Okamoto, Kenji, et al. "Ethanol production from cheese whey and expired milk by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*." *Fermentation* 5.2 (2019): 49.
56. de Castro RJS, Domingues MAF, Ohara A, Okuro PK, dos Santos JG, Brexó RP, et al. Whey protein as a key component in food systems: physicochemical properties, production technologies and applications. *Food Struct.* 2017;14:17–29. 10.1016/j.foostr.2017.05.004.
57. Basiak E, Lenart A, Debeaufort F. Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch-whey protein blend edible films. *J Sci Food Agric.* 2017;97(3):858–67. 10.1002/jsfa.7807.
58. Mihalca, Vlad, et al. "Protein-based films and coatings for food industry applications." *Polymers* 13.5 (2021): 769.
59. Kamthan, Ritika, and Ishita Tiwari. "Agricultural wastes-potential substrates for mushroom cultivation." *European Journal of Experimental Biology* 7.5 (2017): 31.
60. Munekeata, Paulo ES, et al. "Strategies to increase the value of pomaces with fermentation." *Fermentation* 7.4 (2021): 299.
61. Tropea, A. Food Waste Valorization. *Fermentation* 2022, 8, 168.
62. Karimi, Sajjad, et al. "Use of organic wastes and industrial by-products to produce filamentous fungi with potential as aqua-feed ingredients." *Sustainability* 10.9 (2018): 3296.
63. Gassara, Fatma, et al. "Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*." *Biochemical Engineering Journal* 49.3 (2010): 388-394.
64. Mahmoud, Abeer E., et al. "Purification and characterization of a novel tannase produced by *Kluyveromyces marxianus* using olive pomace as solid support, and its promising role in gallic acid production." *International journal of biological macromolecules* 107 (2018): 2342-2350.
65. Boukhalifa-Lezzar, Hayet, et al. "Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation." *Artic. Int. J. Adv. Res* 2 (2014): 338-346.
66. Mehri, Dilara, N. Altinay Perendeci, and Yekta Goksungur. "Utilization of whey for red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation." *Fermentation* 7.2 (2021): 75.
67. Durval, Italo JB, et al. "Application of a biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from waste frying oil as an emulsifier in a cookie formulation." *Fermentation* 7.3 (2021): 189.

68. Tropea, Alessia, et al. "Aquafeed production from fermented fish waste and lemon peel." *Fermentation* 7.4 (2021): 272.
69. Lull, Cristina, Harry J. Wichers, and Huub FJ Savelkoul. "Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites." *Mediators of inflammation* 2005 (2005): 63-80.
70. Panda, S.K., Luyten, W., 2022. Medicinal mushrooms: Clinical perspective and challenges. *Drug Discov. Today* 27, 636–651.
71. Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., Stamatis, H., 2021. Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Futur. Foods* 4, 100086.
72. Li, J., Gu, F., Cai, C., Hu, M., Fan, L., Hao, J., Yu, G., 2020. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 806–813.
73. Liu, L., Feng, J., Gao, K., Zhou, S., Yan, M., Tang, C., Zhou, J., Liu, Y., Zhang, J., 2022. Influence of carbon and nitrogen sources on structural features and immunomodulatory activity of exopolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 119, 96–105.
74. Yang, K., Zhang, Y., Cai, M., Guan, R., Neng, J., Pi, X., Sun, P., 2020. In vitro prebiotic activities of oligosaccharides from the by-products in *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide extraction. *RSC Adv.* 10, 14794–14802.
75. Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. *InTech*. doi: 10.5772/53159.
76. Kolesovs, S., Semjonovs, P. Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 7723–7730 (2020).
77. Kantifedaki, A., Kachrimanidou, V., Mallouchos, A., Papanikolaou, S., Koutinas, A.A., 2018. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. *J. Clean. Prod.* 185.
78. Lee, H., Song, M., Hwang, S., 2003. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 38, 1685–1693.
79. Song, M., Kim, N., Lee, S., Hwang, S., 2007. Use of Whey Permeate for Cultivating *Ganoderma lucidum* Mycelia. *J. Dairy Sci.* 90, 2141–2146.
80. Tang, Y.-J., Zhong, J.-J., 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 20–28.

81. Diamantis, I.; Melanouri, E.-M.; Dedousi, M.; Panagopoulou, I.; Papanikolaou, S.; Stoforos, N.G.; Diamantopoulou, P. Sustainable and Eco-Friendly Conversions of Olive Mill Wastewater-Based Media by *Pleurotus pulmonarius* Cultures. *Fermentation* 2022, 8, 129.
82. Diamantopoulou, Panagiota, Chrysavgi Gardeli, and Seraphim Papanikolaou. "Impact of olive mill wastewaters on the physiological behavior of a wild-type new *Ganoderma resinaceum* isolate." *Environmental Science and Pollution Research* 28 (2021): 20570-20585.
83. Ekiz, Elif, et al. "Exploring the Potential Medicinal Benefits of *Ganoderma lucidum*: From Metabolic Disorders to Coronavirus Infections." *Foods* 12.7 (2023): 1512.
84. Fraga, I.; Coutinho, J.; Bezerra, R.M.; Dias, A.A.; Marques, G.; Nunes, F.M. Influence of Culture Medium Growth Variables on *Ganoderma Lucidum* Exopolysaccharides Structural Features. *Carbohydr. Polym.* 2014, 111, 936–946
85. Supramani, S.; Jailani, N.; Ramarao, K.; Mohd Zain, N.A.; Klaus, A.; Ahmad, R.; Wan-Mohtar, W.A.A.Q.I. Pellet Diameter and Morphology of European *Ganoderma Pfeifferi* in a Repeated-Batch Fermentation for Exopolysaccharide Production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, 19, 101118
86. Tang, Y.J.; Zhong, J.J. Exopolysaccharide Biosynthesis and Related Enzyme Activities of the Medicinal Fungus, *Ganoderma Lucidum*, Grown on Lactose in a Bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 2002, 24, 1023–1026,.
87. Song, M.; Kim, N.; Lee, S.; Hwang, S. Use of Whey Permeate for Cultivating *Ganoderma Lucidum* Mycelia. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 2141–2146,
88. Knežević, A.; Stajić, M.; Sofrenić, I.; Stanojković, T.; Milovanović, I.; Tešević, V.; Vukojević, J. Antioxidative, Antifungal, Cytotoxic and Antineurodegenerative Activity of Selected *Trametes* Species from Serbia. *PLoS One* 2018, 13, 1–18
89. Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M. and Popović, M. (2010), Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytother. Res.*, 24: 1473-1481.
90. Liu, X.; Yang, L.; Li, G.; Jiang, Y.; Zhang, G.; Ling, J. A Novel Promising Neuroprotective Agent: *Ganoderma Lucidum* Polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023, 229, 168–180
91. Fang, Q.-H.; Zhong, J.-J. Submerged Fermentation of Higher Fungus *Ganoderma Lucidum* for Production of Valuable Bioactive Metabolites—Ganoderic Acid and Polysaccharide. *Biochem. Eng. J.* 2002, 10, 61–65

92. Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1–2), 20–28
93. www.farkprocess.com

