



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

“Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες
εδώδιμων Ελληνικών μανιταριών του γένους *Pleurotus*”

Μαρία Ελένη Κουγιουμτζή

Τριμελής επιτροπή:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: **Καλογερόπουλος Νικόλαος**, Αναπληρωτής Καθηγητής
ΜΕΛΗ: **Ζερβάκης Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΓΠΑ
Καλιώρα Ανδριάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια

Αθήνα 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

- 1.1. Μύκητες και μανιτάρια
- 1.2. Μορφολογία μανιταριών
- 1.3. Κύκλος ζωής
- 1.4. Πώς τρέφονται τα μανιτάρια;
- 1.5. Μανιτάρια Pleurotus
- 1.6. Τα μανιτάρια στην Ελλάδα- σύντομη ιστορική αναδρομή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Διατροφική αξία

- 2.1 Υδατάνθρακες
- 2.2 β-γλυκάνες
- 2.3 Πρωτεΐνες
- 2.4 Λιποειδή
- 2.5 Στερόλες
- 2.6 Εργοστερόλη και βιταμίνη D
 - 2.6.1 Βιταμίνη D
 - 2.6.2 Μεταβολισμός
 - 2.6.3 Μανιτάρια και βιτ D
 - 2.6.4 Επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας σε μανιτάρια
- 2.7 Βιταμίνες και μέταλλα
- 2.8 Θεραπευτικά μανιτάρια
- 2.9 Αντιοξειδωτικά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέθοδοι

A ΜΕΡΟΣ:

A.3.1 Ξήρανση

A.3.2 Λυοφιλίωση (freeze drying)

A.3. Αντίδραση σιλυλίωσης

A.3.3.1 Γενικά

A.3.3.2 Σιλυλίωση με δι(τριμεθυλοσιλυλο)-τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA)

A.3.4 Αέρια χρωματογραφία

A.3.5 Είδη ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας

B ΜΕΡΟΣ:

B.3.1 Λιποπρωτείνες χαμηλής πυκνότητας (LDL-c)

B.3.2 Οξειδωμένη LDL-c

B.3.3 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης

B.3.4 Μελέτη οξείδωσης LDL-c και οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

B.3.5 Σχηματισμός συζευγμένων διενίων

B.3.6 Φασματοφωτομετρία ορατού- υπεριώδους

B.3.7 Elisa reader

B.3.8 Μελέτη οξείδωσης LDL ορού- συνεχής καταγραφή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πειραματικό μέρος

4.1 Δείγματα μανιταριών

4.2 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών με αέρια χρωματογραφία

4.2.1 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC/MS

4.2.2 Προσδιορισμός στερολών με GC/MS

4.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηρότητας των δειγμάτων *Pleurotus ostreatus* στις λιποπρωτείνες του ορού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση-Αποτελέσματα

5.1 Περιεκτικότητα αυτοφύων ελληνικών μανιταριών του είδους *P. ostreatus* σε λιπαρά οξέα.

5.2 Περιεκτικότητα αυτοφύων ελληνικών μανιταριών του είδους *P. ostreatus* σε στερόλες

5.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων μανιταριών *P. ostreatus* στις λιποπρωτείνες του ορού

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Τα μανιτάρια από τα αρχαία χρόνια αποτελούσαν ένα εκλεκτό έδεσμα χάρη στο ιδιαίτερο τους άρωμα και τη γεύση. Η διατροφική τους αξία είναι υψηλή χάρη στο περιεχόμενο τους σε πρωτεΐνη, διαιτητικές ίνες, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία καθώς και σε βιοδραστικές ουσίες που προάγουν την υγεία. Η λιποπεριεκτικότητα των μανιταριών είναι μικρή και κύριο λιπαρό οξύ είναι το απαραίτητο λινελαϊκό οξύ. Κύρια στερόλη είναι η εργοστερόλη, που αποτελεί προβιταμίνη της βιτ D. Με δεδομένο πως η ετήσια κατανάλωση μανιταριών στην Ελλάδα φθάνει τους 11.000 τόνους και πως ένα πολύ μικρό μέρος καλύπτεται από την εγχώρια παραγωγή το ενδιαφέρον για τη σύσταση των ελληνικών μανιταριών αυξάνεται.

Ο σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν η μελέτη της διακύμανσης σε βιοδραστικές ενώσεις αυτοφυών μανιταριών *P.ostreatus* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα αποτελέσματα εμπορικών και μη αυτοφυών δειγμάτων προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα εμπορικής αξιοποίησης των ελληνικών στελεχών. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν συνολικά 16 στελέχη μανιταριών του είδους *P.ostreatus* εκ των οποίων, 11 απομονώθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, 2 ήταν εισαγόμενα αυτοφυή και 3 ήταν εισαγόμενα εμπορικά. Μετά την ταυτοποίηση και τη φύλαξη στην τράπεζα μυκητιακών καλλιιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των μανιταριών της παρούσας εργασίας. Τα σώματα καρποφορίας συλλέχθηκαν και λυοφιλιώθηκαν. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα σαπωνοποιήθηκαν και τα λιπαρά οξέα μετατράπηκαν στους πτητικούς τους μεθυλεστέρες ενώ οι μη πτητικές στερόλες σιλυλιώθηκαν και προσδιορίστηκαν έπειτα από την μετατροπή τους σε πτητικούς τριμεθυλσιλυλαιθέρες. Τέλος εκτιμήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων τους στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού με ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης (συζυγή διένια) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τελική επιμήκυνση του lag time. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως τα ελληνικά μανιτάρια είναι τουλάχιστον ανταγωνιστικά με τα εμπορικά και η εμπορική τους αξιοποίηση καθώς και χρήση τους για την δημιουργία λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων είναι τουλάχιστον ελκυστική.

Abstract

Mushrooms , since ancient times ,have been considered as a delicacy because of their highly desirable taste and aroma. They have a great nutritional value since they are quite rich in protein,fiber, and they provide a nutritionally significant content of vitamins, minerals and trace elements as well as nutraceuticals that promote health. Generally, lipid content of mushroom species is low and the major fatty acid is the essential for human linoleic acid. The major fungal sterol is ergosterol, a provitamin of vitamin D. Considering that mushroom consumption in Greece averaged about 11.000 tones annually and that total mushroom quantities produced within the country cover only a small portion of them, the composition of Greek mushrooms is in great interest.

In this study an attempt was made to evaluate the variation in bioactive compounds of wild edible mushrooms belonging to *Pleurotus ostreatus* collected from different regions in Greece in order to investigate the possibility of commercial exploitation of Greek(autochthonous) strains. For this purpose 16 samples were analysed. 11 from those were collected from different regions in Greece ,2 were foreign wild strains and 3 more were widely used commercial strains .After their taxonomic identification they were preserved in the fungal Culture Collection of the Laboratory of General and Agricultural Microbiology (Agricultural University of Athens, Greece).These strains were used for the cultivation of mushrooms which were analysed in this study. Their fruit bodies were collected and freeze-dried. Freeze-dried samples were saponified and fatty acids were converted to their respective methyl esters(FAME).Non-volatile sterols were silylated in order to render them more volatile. Finally, the potential of mushroom methanolic extracts to inhibit the oxidation of human serum lipoproteins was evaluated by detection of conjugated dienes. As a criterion increase in lag time was used for antioxidative potency. As results obtained, greek wild strains are at least competitive with commercial strains and either their commercial exploitation or their use as functional foods is attractive.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος “μανιτάρι” συχνά αναφέρεται στην ομάδα των μακροσκοπικών νηματοειδών μυκήτων που σχηματίζουν μεγάλες(μακροσκοπικά ορατές) καρποφορίες.

Τα μανιτάρια από τα αρχαία χρόνια αποτελούσαν μέρος της διατροφής των ανθρώπων και θεωρούνταν ένα εκλεκτό έδεσμα χάρη στο ιδιαίτερο τους άρωμα και τη γεύση ,ενώ η διατροφική αξία και οι θεραπευτικές ιδιότητες τους είναι γνωστές από αρχαιοτάτων χρόνων .Οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν τα μανιτάρια για την ενίσχυση της δύναμης και της αντοχής των πολεμιστών κατά τη μάχη , οι Κινέζοι πίστευαν πως δρουν ως ελιξίριο της ζωής αλλά και ως θεραπεία για πολλές ασθένειες ενώ οι Ιάπωνες θεωρούσαν πως διαθέτουν αφροδισιακές ιδιότητες και μάλιστα καλλιεργούσαν τα μανιτάρια shiitake (*Lentinula edodes*) σε κρυφές και φυλασσόμενες τοποθεσίες.(Chang et al ,1996)

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 14.000 είδη μανιταριών (Chatterjee et al ,2011) ενώ περισσότερα από 3000 είδη θεωρούνται εδώδιμα (Reis,2012).Η συλλογή των αυτοφυών εδωδιμων μανιταριών είναι μια συνήθεια που οι άνθρωποι υιοθέτησαν από πολύ παλιά και μέσα από δοκιμές και λάθη έμαθαν να αποφεύγουν τα δηλητηριώδη(Mattila,2000). Σήμερα, με δεδομένο πως η γνώση σχετικά με την ασφάλεια των αυτοφυών μανιταριών χάθηκε στο πέρασμα των χρόνων θα λέγαμε πως περισσότερο ασφαλής είναι η κατανάλωση των καλλιεργούμενων μανιταριών εφόσον οι συλλέκτες δε γνωρίζουν να διακρίνουν τα αυτοφυή από τα εδώδιμα.(Marshall et al,2009)

Υπολογίζεται πως 100 είδη μανιταριών καλλιεργούνται σε όλον τον κόσμο ενώ μόλις 10 παράγονται σε βιομηχανική κλίμακα. Τα πιο δημοφιλή εμπορεύσιμα είδη είναι τα *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* , *Pleurotus* spp και *Flammulina velutipes* που αποτελούν το 75% των μανιταριών που καλλιεργούνται παγκοσμίως. Οι κύριοι λόγοι που έκαναν αυτά τα είδη να ξεχωρίσουν είναι πως χρειάζονται μικρότερο χρόνο ανάπτυξης, και λιγότερους περιβαλλοντικούς ελέγχους με αποτέλεσμα η καλλιέργεια τους να είναι σχετικά απλή και οικονομικά συμφέρουσα.

Η διατροφική αξία των μανιταριών είναι υψηλή. Η περιεκτικότητά τους σε νερό φθάνει το 90% , κάτι που επιδρά άμεσα στη συντήρησή τους, καθώς μέσω της αφυδάτωσης μπορεί να επέλθει σημαντική επιμήκυνση του χρόνου ζωής. Ακόμα είναι πλούσια σε πρωτεΐνη, σε διαιτητικές ίνες καθώς και σε βιταμίνες και μέταλλα, ενώ αντίθετα έχουν χαμηλή λιποπεριεκτικότητα και επακόλουθα χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο (Valverde,2015)

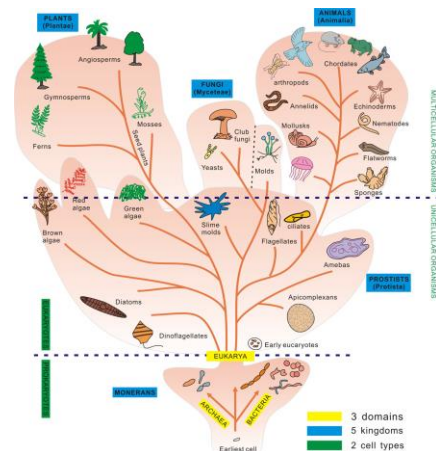
Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών που συχνά περιγράφονται ως μικρά εργοστάσια παραγωγής ενώσεων με θαυματουργές βιολογικές δράσεις. Αυτά τα βιοενεργά συστατικά είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές δράσεις που αποδίδονται στα μανιτάρια όπως αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιυπερχοληστερολαιμικές, αντιφλεγμονώδεις καθώς και αντικαρκινικές δράσεις.

Όλα τα παραπάνω μας επιτρέπουν να υποθέσουμε πως τα μανιτάρια προβάλλουν μια εξαιρετική δυνατότητα για έρευνα.

1.1 ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια είναι οι μακροσκοπικές καρποφορίες κυρίως βασιδιομυκήτων αλλά και κάποιων ασκομυκήτων και ανήκουν στον εξελικτικό χώρο των ευκαρυωτικών οργανισμών .(Miles,Chang,1997). Αρχικά ταξινομήθηκαν από τον Λινναίο στα κατώτερα φυτά, στα Θαλλόφυτα, μια επιλογή που οφειλόταν κυρίως στην απλότητα που χαρακτήριζε τα ανατομικά και δομικά χαρακτηριστικά τους αφού δεν διαθέτουν ρίζες, καρπούς, φύλλα ή άνθη. Η παρουσία του κυτταρικού τοιχώματος συντέλεσε στο να θεωρηθούν περισσότερο συγγενή με τα φυτά παρά με τα ζώα. (Miles,Chang,2004)

Τα μανιτάρια μαζί με άλλους μύκητες , σύμφωνα με το ταξινομικό σχήμα του Whittaker αποτελούσαν ένα από τα πέντε βασίλεια στα οποία κατατάσσονταν τα έμβια όντα με κυτταρική δομή, το βασίλειο των μυκήτων.(Whittaker et al,1978)). Όμως νεώτερα φυλογενετικά δεδομένα που βασίζονται στη χρήση μοριακών δεικτών, αποδεικνύουν πως οι Μύκητες αποτελούν ένα από τα περισσότερα από επτά Βασίλεια έμβιων οργανισμών (<http://tolweb.org/>).

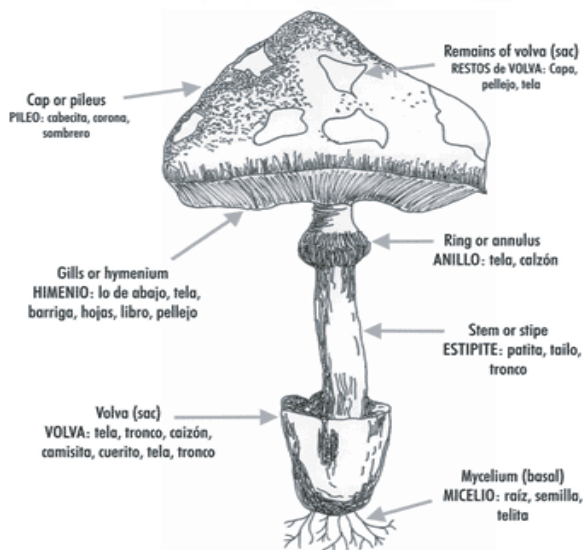


Οι μύκητες είναι ετερότροφοι ,ευκαρυωτικοί οργανισμοί και μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Η κύρια διαφορά από τα Φυτά έγκειται στη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος, καθώς κύριο συστατικό του είναι η χιτίνη ενώ κύρια διαφορά από το βασίλειο των ζώων αποτελεί ο τρόπος με τον οποίο τρέφονται. Οι μύκητες όπως και τα ζώα είναι ετερότροφοι οργανισμοί, ωστόσο προσλαμβάνουν την απαιτούμενη ενέργεια μέσω απορρόφησης από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται και όχι μέσω διαδικασίας πέψης.

Ανάλογα με τη μορφή του σώματος καρποφορίας οι μύκητες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν οι μύκητες που το σώμα του κάθε ατόμου αποτελείται από ένα και μόνο κύτταρο. Οι μύκητες αυτοί ονομάζονται μονοκύτταροι και δεν είναι άλλοι από τις γνωστές ζύμες. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μύκητες το οποίων το σώμα αποτελείται από λεπτά διακλαδιζόμενα

νημάτια τα οποία ονομάζονται υφές. Το σύνολο των υφών απαρτίζει το σώμα του μύκητα το οποίο ονομάζεται μυκήλιο , και οι μύκητες αυτοί ονομάζονται μυκηλιακοί. Οι μυκηλιακοί μύκητες ανάλογα με τον τύπο των υφών διακρίνονται στους πολυκύτταρους και στους κοινοκύτταρους. Οι υφές των πολυκύτταρων μυκήτων εμφανίζουν κατά διαστήματα εγκάρσια διαφράγματα με αποτέλεσμα στο μικροσκόπιο να φαίνεται πως αποτελούνται από πολλά κύτταρα. Οι μύκητες που σχηματίζουν μανιτάρια δηλαδή οι Βασιδιομύκητες και οι Ασκομύκητες είναι πολυκύτταροι μύκητες.

Scientific and popular names for the parts of a mushroom

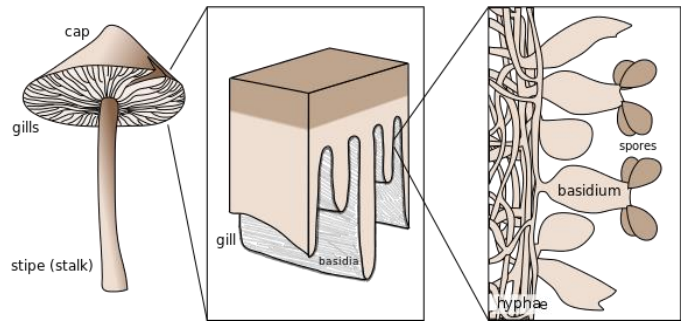


1. 2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

Στα μανιτάρια υπάρχουν δύο τμήματα : το ορατό μέρος το οποίο ονομάζεται σώμα καρποφορίας (καρπόσωμα) και το μυκήλιο ή θαλλός το οποίο αναπτύσσεται κάτω από το έδαφος ή εντός του υποστρώματος ανάπτυξης και σχηματίζεται από πολλές διακλαδώσεις σε όλο το μήκος των υφών. Ο χρόνος ζωής των καρποφοριών κυμαίνεται από 10-14 ημέρες ή και λιγότερο .(Kalaç ,2009)

Όσον αφορά την μορφολογία των μανιταριών *Pleurotus* ,οι καρποφορίες αποτελούνται από τον στύπο (μίσχο) ο οποίος μπορεί να είναι κοντός ή μακρύς ενώ κάποιες φορές απουσιάζει. Δαχτυλίδι και ο βόλβα απουσιάζουν και οι καρποφορίες είναι συνήθως οστρακόμορφα για αυτό συχνά αναφέρονται ως oyster mushrooms.Το μέγεθος των *Pleurotus* διαφέρει από είδος σε είδος αλλά μπορεί να διαφοροποιείται ανάμεσα και σε μανιτάρια του ίδιου είδους που αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες κλίματος και σύστασης του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά. Γενικά οι καρποφορίες έχουν πλάτος που κυμαίνεται από 2-3 cm(ελάχιστο) μέχρι 15-20 cm(μέγιστο). Το χρώμα δεν μπορεί να μας βοηθήσει στην αναγνώριση των μανιταριών του γένους αυτού καθώς όχι μόνο εμφανίζεται μεγάλη ποικιλία χρωμάτων αλλά επιπλέον το ίδιο είδος μανιταριού μπορεί να προκύψει σε διάφορα χρώματα ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. (Rajarathnam et al ,1987)

Τα μανιτάρια *Pleurotus* ανήκουν στους βασιδιομύκητες και φέρουν τα σπόρια τους εξωτερικά σε εξειδικευμένες αναπαραγωγικές δομές που ονομάζονται βασίδια. Τα ελάσματα στην κάτω επιφάνεια του πύλου καλύπτονται από ένα γόνιμο στρώμα με βασίδια που φέρουν βασιδιοσπόρια και είναι χαρακτηριστικό πως



ένας πύλος διαμέτρου 10 cm μπορεί να παράγει μέχρι 100 εκατομμύρια σπόρια ανά ώρα

1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Τα μανιτάρια *Pleurotus* ξεκινούν τον κύκλο ζωής τους ως απλοειδή σπόρια που απελευθερώνονται από ένα βασίδιο. Η πιθανότητα να φθάσουν σε ένα υπόστρωμα κατάλληλο ώστε να μπορούν να βλαστήσουν είναι πολύ μικρή αλλά η δυσκολία αυτή αντιμετωπίζεται από τον μεγάλο αριθμό σπορίων που παράγονται. Εφόσον το σπόριο φθάσει σε κατάλληλο υπόστρωμα βλασταίνει και σχηματίζεται ένα απλοειδές μυκήλιο το οποίο αναπτύσσεται μέχρι να συναντήσει ένα άλλο «συμβατό» απλοειδές μυκήλιο με το οποίο θα γίνει σύντηξη των κυτταρικών τους τοιχωμάτων και θα προκύψει ένα κύτταρο με δύο γενετικά διαφορετικούς απλοειδείς πυρήνες. Το νέο κύτταρο πολλαπλασιάζεται και διαιρείται όπως ένας πολυκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός μέχρι να «δοθεί το σήμα» για το σχηματισμό καρποφορίας. Τότε το μανιτάρι σχηματίζει δικαρυωτικά βασίδια τα οποία βρίσκονται στη επιφάνεια των ελασμάτων. Έπειτα γίνεται σύντηξη των πυρήνων στα βασίδια και τελικά σχηματίζεται ένας διπλοειδής πυρήνας ο οποίος γρήγορα ξεκινά τη διαδικασία της μείωσης. Κάθε διπλοειδή πυρήνα προκύπτουν τέσσερις απλοειδείς οι οποίοι οδεύουν σε (συνήθως) ισάριθμα βασιδιοσπόρια και στη συνέχεια κάθε ένας μπορεί να ξεκινήσει τον κύκλο από την αρχή (Marshall et al, 2009)

1.4 ΠΩΣ ΤΡΕΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια και οι μύκητες δεν διαθέτουν χλωροφύλλη και έτσι δεν μπορούν να αξιοποιήσουν το διοξείδιο του άνθρακα και το φως του ήλιου ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, όπως τα φυτά για να τραφούν. Τα μανιτάρια είναι ετερότροφοι οργανισμοί και οι υδατάνθρακες αποτελούν την κύρια πηγή άνθρακα. Έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να μεταβολίζουν διαλυτούς υδατάνθρακες όπως είναι η γλυκόζη, η ξυλόζη, η σακχαρόζη και η φρουκτόζη, μη διαλυτούς υδατάνθρακες όπως άμυλο, κυτταρίνη και ημικυτταρίνες καθώς και ιδιαίτερα πολύπλοκες ενώσεις όπως η λιγνίνη. Ακόμα ορισμένα μπορούν να αξιοποιήσουν και πρωτεΐνες ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Τα μανιτάρια αξιοποιούν τις πρωτεΐνες και τους αδιάλυτους υδατάνθρακες ως πηγή ενέργειας, αποικοδομώντας τα μόρια αυτά εξωκυτταρικά με τη βοήθεια ενζύμων που εκκρίνουν στη επιφάνεια που αναπτύσσονται. Στη συνέχεια τα προϊόντα που προκύπτουν από την πέψη των ενζύμων, και εφόσον βρίσκονται με τη μορφή διαλύματος απορροφώνται μέσω των τοιχωμάτων των υφών και μάλιστα η απορρόφηση μπορεί να γίνει από όλη την επιφάνεια του μυκηλίου.

Τα μανιτάρια έχουν αναπτύξει τρεις διαφορετικούς τρόπους για να προσλαμβάνουν την τροφή τους: τον παρασιτικό, τον σαπροτροφικό και τον συμβιωτικό (μυκορριζικό). Τα παρασιτικά μανιτάρια ζουν σε βάρος άλλων ζώντων οργανισμών, ζώων και φυτών στα οποία προκαλούν προβλήματα, και είναι ικανά να προκαλέσουν μεγάλη ζημιά σε καλλιέργειες. Τα μυκορριζικά μανιτάρια εμφανίζουν μεγάλο οικονομικό και οικολογικό ενδιαφέρον καθώς, όπως υποδηλώνει και το ονομά τους, συμβιών με τα φυτά. Συγκεκριμένα το μυκήλιο του μανιταριού σχηματίζει με τις ρίζες του φυτού ένα σύνθετο όργανο που ονομάζεται μυκορριζα και μέσω αυτής το φυτό τροφοδοτείται με ανόργανα χημικά στοιχεία (πχ φώσφορο) που από μόνο του δεν θα μπορούσε επαρκώς να προσλάβει, ενώ ο μύκητας τροφοδοτείται με υδατάνθρακες οι οποίοι παράγονται από το φυτό μέσω της φωτοσύνθεσης. Τέλος, τα σαπροτροφικά μανιτάρια προσλαμβάνουν την τροφή τους από την νεκρή οργανική ύλη (πχ κορμοί νεκρών δέντρων, φύλλα, θάμνοι) την οποία και διασπούν με τη βοήθεια των ενζύμων που διαθέτουν. Στα μανιτάρια αυτά υπάρχει μεγάλη εξειδίκευση στις συνθήκες και στο υπόστρωμα που αναπτύσσονται. Συγκεκριμένα τα μανιτάρια που αναπτύσσονται αποκλειστικά σε ξύλο διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, σε όσα ανήκουν στους μύκητες λευκής σήψης και σε όσα ανήκουν στους μύκητες φαιάς (καφέ) σήψης, ανάλογα με τα συστατικά του ξύλου που μπορούν να αξιοποιήσουν. Έτσι τα πρώτα μπορούν να διασπάσουν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και κυρίως την λιγνίνη με την βοήθεια κυτταρινασών και λιγνινολυτικών ενζύμων.

Αντίθετα, τα δεύτερα μπορούν να μεταβολίσουν κυρίως την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη ενώ σε πολύ περιορισμένο βαθμό και τη λιγνίνη. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μυκήτων λευκής σήψης αποτελούν τα μανιτάρια *Pleurotus*.

Οι διατροφικές απαιτήσεις των σαπροτροφικών μυκήτων έχουν καθορισθεί πειραματικά. Υπάρχει απόλυτη ανάγκη σε οξυγόνο και υδρογόνο τα οποία συνήθως παρέχονται με τη μορφή νερού και ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται απλά σάκχαρα ή άμυλο. Η πλειονότητα των μυκήτων ευδοκimei όταν χρησιμοποιείται γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, μαλτόζη ως πηγή άνθρακα και όχι τόσο σακχαρόζη. Τα προϊόντα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους περισσότερους μύκητες ως πηγή αζώτου, αμμωνίου και νιτρικών ενώ αντίθετα το ατμοσφαιρικό άζωτο δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για την παραγωγή χρήσιμων ενώσεων. Οι περισσότεροι μύκητες για να αναπτυχθούν απαιτούν στοιχεία όπως φώσφορο, θείο, κάλιο, μαγνήσιο καθώς και μικρές ποσότητες σιδήρου, ψευδαργύρου, μαγγανίου και χαλκού. Τέλος οι περισσότεροι μύκητες είναι σε θέση να συνθέτουν όλες τις απαραίτητες για την ανάπτυξη τους βιταμίνες αν και ορισμένοι που εμφανίζουν έλλειψη σε θειαμίνη και βιοτίνη θα πρέπει να τις προσλαμβάνουν από το περιβάλλον.

Συμπερασματικά θα λέγαμε πως τα μανιτάρια όπου και να βρίσκονται έχουν ιδιαίτερα σημαντικούς ρόλους χάρη στη δυνατότητα τους να εκκρίνουν ένζυμα για την αποικοδόμηση των υποστρωμάτων σε απλούστερες οργανικές ενώσεις οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούνται από τους μύκητες για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών. Σήμερα γνωρίζουμε πως ο ρόλος των μυκήτων στην ανακύκλωση της ύλης είναι πολύτιμος. (Miles et al,2004)

1.5 MANITAPIA PLEUROTUS

Το γένος *Pleurotus* ανήκει στους βασιδιομύκητες. Κύριο γνώρισμά τους είναι πως τα σώματα καρποφορίας διαθέτουν έναν κεντρικό στύπο(stipe) ο οποίος συνδέεται με τον πύλο «καπέλο» (pileus).Στη φύση βρίσκονται συνήθως ως σαπρότροφα σε απονεκρωμένους κορμούς δέντρων και παράγουν ένα ευρύ φάσμα υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων με αποτέλεσμα να μπορούν να αποικοδομούν φυτικά υπολείμματα.

Τα μανιτάρια *Pleurotus* μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών το οποίο κυμαίνεται μεταξύ των 15-31 °C και επιπλέον μπορούν να αποικίζουν διάφορα φυσικά υποστρώματα. (Rajarithnam et al,1987)

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει πολλά είδη εδώδιμων μανιταριών και σύμφωνα με τον Singer(1986) μπορεί να διακριθεί σε 6 διαφορετικές ταξινομικές ομάδες(με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά): *Lepiotarii*, *Calyptrati*, *Coremiopleurotus* και *Tuberregium*, *Pleurotus* και *Lentodiellum*. Οι δε δύο τελευταίες εμφανίζουν και το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον.

Τα *Pleurotus* καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά στη Γερμανία κατά τη διάρκεια του πρώτου παγκοσμίου πολέμου. Σήμερα πολλά είδη του γένους *Pleurotus* καλλιεργούνται για εμπορικούς σκοπούς λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας αλλά φυσικά και λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής. Πολλές έρευνες από διαφορετικές περιοχές της γης επιβεβαιώνουν όχι μόνο την υψηλή διατροφική τους αξία αλλά επιπλέον και την ύπαρξη πολλών βιοενεργών συστατικών στα οποία συμπεριλαμβάνονται στερόλες , τερπενοειδή, και πολλά άλλα με πολλά υποσχόμενες ευεργετικές για τον άνθρωπο ιδιότητες.

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει περίπου 15 διαφορετικά είδη μανιταριών στα οποία αναφερόμαστε συνήθως με τη γενική ονομασία oyster mushrooms και τα οποία αναπτύσσονται ευρέως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές αλλά και με μεγάλη ευκολία σε τεχνητές καλλιέργειες. Χαρακτηριστικά είδη του γένους αυτού είναι: *P. ostreatus*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *P. djamon*. Σήμερα τα μανιτάρια αυτά αποτελούν ένα εκλεκτό έδεσμα και μάλιστα είναι αποδεκτά τόσο από χορτοφάγους όσο και από μη. Η ιδιαίτερη τους γεύση αλλά και το άρωμα οφείλεται στις περίπου 150 διαφορετικές αρωματικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφορετικά είδη μανιταριών, στην περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα και νουκλεοτίδια αλλά και σε ορισμένα άλλα συστατικά όπως άζωτο, φώσφορο, κάλιο, θείο, σίδηρο, ψευδάργυρο, καθώς και στην αυτοοξειδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων. (Deepalakshmi et al 2014)

1.6 ΤΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ- ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η Ελλάδα διαθέτει μεγάλη βιοποικιλότητα που οφείλεται στη γεωγραφική της θέση, στην υψηλή γεωμορφολογική της ποικιλία(μεγάλος αριθμός νήσων ,γρήγορες αλλαγές από πεδιάδες σε θάλασσες και σε μεγάλες οροσειρές) ,καθώς και στην ήπια παρέμβαση του ανθρώπου συγκριτικά με τις χώρες της βόρειας Ευρώπης. Παρόλο που οι γνώσεις γύρω από τα είδη της ελληνικής χλωρίδας είναι ικανοποιητικές και μάλιστα υπολογίζεται πως ο αριθμός τους είναι ένας από τους μεγαλύτερους συγκριτικά με άλλες ευρωπαϊκές χώρες παρόμοιας ή και μεγαλύτερης έκτασης θα λέγαμε πως για τους μύκητες και τα μανιτάρια δεν ισχύει το ίδιο. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί περίπου 2500 είδη, ενώ σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες ο αριθμός φθάνει τα 12000 και τα 10000 είδη. Ο αριθμός αυτός θεωρείται μικρός αφενός γιατί η ανίχνευση και η καταγραφή τους συνεχίζεται και αφετέρου επειδή η υψηλή ποικιλομορφία των οικολογικών συνθηκών σε συνδυασμό με την πλούσια χλωρίδα, δημιουργούν πολλούς διαφορετικούς βιότοπους για την ανάπτυξη τους. (Zervakis ,2001)

Η ιστορία της καλλιέργειας των μανιταριών στην Ελλάδα δεν είναι μεγάλη. Τα πρώτα μανιτάρια που καλλιεργήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '60 ήταν λευκά μανιτάρια- *Agaricus bisporus*- που καλλιεργήθηκαν σε μικρές φάρμες ή και αποθήκες οι οποίες ωστόσο τα επόμενα χρόνια αντικαταστάθηκαν από μεγαλύτερες μονάδες ειδικά σχεδιασμένες για την παραγωγή μανιταριών.

Αρχικά η καλλιέργεια των μανιταριών γινόταν από ανθρώπους με όρεξη για δουλειά που δεν είχαν όμως την απαιτούμενη γνώση και εμπειρία. Η καθοδήγηση από αρμόδιους φορείς απουσίαζε και έτσι έπρεπε μόνοι τους να αντιμετωπίσουν προβλήματα που προέκυπταν από την ίδια τη διαδικασία της παραγωγής αλλά και δυσκολίες όπως η ανωριμότητα του ελληνικού αγοραστικού κοινού για την αποδοχή των μανιταριών ως εκλεκτών τροφίμων. Παράλληλα η έλλειψη συνεργασίας μεταξύ των παραγωγών δεν βοήθησε στο να προωθηθεί το προϊόν και να γίνει γρηγορότερα αποδεκτό.

Τις δεκαετίες 1976-1985 η καλλιέργεια των μανιταριών γνώρισε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη. Πολλές νέες καλλιέργειες με έλλειψη ωστόσο τεχνολογικού εξοπλισμού τέθηκαν σε λειτουργία έχοντας τη στήριξη προνομιακών οικονομικών πακέτων που παρέχονταν από το ελληνικό κράτος το οποίο ωστόσο δεν ήταν σε θέση ακόμα να τους παρέχει συμβουλές σχετικά με την καλλιέργεια αλλά και την προώθηση των μανιταριών με αποτέλεσμα μέχρι και τη δεκαετία του 1990 πολλές από αυτές να μην ευδοκμήσουν. Την ίδια περίοδο η καλλιέργεια των μανιταριών *Pleurotus* αποτέλεσε μια εναλλακτική πρόταση για τους παραγωγούς μανιταριών.

Από το 1996 και έπειτα η καλλιέργεια των μανιταριών στην Ελλάδα σημείωσε σημαντική πρόοδο καθώς αυξήθηκε η ζήτηση , η γνώση γύρω από το αντικείμενο και τέθηκαν σε λειτουργία μεγάλες και εκσυγχρονισμένες μονάδες. Η παραγωγή των μανιταριών άρχισε σταδιακά να αυξάνεται. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής καλυπτόταν από λευκά μανιτάρια (*Agaricus bisporus*) ενώ σταδιακά τα μανιτάρια *Pleurotus* κέρδισαν περισσότερο έδαφος. Ωστόσο μέχρι και σήμερα οι ποσότητες που παράγονται στην Ελλάδα δεν είναι ικανές να καλύψουν τη ζήτηση με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος να καλύπτεται από εισαγόμενα μανιτάρια. (Philippoussis, A. & Zervakis, G. 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ

Το 90% των μανιταριών αποτελείται από νερό. Τα μανιτάρια έχουν πολύ μικρό ξηρό βάρος, το οποίο συνήθως κυμαίνεται μεταξύ των 80 και 140 g kg⁻¹, και περίπου το 50% αυτού αποτελείται από υδατάνθρακες. (Valverde, 2015) (Kalac 2012)

Το περιεχόμενο των μανιταριών σε λίπος και επακόλουθα και σε ενέργεια είναι πολύ χαμηλό αφού υπολογίζεται πως 100 g παρέχουν μόλις 30 Kcal. Παράλληλα το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες και διαιτητικές ίνες είναι σημαντικό και αποτελούν μια καλή πηγή βιταμινών μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Τέλος τα μανιτάρια διαθέτουν ουσίες οι οποίες μπορούν να προάγουν την υγεία (nutraceuticals) όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες, καροτενοειδή (Barros et al, 2008). Ανάλογα με το είδος υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στη σύνθεση. Ωστόσο μεγάλες διαφορές παρατηρούνται και μέσα στο ίδιο είδος οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες όπως είναι η διαφορετική σύνθεση του υποστρώματος και το διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης του σώματος καρποφορίας.

2.1 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Αν και οι υδατάνθρακες αποτελούν σημαντικό μέρος της σύστασης των μανιταριών συνολικά θα λέγαμε πως η ποσότητα τους είναι πολύ μικρή (<http://www.mushrooms.ca/nutrition/diabetes.aspx>). Έπειτα από σύγκριση με ενδεικτικά τρόφιμα προέκυψε πως όχι μόνο περιέχουν λιγότερους υδατάνθρακες από τα αμυλούχα τρόφιμα και τα αμυλούχα λαχανικά αλλά και από άλλα λαχανικά όπως τα καρότα και το μπρόκολο (USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 27)

Τρόφιμα	Μανιτάρια Pleurotus ωμά (100 g)	Καρότο ωμό (100 g)	Μπρόκολο ωμό (100 g)	Καλαμπόκι γλυκό ωμό (100g)	Μακαρόνια βρασμένα (100g)
Υδατάνθρακες (g)	6.09	9.58	6.64	18.70	26.54

Το 35-75 % του ξ.βάρους των μανιταριών αποτελείται από υδατάνθρακες (Cheung, 2013) στους οποίους περιλαμβάνονται μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (γλυκάνες IUPAC)

Τα σάκχαρα αποτελούν μικρό μέρος του συνόλου των υδατανθράκων και κύριοι εκπρόσωποι είναι η μαννιτόλη (πολυόλη) και η τρεχαλόζη (δισακχαρίτης). (Barros et al, 2008) Το κυτταρικό τοίχωμα των μανιταριών αποτελείται κυρίως από χιτίνη (μη υδατοδιαλύτος πολυσακχαρίτης) αλλά και από άλλους πολυσακχαρίτες όπως ημικυτταρίνες, γλυκάνες, μανάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες.

Οι διαιτητικές ίνες, είναι υδατάνθρακες και προέρχονται από εδώδιμα μέρη φυτών που δεν πέπτονται και δεν απορροφώνται από το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου έχοντας ευεργετικές φυσιολογικές δράσεις. Σήμερα τα οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση διαιτητικών ινών είναι γνωστά καθώς η επαρκής πρόσληψη έχει συσχετισθεί με πρόληψη πολλών νοσημάτων. Οι διαιτητικές ίνες των μανιταριών είναι κυρίως μη υδατοδιαλυτές. Παρόλο που τα ερευνητικά δεδομένα είναι περιορισμένα η περιεκτικότητα των μανιταριών σε υδατοδιαλυτές και μη υδατοδιαλυτές ίνες είναι περίπου 40-90 και 220-300 g Kg⁻¹ ξηρού βάρους αντίστοιχα. Το σχετικά υψηλό περιεχόμενο τους σε μη υδατοδιαλυτές φυτικές ίνες αποτελεί διατροφικό πλεονέκτημα. Συγκεκριμένα, σε μελέτη των P.Chirinang et al (2009) όπου αναλύθηκαν μανιτάρια *P.ostreatus* φάνηκε πως η περιεκτικότητά τους σε διαιτητικές ίνες είναι σημαντικά υψηλή. (45,5% ξ.β.)

2.2 β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ

Οι β-γλυκάνες είναι μια ετερογενής ομάδα ενώσεων που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών και συνδέονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς ενώ μπορεί διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, τη διαλυτότητα και τη διαμόρφωση στο χώρο. Το περιεχόμενο των μανιταριών σε β-γλυκάνες είναι 0,21-0,53 g/100 g ΞΒ. Από αυτά το 54-82% αντιστοιχεί σε μη υδατοδιαλυτές ενώ το 16-46% σε υδατοδιαλυτές. Βιοενεργές δράσεις εμφανίζουν οι υδατοδιαλυτές β-γλυκάνες και μάλιστα το μοριακό βάρος, ο αριθμός των διακλαδώσεων και η δομή στο χώρο καθορίζουν τις φυσικές και θεραπευτικές τους δράσεις ενώ πολύ μικρές διαφορές στα παραπάνω χαρακτηριστικά συνεπάγονται μεγάλες λειτουργικές διαφορές (Stachowiak,2012). Συγκεκριμένα όσο αυξάνεται το μοριακό τους βάρος τόσο αυξάνεται και η βιοδραστικότητα τους.

Οι λεντινάνες και οι πλευράνες(β-γλυκάνες) είναι υδατοδιαλυτοί δομικοί πολυσακχαρίτες και στα μανιτάρια εντοπίζονται κυρίως β γλυκάνες με γλυκοζυλιωτικούς δεσμούς β(1,4) και β(1,6) (Manzi et al,2000).Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον γύρω από τις β-γλυκάνες που προέρχονται από μύκητες λόγω των θετικών τους επιδράσεων στην υγεία. Οι κύριες ιδιότητες που αποδίδονται στις β-γλυκάνες ,από περιορισμένο ωστόσο όγκο δεδομένων είναι αντικαρκινικές δράσεις, μέσω επίδρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα (στη δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, στην παραγωγή ενεργών ενδιάμεσων οξυγόνου(ROI) και μεσολαβητών φλεγμονής)και η συμμετοχή στο μεταβολισμό των λιπιδίων, προκαλώντας μείωση της χοληστερόλης και καλύτερο έλεγχο του βάρους.(Rop O et al ,2009)

Οι β-γλυκάνες όπως και οι φυτοστερόλες μπορούν να μειώσουν τη χοληστερόλη κατά 10-15%. Η ικανότητα αυτή των β-γλυκανών αποδίδεται στη αναστολή που προκαλούν στο σχηματισμό των μικκυλίων στο λεπτό έντερο ενώ ένας άλλος πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με τα χολικά οξέα και συγκεκριμένα την αύξηση της αποβολής τους μέσω του εντέρου καθώς και την αύξηση της ηπατικής μετατροπής της χοληστερόλης σε χολικά οξέα(Gil-Ramirez et al,2011).

Με δεδομένο πως σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πιο συχνή αιτία θανάτου στο δυτικό κόσμο γίνονται προσπάθειες εύρεσης ενώσεων που βοηθούν στην μείωση της χοληστερόλης και επακόλουθα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά λειτουργικών τροφίμων. Έτσι οι β-γλυκάνες μπορούν να αποτελέσουν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια αυτή.

2.3 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Τα μανιτάρια διαθέτουν υψηλά ποσοστά πρωτεΐνης συγκριτικά με τα αμυλούχα τρόφιμα και τα λαχανικά. Έπειτα από σύγκριση με δείγματα κριθαριού, καλαμποκιού και σιταριού προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Σύγκριση μανιταριών με άλλα τρόφιμα (% ΞΒ) (Petrovska, 2001)

ΤΡΟΦΙΜΟ	Ολικές πρωτεΐνες(N*6,25)
Κριθάρι	11,2
Καλαμπόκι	9,82
Σιτάρι	13,52
Ρύζι	8,32
Άγριο ρύζι	16,1
Μανιτάρι	32,6

Η πρωτεΐνη στα μανιτάρια υπολογίζεται περίπου στα 200-250 g Kg⁻¹ ΞΒ με τη λευκίνη , τη βαλίνη, τη γλουταμίνη , το γλουταμινικό και το ασπαραγινικό οξύ να αποτελούν τα κύρια αμινοξέα ενώ οι ποσότητες μεθειονίνης είναι πολύ περιορισμένες. Ακόμα έχουν εντοπιστεί ποσότητες και δύο άλλων σημαντικών αμινοξέων του γ-αμινοβουτυρικού (GABA) , σημαντικού νευροδιαβιβαστή που δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα , και της ορνιθίνης που αποτελεί πρόδρομο μόριο της αργινίνης. (Manzi,1999)

Ανάλογα με το είδος των μανιταριών υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες. (Petrovska,2001) .

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως σε αρκετές μελέτες προσδιορισμού της ολικής πρωτεΐνης στα μανιτάρια με τη Μέθοδο Kjeldahl χρησιμοποιείται ο συντελεστής 6,25. Ωστόσο αυτό πολλές φορές οδηγεί σε υπερεκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης λόγω του μη πρωτεϊνικού αζώτου που περιέχεται στη χιτίνη, έτσι ο συντελεστής 4,38 κρίνεται πιο αξιόπιστος. (Kalac, 2012)

Σε ότι αφορά τη σύσταση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και σε απαραίτητα αμινοξέα μικρός όγκος δεδομένων προτείνει πως η διατροφική αξία της πρωτεΐνης των μανιταριών είναι υψηλότερη από την πρωτεΐνη που υπάρχει στα περισσότερα λαχανικά.

Σε ότι αφορά τη σύσταση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και σε απαραίτητα αμινοξέα μικρός όγκος δεδομένων προτείνει πως η διατροφική αξία της πρωτεΐνης των μανιταριών είναι υψηλότερη από την πρωτεΐνη που υπάρχει στα περισσότερα λαχανικά.

Όσον αφορά τα μανιτάρια *Pleurotus* μετά από την ανάλυση βρέθηκε πως η περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνη ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, το υπόστρωμα, το μέγεθος του πύλου, την εποχή της συγκομιδής και συγκεκριμένα κυμαίνεται από 17-42 g/100g αποξηραμένου σώματος καρποφορίας. Κύρια αμινοξέα βρέθηκε ότι είναι το γλουταμινικό οξύ, το ασπαραγινικό οξύ και η αργινίνη και η λευκίνη ενώ ακολουθούν κατά σειρά η αλανίνη, η λευκίνη, η θρεονίνη και η βαλίνη (C.Pornariya et al,2009) και τα αποτελέσματα αναπαριστώνται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα

Συντελεστής μετατροπής: 6,25

AMINOΞΕΑ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ g/ g φ.β	AMINOΞΕΑ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ g/g φ.β.)
Ασπαραγινικό οξύ	2,04 ±0,020	Λυσίνη*	0,071 ±0,007
Θρεονίνη*	1,01 ±0,010	Ιστιδίνη	0,55 ±0,012
Σερίνη	1,09 ±0,009	Αργινίνη	3,26 ±0,015
Γλουταμινικό οξύ	5,01 ±0,015	Θρυπτοφάνη*	0,15 ±0,001
Γλυκίνη	0,83 ±0,019	Προλίνη	0,29 ±0,008
Αλανίνη	1.90 ± 0,015	Φαινυλαλανίνη*	0,73 ±0,006
Βαλίνη*	0,91 ±0,010	Μεθειονίνη*	0,28 ±0,006
Νορβαλίνη	0,03 ±0,001		
Τυροσίνη	0,57 ±0,008		
Λευκίνη	1,13±0,008		
Ισολευκίνη*	0,62 ±0,007		

2.4 ΛΙΠΟΕΙΔΗ

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά των μυκητιακών κυττάρων κατέχοντας τόσο αποθηκευτικό όσο και δομικό ρόλο, αφού αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα μπορεί να μεταβάλλεται στους ζώντες οργανισμούς, συμπεριλαμβανόμενων και των μυκήτων, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και γενικότερα τις συνθήκες ανάπτυξης, όπως είναι το οξυγόνο και η θερμοκρασία.

Στους μύκητες τα κύρια λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και στις αποταμιευτικές τριακυλογλυκερόλες είναι τα κορεσμένα παλμιτικό και στεατικό οξύ και τα ακόρεστα παλμιτελαϊκό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. (Pedneault et al. 2007)

Τα μανιτάρια έχουν χαμηλό λιπιδικό περιεχόμενο -συνήθως 1,1-8,3 % του ξηρού τους βάρους- στο οποίο περιλαμβάνονται όλες οι τάξεις των λιποειδών συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων λιπαρών οξέων, μονο- δι- και τρι- γλυκερολών, στερολών και των εστέρων τους καθώς και φωσφολιποειδών (Chang and Miles, 2004).

Το περιεχόμενο τους σε λιπαρά οξέα συνήθως κυμαίνεται μεταξύ των 20-30 g·kg⁻¹ ενώ σπάνια έχουν αναφερθεί ποσότητες άνω των 60 g·kg⁻¹. Αρκετά λιπαρά οξέα έχουν προσδιοριστεί στα λιπίδια των μανιταριών ενώ αυτά που εντοπίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό είναι το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ (C18:2n6c) και το μονοακόρετο ελαϊκό οξύ (C18:1n9c), που αποτελούν συνήθως τα 2/3 του συνόλου των λιπαρών οξέων. Το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (C16:0), βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες καλύπτοντας σημαντικό μέρος του υπόλοιπου 1/3. Οι ποσότητες του ελαϊδικού οξέος (*trans* ισομερές του ελαϊκού) που εντοπίζονται στα μανιτάρια είναι πολύ χαμηλές με αποτέλεσμα τα μανιτάρια να συνεισφέρουν στην κατά το δυνατόν χαμηλότερη πρόσληψη *trans* λιπαρών οξέων (Cheung, 2013)

Όσον αφορά τα μανιτάρια του γένους *pleurotus* ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην περιεκτικότητα τους σε ακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς, όπως πολλές

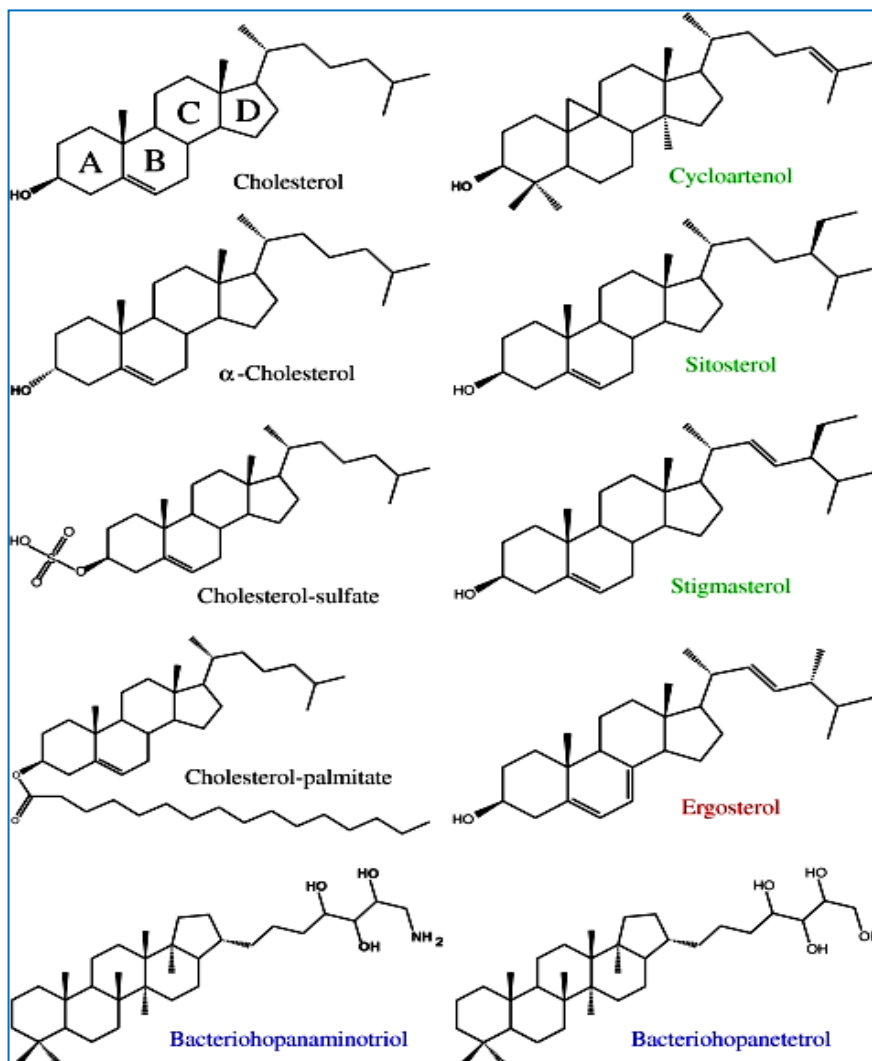
μελέτες προτείνουν, η ανάπτυξη τους σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 17° C οδηγεί σε αύξηση της περιεκτικότητας τους σε ακόρεστα λιπαρά οξέα.(Kalac,2009). Σε γενικές γραμμές ωστόσο τα μανιτάρια *Pleurotus* έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και περιέχουν κάποια από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα σε ποσότητες, ωστόσο, που δεν θεωρούνται ικανές να καλύψουν τις ανάγκες του ανθρώπου. Σε μελέτη των Deepalakshmi et al (2014) σε μανιτάρια *Pleurotus* βρέθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν μικρές ποσότητες αραχιδονικού οξέος και α-λινολενικού οξέος (Deepalakshmi et al ,2014)

2.5 ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι στερόλες, ρυθμίζουν τις κυτταρικές διεργασίες και παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη δόμηση των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι μόρια-κλειδιά για τη στήριξη, τη διατήρηση και ρύθμιση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών επηρεάζοντας έτσι άμεσα θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες .

Η κύρια στερόλη των ζώων είναι η χοληστερόλη, ενώ τα φυτά περιέχουν περισσότερο πολύπλοκες στερόλες όπως η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη.

Η κύρια στερόλη των μυκήτων είναι η εργοστερόλη (5,7,22-ergostatrien-3β-ol) η οποία διαφέρει δομικά από την χοληστερόλη στην ύπαρξη ενός διπλού δεσμού στο δακτύλιο B και στην ακυλοαλυσίδα καθώς και στην ύπαρξη μιας μεθυλομάδας στον άνθρακα 24 (Dufoure, 2008)



Η εργοστερόλη παίζει πρωταρχικό ρόλο στην δόμηση και σε διάφορες διαδικασίες ανάπτυξης των μυκήτων, όπως είναι η ωρίμανση, ο σχηματισμός των υφών, και η αναπαραγωγή, ενώ επιπλέον δρα και ως προβιταμίνη (Barreira, 2014; Senatore et al,1988). Εκτός από την εργοστερόλη στους μύκητες ανιχνεύονται και άλλες στερόλες όπως η φουνγκιστερόλη (fungisterol), η εργοστα-5,7-διενόλη (ergosta-5,7-dienol), η 24-μεθυλ-χοληστερόλη (24-methylcholesterol) και η μεθυλενο-χοληστερόλη (methylene cholesterol) ωστόσο η εργοστερόλη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, αποτελώντας ακόμα και το 89% του συνολικού στερολικού περιεχομέΗ εργοστερόλη παίζει πρωταρχικό ρόλο στην δόμηση και σε διάφορες διαδικασίες ανάπτυξης των μυκήτων, όπως είναι η ωρίμανση, ο σχηματισμός των υφών, και η αναπαραγωγή, ενώ επιπλέον δρα και ως προβιταμίνη (Barreira, 2014; Senatore et al,1988). Εκτός από την εργοστερόλη στους

μύκητες ανιχνεύονται και άλλες στερόλες όπως η φουνγκιστερόλη (fungisterol), η εργοστα-5,7-διενόλη (ergosta-5,7-dienol), η 24-μεθυλ-χοληστερόλη (24-methylcholesterol) και η μεθυλενο-χοληστερόλη (methylene cholesterol) ωστόσο η εργοστερόλη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, αποτελώντας ακόμα και το 89% του συνολικού στερολικού περιεχομένου.

Όσον αφορά ταμανιτάρια *Pleurotus* έχει βρεθεί ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην περιεκτικότητα της εργοστερόλης στα σώματα καρποφορίας ανάλογα με το στέλεχος, το είδος και εξωγενείς παράγοντες (φωτισμός, υπόστρωμα). Επιπλέον η περιεκτικότητα σε εργοστερόλη διαφέρει ανάλογα με το τμήμα τουμανιταριού που μελετάται. Συγκεκριμένα στα νεότερα σε ηλικία μέρη, όπως είναι τα βράγχια βρέθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες εργοστερόλης και συγκεκριμένα φάνηκε πως διαθέτουν σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα από τον πύλο, το οποίο με τη σειρά του περιέχει σχεδόν διπλάσια εργοστερόλη σε σχέση με το μίσχο. (Jasinghe et al. 2005) Σε σχετική μελέτη σεμανιτάρια Shiitake των Jasinghe et al. (2005) προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

ΜΕΡΟΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ	ΜΕΣΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗΣ mg/g DM
Βράγχια	10,6+- 0,99
Καπέλο	5,34+-0,64
Μίσχος	0,97+-0,56

2.6 ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D

2.6.1 ΒΙΤΑΜΙΝΗ D

Η βιταμίνη D γνωστή και ως «η βιταμίνη του ήλιου» ανακαλύφθηκε πρώτη φορά από τον Edward Mellanby κατά τη διάρκεια των πειραμάτων του για τη ραχίτιδα, κατέχει πρωταρχικό ρόλο τόσο στο σχηματισμό και ανάπτυξη των οστών όσο και στο μεταβολισμό του ασβεστίου και η επαρκής πρόσληψή της είναι απαραίτητη για αποφυγή της ραχίτιδας στα παιδιά και της οστεομαλακίας στους ενήλικες (Jasinghe , 2005)

Ο όρος βιταμίνη D δεν αντιπροσωπεύει μία μόνο βιταμίνη αλλά στην πραγματικότητα αποτελεί την γενική ονομασία μιας ομάδας βιταμινών που εμφανίζουν παρόμοια δράση με αυτή της χοληκαλσιφερόλης (βιταμίνη D₃). Πρόκειται για μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που παρέχεται από λίγα τρόφιμα κυρίως ζωικής προέλευσης (συκώτι, βοδινό, αυγά, γάλα, τυρί, βούτυρο, και λιπαρά ψάρια όπως ρέγκα, σολομός, σαρδέλες) ενώ παράλληλα μπορεί να παραχθεί ενδογενώς με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας του ήλιου στην 7-δεϋδροχοληστερόλη που υπάρχει στην επιφάνεια του δέρματος

2.6.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ανεξάρτητα από τη προέλευσή της (ήλιος, διατροφή, συμπληρώματα) η βιταμίνη D είναι βιολογικά αδρανής και πρέπει να υποστεί δυο υδροξυλίωσεις στο σώμα για να μετατραπεί στη βιολογικά ενεργή της μορφή. Η πρώτη υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ όπου η ανενεργή βιταμίνη D μετατρέπεται στην 25-OH-D ή καλσιδιόλη. Η δεύτερη υδροξυλίωση γίνεται στους νεφρούς όπου και παράγεται η [1,25(OH)₂D] ή αλλιώς 1,25 διυδροξυβιταμίνη D, που αποτελεί την ενεργή μορφή της βιταμίνης D, γνωστή και ως καλσιτριόλη. Η καλσιτριόλη προάγει την απορρόφηση του ασβεστίου στο έντερο, και τη διατήρηση επαρκών συγκεντρώσεων ασβεστίου και φωσφόρου για τη φυσιολογική οστική εναπόθεση. Σήμερα υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως ο ρόλος της Βιταμίνης D στη λειτουργία του σώματος δεν περιορίζεται μόνο στην υγεία των οστών αλλά σχετίζεται και με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, τη κυτταρική ανάπτυξη, τη μείωση της φλεγμονής.(NIH, National Institutes of Health)

2.6.3 ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει κύρια στερόλη των μανιταριών είναι η εργοστερόλη. Η εργοστερόλη ενεργοποιείται με την επίδραση της ακτινοβολίας, και μέσω του σχηματισμού ασταθών ενδιάμεσων (ταχυστερόλη, λουμιστερόλη) και προβιταμίνης D₂ μετατρέπεται σε εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) . Οι παραπάνω αντιδράσεις γίνονται με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που γίνεται στην επιφάνεια του δέρματος κατά την μετατροπή της 7-δεϋδροχοληστερόλης στη βιταμίνη D₃ μέσω της ασταθούς προβιταμίνης D₃.

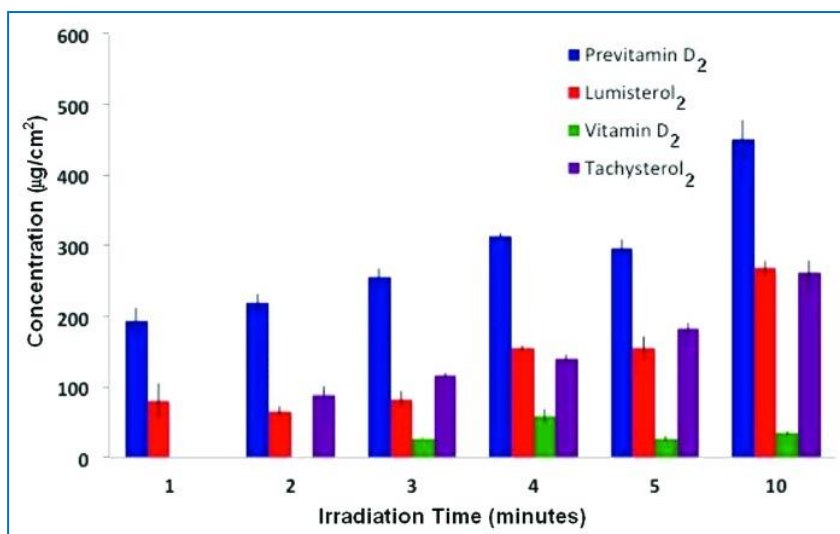
Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μετατροπή της βιταμίνης D₂ στη βιολογικά ενεργή της μορφή είναι αντίστοιχη αυτής για την μετατροπή της βιταμίνης D₃. Έτσι, αφού φθάσει στον οργανισμό, με δύο διαδοχικές υδροξυλιώσεις μετατρέπεται αρχικά στο ενδιάμεσο 25-υδροξύ-βιταμίνη D₂ και στη συνέχεια στη βιολογικά ενεργή 1,25-διυδροξύβιταμίνη D₂.

Στα μανιτάρια φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση στο περιεχόμενο της βιταμίνης D από είδος σε είδος αλλά και σε διαφορετικά δείγματα του ίδιου είδους που μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική έκθεση στο φως του ήλιου κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης, καθώς και σε άλλους παράγοντες που πιθανά να επιδρούν κατά την ανάπτυξη, τη συλλογή, την αποθήκευση ή ακόμα και σε διαφορές στην ενζυμική δραστηριότητα. (Phillips, 2011)

2.6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΕ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Οι σοβαρές επιπτώσεις της ανεπάρκειας σε βιταμίνη D σε συνδυασμό με τον περιορισμένο αριθμό τροφίμων που μπορούν να αποτελέσουν πηγή αυτής της βιταμίνης οδήγησε γρήγορα στην ανάγκη εμπλουτισμού πολλών τροφίμων με βιταμίνη D₂ ή D₃ και θεωρείται πως αποτελεί έναν ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο αύξησης των επιπέδων 25(OH)D σε παιδιά και ενήλικες (Keegan et al., 2013)

Η επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στην εργοστερόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή βιταμίνης D₂ με σκοπό την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, την χρήση της βιταμίνης D σε φάρμακα καθώς και τον εμπλουτισμό τροφίμων. Πρόσφατα η παραπάνω τεχνολογία χρησιμοποιήθηκε και από τους παραγωγούς μανιταριών οι οποίοι εκμεταλλεύτηκαν την υψηλή περιεκτικότητα των μανιταριών σε εργοστερόλη καθώς και τη δυνατότητα που παρέχεται για παραγωγή βιταμίνης D έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Όλα τα μανιτάρια με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας παράγουν σημαντικές ποσότητες βιταμίνης D και μάλιστα ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει πολύ λίγο (Phillips, 2011)



Όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα της βιτ D από μανιτάρια-UV και την ικανότητα αύξησης των επιπέδων 25(OH)D στους ανθρώπους τα δεδομένα είναι λίγα και αντικρουόμενα. Στη μελέτη των Urbain et al (2011) φάνηκε πως η βιταμίνη D2 από μανιτάρια-UV αυξάνει τα επίπεδα 25(OH)D σε βαθμό αντίστοιχο αυτού που προκαλούσε διατροφικό συμπλήρωμα, ενώ σε αυτήν των Stephenson et al παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της 25(OH)D2 αλλά ταυτόχρονα σημειώθηκε και μία μείωση στα επίπεδα της 25(OH)D3. Το τελευταίο στοιχείο ενίσχυσε την υπάρχουσα διαμάχη σχετικά με την αποτελεσματικότητα των συμπληρωμάτων D2 σε σχέση με αυτά της D3 στην αύξηση των επιπέδων 25(OH)D. Τέλος σύμφωνα με τους Keegan et al , η πρόσληψη βιταμίνης D2 από μανιτάρια UV είναι ικανή να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της 25(OH)D με τρόπο ανάλογο των συμπληρωμάτων είτε βιταμίνης D3 είτε βιταμίνης D2.

2.7 BITAMINEΣ KAI METALLA

Τα μανιτάρια αποτελούν καλή πηγή πολλών βιταμινών και ιδιαίτερα ριβοφλαβίνης (B2), νιασίνης (B3) και φυλλικού οξέος (Mattila et al, 2001). Ωστόσο η περιεκτικότητα των μανιταριών σε βιταμίνες διαφέρει από είδος σε είδος.

Το περιεχόμενο των μανιταριών σε ριβοφλαβίνη βρέθηκε υψηλότερο σε σχέση με αυτό των λαχανικών και μάλιστα στο *Agaricus bisporus* το περιεχόμενο ήταν συγκρίσιμο με αυτό των αυγών και του τυριού.

ΤΡΟΦΙΜΟ 100 g	Τυρί cheddar	Αυγό ολόκληρο	White mushroom,ωμό
ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ mg	0.434	0.457	0,402

Αντίθετα ταμανιτάρια *L.edodes* και *P.ostreatus* δεν είναι τόσο πλούσια σε στη βιταμίνη αυτή. Σχετικά με τη νιασίνη, συγκριτικά με ταμανιτάρια *L.edodes* και *A.bisporus* , πιο πλούσιο φάνηκε να είναι το *P.ostreatus* ενώ και τα τρία είδημανιταριών διαθέτουν υψηλό περιεχόμενο σε φυλλικό, σε επίπεδα αντίστοιχα με αυτά των λαχανικών.

Ωστόσο σταμανιτάρια δεν έχουν βρεθεί μόνο οι παραπάνω βιταμίνες. Τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία σχετικά με την περιεκτικότητα τωνμανιταριών σε βιταμίνη C δεν είναι ξεκάθαρα, και μάλιστα πολλές φορές είναι αντικρουόμενα. Η διακύμανση της περιεκτικότητας τωνμανιταριών σε βιταμίνη C είναι πολύ μεγάλη ενώ σε κάποιαμανιτάρια, όπως είναι για παράδειγμα τα *P.ostreatus*, σε άλλες μελέτες φαίνεται πως δεν περιέχουν καθόλου βιταμίνη C ενώ σε άλλες φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα πλούσια (36.4-144 mg/100 g ξ.β.)

Τα επίπεδα θειαμίνης σταμανιτάρια είναι χαμηλά αν και οι τιμές που προκύπτουν είναι παραπλήσιες με αυτές των λαχανικών.(Pavel Kalac,2013)

Όσον αφορά τη βιταμίνη E η κύρια τοκοφερόλη τωνμανιταριών είναι η γ-τοκοφερόλη, σε συγκεντρώσεις μεταξύ των 0,5-3 mg/kg ξ.β., χαμηλότερο από αυτό των λαχανικών, αν και υπάρχουν και ορισμένες εξαιρέσεις. Τέλος το περιεχόμενο τωνμανιταριών σε β-καροτένιο και σε προβιταμίνη A, είναι πολύ χαμηλό σε σχέση με αυτό των λαχανικών.

Ταμανιτάρια, συγκριτικά με τα λαχανικά, αποτελούν καλή πηγή πολλών μετάλλων, αν και η βιοδιαθεσιμότητα στους είναι υπό αμφισβήτηση. Κύρια μέταλλα είναι το κάλιο και ο φώσφορος και μάλιστα οι ποσότητες που εντοπίζονται είναι μεγαλύτερες ή τουλάχιστον συγκρίσιμες με αυτές των λαχανικών . Αντίθετα το νάτριο και το ασβέστιο βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες αν και υπάρχουν και εξαιρέσεις. Το σύνθηες περιεχόμενο σε μέταλλα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

:

ΜΕΤΑΛΛΟ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ g/Kg ΞΒ
---------	---------------------

Κάλιο	20-40
Φώσφορος	5-10
Χλώριο	1-6
Θείο	1-6
Μαγνήσιο	0,8-1,8
Ασβέστιο	0,1-0,5
Νάτριο	0,1-0,4

Παράλληλα υπάρχει έντονο ενδιαφέρον γύρω από την περιεκτικότητα των μανιταριών σε ιχνοστοιχεία. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται είναι μεγάλες τόσο από είδος σε είδος, καθώς υπάρχουν είδη που διαθέτουν την ικανότητα συσσώρευσης ιχνοστοιχείων, όσο και μέσα στο ίδιο είδος ανάλογα με την περιοχή ανάπτυξης. (Mattila, 2001; Kalař 2013)

Κύριο ιχνοστοιχείο είναι ο ψευδάργυρος και τα επίπεδα ήταν ιδιαίτερα υψηλά στο *P.ostreatus*. Όσον αφορά το σίδηρο η περιεκτικότητα στα μανιτάρια, όπως και στα λαχανικά, είναι χαμηλή και η βιοδιαθεσιμότητά του αμφισβητείται, ενώ παράλληλα υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές. Για παράδειγμα οι τιμές που αναφέρονται για το *A.bisporus* κυμαίνονται μεταξύ των 2-1280 mg/kg ξ.β.

Τα μανιτάρια φαίνεται να αποτελούν καλή πηγή χαλκού, ενώ το περιεχόμενό τους σε μαγνήσιο είναι χαμηλό. Πολύ σημαντικά είναι τα δεδομένα που αφορούν την περιεκτικότητα των μανιταριών σε ιχνοστοιχεία που εμφανίζουν τοξικότητα και είναι επιβλαβή για την υγεία (κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος), αφού όπως έχουμε ήδη αναφέρει ορισμένα μανιτάρια δρουν ως συσσωρευτές. Όταν τα μανιτάρια αναπτύσσονται σε υποστρώματα στα οποία είναι παρόντα αυτά τα στοιχεία οι πιθανότητες συσσώρευσης αυξάνονται. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *L.edodes* το οποίο είναι ένας ισχυρός συσσωρευτής για το κάδμιο και μάλιστα από αναλύσεις σε δείγματα του *L.edodes* προέκυψε πως η περιεκτικότητά του έφθανε τα ανώτατα όρια που έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για τα επίπεδα καμίου στα λαχανικά (0,1 mg/kg). Ο υδράργυρος ανήκει επίσης στα στοιχεία που βιοσυσσωρεύονται σημαντικά από πολλά είδη μανιταριών. Γενικά

θα λέγαμε πως τα άγρια μανιτάρια από περιοχές που δεν έχουν μολυνθεί θεωρούνται ασφαλή για την υγεία, ενώ λιγότερο επικίνδυνα θεωρούνται τα καλλιεργούμενα μανιτάρια.

2.8 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια αποτελούσαν αναπόσπαστο κομμάτι της παραδοσιακής ιατρικής καθώς πολλά χρησιμοποιούνταν για την προαγωγή της υγείας και για τη πρόληψη και θεραπεία ασθενειών όπως του καρκίνου, διάφορων ιογενών ασθενειών, της φλεγμονής, της υπέρτασης, της υπερχοληστερολαιμίας και της αθηρωμάτωσης (Chatterjee1 et al ,2011). Τα φαρμακευτικά μανιτάρια δεν χρησιμοποιούνται για μαγειρικούς σκοπούς και περιέχουν βιοενεργά συστατικά (δευτερογενείς μεταβολίτες, πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες) που έχουν φαρμακευτικές δράσεις. Όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου σύμφωνα με τους de Roman et al (2006) τόσο τα εδώδιμα όσο και τα φαρμακευτικά μανιτάρια εμφανίζουν ευεργετικές δράσεις. Χαρακτηριστικό των φαρμακευτικών μανιταριών είναι πως περιέχουν περισσότερα συστατικά και δευτερογενείς μεταβολίτες στο μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα με αποτέλεσμα να διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών δράσεων σε σχέση με τα εδώδιμα. Το κυτταρικό τους τοίχωμα ,όπως έχουμε ήδη αναφέρει, περιέχει κυρίως β-γλυκάνες, χιτίνη και μαννοπρωτεΐνες οι οποίες δεν πέπτονται στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. (Cheung, 2010) Υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις ως προς το περιεχόμενο των κυτταρικών μεμβρανών σε πολυμερή που εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης. Πέρα από τους πολυσακχαρίτες και τις πρωτεΐνες, το κυτταρικό τοίχωμα των φαρμακευτικών μανιταριών περιέχει επίσης ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (λιγνίνες) όσο και μικρού (τριτερπένια ,φαινόλες)

Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος(πχ λεντινάνη) in vivo και in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές βιοδραστικές δράσεις , οι οποίες κυρίως αφορούν την ενίσχυση του ανοσοποιητικού, χημειοπροστατευτικές δράσεις, βελτίωση της διαχείρισης της γλυκόζης και αντιοξειδωτική δράση. Οι μηχανισμοί ωστόσο δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Σχετικά με την αντικαρκινική δράση έχουν διατυπωθεί διάφορες προτάσεις όπως η διέγερση μη ειδικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού, άσκηση ανοσορρυθμιστικής δράσης και καταστολή αγγειογένεσης. Παράλληλα άλλοι πολυσακχαρίτες έχει φανεί πως μειώνουν τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης σε

ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Τέλος στους πολυσακχαρίτες αποδίδεται και αντιοξειδωτική δράση αφού είναι σε θέση να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες

Σχετικά με τις ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους, τα τριτερπένια αποτελούν τα πιο σημαντικά βιοενεργά συστατικά των φαρμακευτικών μανιταριών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *Ganoderma lucidum* στο οποίο βρίσκονται περισσότερα από 120 διαφορετικά τριτερπένια. Κάποια από αυτά εμφανίζουν αντιυικές ιδιότητες, άλλα μειώνουν την ενδογενή σύνθεση της χοληστερόλης ενώ άλλα αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο της αθηρογένεσης.

Σχετικά με τις ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, διάφορες πρωτεΐνες των μανιταριών (πχ λεκτίνες) λειτουργούν ως ανοσορυθμιστές. Αναφέρονται επίσης αντικαρκινικές και αντυικές ιδιότητες καθώς και ενίσχυση της έκκρισης ινσουλίνης κάτι που επηρεάζει θετικά τη διαχείριση της γλυκόζης. Δεδομένου του ότι πολλά είδη μανιταριών δεν έχουν ακόμα μελετηθεί συμπεραίνουμε πως τα μανιτάρια αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο τομέα για τη βελτίωση της υγείας στο μέλλον.

2.9 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Η οξείδωση είναι μια διαδικασία απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι φυσιολογικό επακόλουθο του κυτταρικού μεταβολισμού. Ωστόσο η ανεξέλεγκτη παραγωγή φαίνεται να σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η χρόνια φλεγμονή, ο καρκίνος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι καρδιαγγειακές, αναπνευστικές και νευρολογικές παθήσεις.(Salazar-Medina et al ,2013). Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον γύρω από την μελέτη των μανιταριών ως πηγής αντιοξειδωτικών. Μελέτες σε εδώδιμα μανιτάρια (*Dictyophora indusiata*, *Flammulina velutipes*, *G. frondosa*, *H. erinaceus*, *L. edodes*, *Tricholoma giganteum* και *P. ostreatus*,) έδειξαν πως τα εκχυλίσματά τους είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν ισχυρές in vitro αντιοξειδωτικές δράσεις στις οποίες περιλαμβάνονται η μείωση της λιπιδαιμικής υπεροξείδωσης , μείωση των ελεύθερων ριζών και ενίσχυση της αναγωγικής δύναμης (Cheung, 2010). Οι φαινολικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί ποικίλουν από απλά μόρια (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή) μέχρι περισσότερο σύνθετα (λιγνίνες, ταννίνες, μελανίνες) και συγκεκριμένα θεωρείται πως τα φαινολικά οξέα αποτελούν την κύρια ομάδα φαινολικών αντιοξειδωτικών των μανιταριών. Τα φαινολικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε

2 μεγάλες ομάδες : τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκινναμικά. Στα μανιτάρια ανιχνεύονται κυρίως το *p*-OH-βενζοϊκό, το πρωτοκατεχικό, το γαλλικό, το βανιλικό, το συριγγικό και το γεντιστικό από την πρώτη ομάδα ενώ από τη δεύτερη ανευρίσκονται κυρίως το *p*-κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό.(Pavel Kalač,2013) Υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις σχετικά με το περιεχόμενο των άγριων μανιταριών σε φαινολικά οξέα οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ των 4-80 mg/kg ξηρού βάρους και φαίνεται πως το *p*-υδροξυβενζοϊκό αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο φαινολικό οξύ. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο συνήθως εκφράζεται ως ισοδύναμα του γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE). Για τα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*, και *Pleurotus cornucopiae* έχουν αναφερθεί τιμές της τάξεως των 2,74 και 3,32 mg/kg ξηρού βάρους αντίστοιχα . Πέρα από τα φαινολικά οξέα και άλλες ενώσεις των μανιταριών εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση όπως οι τοκοφερόλες, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή.(Pushpa et al ,2012)

Σχετικά με την αντιοξειδωτική αξία των μανιταριών θα λέγαμε πως είναι αντίστοιχη με αυτήν των λαχανικών αν και είναι πιθανό ο βρασμός να επιδρά αρνητικά στην αντιοξειδωτική τους αξία. (Kalac 2013)

Όσον αφορά τα μανιτάρια *Pleurotus*, δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ανάμεσα στα *P. Florida*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus*, την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση την έχει το *Pleurotus florida* ενώ ανάμεσα στα *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* και *P. sapidus* την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση την έχει το *P.sajor-caju*.(Khatuna et al,2014; Jeena et al, 2014)

Συμπερασματικά θα λέγαμε πως τα εδώδιμα μανιτάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας στη διαίτα του ανθρώπου ενώ τα μη εδώδιμα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο στην παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ

Α' ΜΕΡΟΣ

Α.3.1 ΞΗΡΑΝΣΗ

Η διαδικασία της ξήρανσης περιλαμβάνει την απομάκρυνση της υγρασίας από ένα υλικό, συνήθως με θέρμανση. Τα προβλήματα που είναι πιθανό να προκύψουν κατά τη διαδικασία αυτή είναι:

- Η καταστροφή ορισμένων ουσιών κατά την ξήρανση.
- Η αλλοίωση ορισμένων ουσιών λόγω της μειωμένης ανθεκτικότητάς τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα τρόφιμα στα οποία είναι πιθανό να προκληθούν αλλαγές στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά καθιστώντας τα μη αποδεκτά.
- Η μη ολική απομάκρυνση του νερού. Κατά την ξήρανση απομακρύνεται το 90-95% του νερού και η ποσότητα που απομένει είναι ικανή να διατηρήσει μια μικρή μεν αλλά υπαρκτή ενζυμική και μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία θα οδηγήσει στη σταδιακή αλλοίωση του προϊόντος.

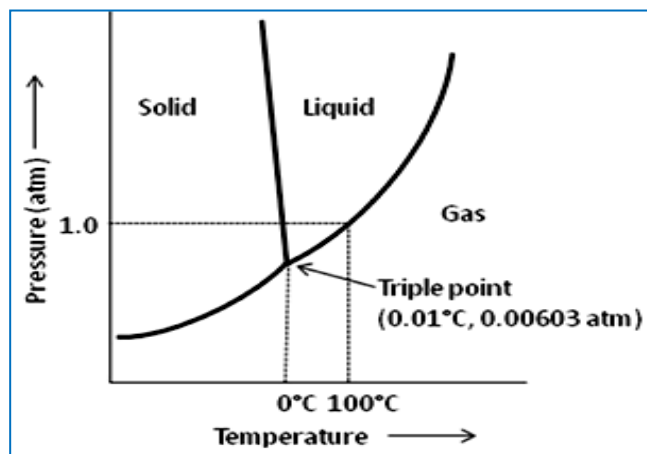
Για την αποφυγή των παραπάνω προβλημάτων σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιείται μια εναλλακτική μέθοδος ξήρανσης η οποία περιλαμβάνει την ψύξη του προς ξήρανση υλικού και στη συνέχεια την απομάκρυνση του πάγου που θα δημιουργηθεί με εξάχνωση. Η διεργασία αυτή ονομάζεται λυοφιλίωση και βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς κλάδους, όπως για παράδειγμα στη συντήρηση των τροφίμων και την παρασκευή φαρμάκων και φαρμακευτικών ειδών (εμβόλια κ)

Α.3.2 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ (*freeze drying*)

Η λυοφιλίωση είναι μια μέθοδος ξήρανσης κατά την οποία το υπό ξήρανση δείγμα παγώνει και το νερό (σε μορφή πια πάγου) απομακρύνεται, αρχικά με εξάχνωση και στη συνέχεια με εκρόφηση (Nireesha et al, 2013). Η διαδικασία της λυοφιλίωσης αποτελείται από 3 στάδια: την ψύξη, την αρχική ξήρανση και τη δευτερογενή ξήρανση.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ψύξης όλο το ελεύθερο νερό του δείγματος βρίσκεται σε μορφή πάγου. Η διαδικασία της ψύξης θεωρείται το πιο κρίσιμο στάδιο κατά τη λυοφιλίωση αφού τόσο η εξάχνωση όσο και τα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων εξαρτώνται από την κρυσταλλική δομή που θα δημιουργηθεί. (<http://freezedrying.com>, 2015 American Lyophilizer, INC.).

Στόχος της αρχικής ξήρανσης είναι η απομάκρυνση του ελεύθερου νερού που υπάρχει στο δείγμα. Η κύρια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο στάδιο αυτό, είναι η εξάχνωση όπου το νερό περνά απευθείας από την στερεή φάση (πάγος) στην αέρια (ατμός) χωρίς να μεσολαβήσει η υγρή φάση. Η εξάχνωση του νερού λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες και πιέσεις χαμηλότερες του τριπλού σημείου(4.579 mmHg, 0.0099 °C) , του σημείου εκείνου δηλαδή που συνυπάρχουν και οι τρεις καταστάσεις, η στερεή, η υγρή και η αέρια.



Στα πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης στα τρόφιμα περιλαμβάνονται η δυνατότητα αφυδάτωσης χωρίς τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών, η αύξηση της διάρκειας ζωής -εφόσον τα αφυδατωμένα προϊόντα αποθηκεύονται σε σφραγισμένη συσκευασία προστατευμένα από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο- η καλύτερη συντήρηση των χαρακτηριστικών της δομής και της εμφάνισης αφού η συρρίκνωση που λαμβάνει χώρα είναι αμελητέα και τέλος η διατήρηση των πτητικών αρωματικών και θρεπτικών τους συστατικών.(de Torres et al, 2010) Επιπλέον η απομάκρυνση του πάγου με εξάχνωση δημιουργεί μόνο μικρούς πόρους στο προϊόν με αποτέλεσμα η επανυδάτωση να γίνεται σε μικρό χρόνο.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου αναφέρονται το υψηλό κόστος και η αύξηση των απαιτούμενων χειρισμών. Επιπλέον σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως οι χρόνοι που απαιτούνται για την ξήρανση με λυοφιλίωση είναι σημαντικά μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους χρόνους άλλων τεχνικών. Τέλος λόγω του χαμηλού περιεχομένου σε υγρασία που περιέχουν τα

λυοφιλιωμένα τρόφιμα υπάρχει αυξημένος κίνδυνος οξειδωτικής τάγγισης και επακόλουθα σε ορισμένα προϊόντα είναι πιθανό να απαιτείται η προσθήκη αντιοξειδωτικών.

A.3.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΙΛΥΛΙΩΣΗΣ

A.3.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η σιλυλίωση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την αναλυτική χημεία. Ο όρος σιλυλίωση αναφέρεται στην αντικατάσταση ενός υδρογόνου μιας ένωσης με μια ομάδα αλκυλοσιλίου.

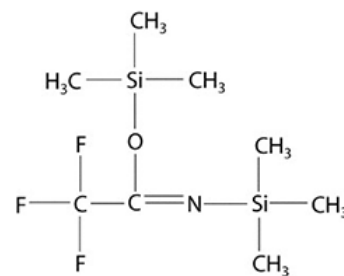
Στην αναλυτική χημεία, η αντίδραση της σιλυλίωσης χρησιμοποιείται από τα τέλη της δεκαετίας του '50 τόσο στην αέρια χρωματογραφία όσο και στη φασματομετρία μάζας. Η σιλυλίωση μιας πολικής ένωσης οδηγεί σε μείωση του πολικού χαρακτήρα και σε αύξηση της πτητικότητας και της θερμικής σταθερότητας. Καθίσταται έτσι δυνατή η ανάλυση πολλών μη πτητικών και ασταθών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας. (fluka chemika,1995)

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ομάδα σιλυλίωσης είναι η ομάδα του τριμεθυλοσιλίου (TMS, Trimethylsilyl-) καθώς και ένα σύνολο τριμεθυλσιλ-παραγόντων με διαφορετικές ιδιότητες. Ωστόσο χρησιμοποιούνται και άλλες σιλυλ-ομάδες αφού η χρήση τους συχνά επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό στην αέρια χρωματογραφία .

.3.3.2 ΣΙΛΥΛΙΩΣΗ ΜΕ ΔΙ(ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΣΙΛΥΛΟ)- ΤΡΙΦΘΟΡΟΑΚΕΤΑΜΙΔΙΟ (BSTFA)

Το BSTFA χρησιμοποιείται για την τριμεθυλοσιλυλίωση αλκοολών, αμινών, καρβοξυλικών οξέων, στεροειδών και στερολών.(Sigma Aldrich,BSTFA, silylation overview, fluka chemica) Έχει την ικανότητα να αντιδρά γρήγορα με μια σειρά πολικών ενώσεων αντικαθιστώντας τα υδρογόνα των ενώσεων αυτών με τριμεθυλσιλυλομάδες(-Si(CH₃)₃). Στα πλεονεκτήματα του BSTFA και των παραγώγων του (τριμεθυλοσιλυλοτριφθοροακεταμίδιο, τριφθοροακεταμίδιο)

περιλαμβάνονται η μεγάλη πτητικότητα (συγκριτικά με άλλους παράγοντες σιλυλίωσης) και η μεγάλη διαλυτότητα στους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους διαλύτες σιλυλίωσης. Επιπλέον



σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας σιλυλίωνσης χωρίς την ανάγκη χρήσης επιπλέον διαλύτη.

Επειδή τα αντιδραστήρια σιλυλίωνσης αντιδρούν με το νερό πρέπει να λαμβάνεται ειδική φροντίδα, ώστε ο διαλύτης και τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν να είναι τελείως απαλλαγμένα από υγρασία. Για την αποφυγή παρεμποδίσεων και παραπροϊόντων από την παρουσία υγρασίας και διαλυτών, η παραγωγοποίηση του γίνεται στο στερεό υπόλειμμα που προκύπτει μετά την πλήρη απομάκρυνση όλων των διαλυτών κάτω από αδρανές ρεύμα αζώτου ή με χρήση SpeedVac.

A.3.4.ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ(GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία σχετικά απλή τεχνική διαχωρισμού και χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πτητικών ενώσεων. Η κινητή φάση είναι αέριο, επομένως και τα προς διαχωρισμό συστατικά πρέπει να βρίσκονται σε μορφή αερίου. Για τον προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων προηγείται η διαδικασία της παραγωγοποίησης προκειμένου οι μη πτητικές ενώσεις να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Χαρακτηριστικά, κάποια από τα λιποειδή όπως είναι τα λιπαρά οξέα είναι ήδη πτητικά και μπορούν να διαχωριστούν άμεσα, ενώ άλλα πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Για παράδειγμα για το διαχωρισμό των στερολών απαιτείται πρώτα η μετατροπή τους σε πτητικούς τριμεθυλσιλλαιθέρες με τη διαδικασία της σιλυλίωνσης.

A.3.6 ΕΙΔΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

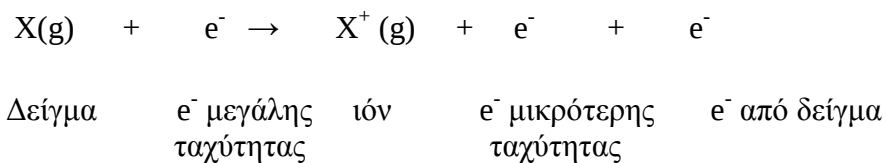
Υπάρχουν πολλά είδη ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία. Παρακάτω αναφέρονται οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας και οι ανιχνευτές φασματογραφίας μάζας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας: Πρόκειται για το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είδος ανιχνευτή στην αέρια χρωματογραφία και είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων. Οι οργανικές ενώσεις που εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή αερίου καίγονται, αφού πρώτα αναμιχθούν με υδρογόνο και αέρα. Οι ελεύθερες ρίζες $\text{CH}^\bullet$ που παράγονται κατά την καύση οξειδώνονται και σχηματίζουν ιόντα CHO^+ τα οποία ιονίζουν τον αέρα στο χώρο του ανιχνευτή

και επιτρέπουν τη δίοδο ρεύματος μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε σήμα το οποίο και καταγράφεται από τον καταγραφέα. Ο αριθμός των ιόντων που παράγονται από κάθε άτομο άνθρακα παρόλο που είναι μικρός είναι σταθερός. Έτσι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα τόσο περισσότερα ιόντα παράγονται και τόσο πιο ισχυρό είναι το σήμα και επακόλουθα τόσο μεγαλύτερη κορυφή προκύπτει στο διάγραμμα του καταγραφέα. Οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας είναι πολύ ευαίσθητοι για τις οργανικές ενώσεις. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η καταστροφή του δείγματος.

Ανιχνευτής φασματογραφίας μάζας: Η ποσότητα του δείγματος που απαιτείται στη φασματοφωτομετρία μάζας είναι πολύ μικρή.

Τα συστατικά του δείγματος όπως εκλύονται από τη στήλη σε αέρια μορφή, βομβαρδίζονται από ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας στο θάλαμο ιονισμού ο οποίος θερμαίνεται στους 150-200°C ώστε να εξασφαλίζεται πως τα δείγματα παραμένουν σε αέρια μορφή. Κατά τη σύγκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας με τα συστατικά του δείγματος ένα ηλεκτρόνιο από ένα ενεργειακά υψηλό τροχιακό αποβάλλεται και η ένωση του δείγματος μετατρέπεται σε ένα ιόν με θετικό φορτίο.



Στη συνέχεια τα παραχθέντα ιόντα επιταχύνονται και ευθυγραμμίζονται σε μια λεπτή δέσμη με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων. Έπειτα διέρχονται μέσα από ένα μαγνητικό πεδίο, οπότε το κάθε ιόν ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το ηλεκτρικό του φορτίο (m/z) αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση και μόνο τα ιόντα συγκεκριμένου m/z κατευθύνονται προς τον ανιχνευτή ο οποίος μπορεί και μετρά το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται από ιόντα διαφορετικού λόγου m/z . Μεταβάλλοντας την ένταση του μαγνητικού πεδίου όλα τα παρόντα ιόντα ανιχνεύονται διαδοχικά.

B' ΜΕΡΟΣ

B.3.1 Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL)

Υπάρχουν αρκετοί τύποι λιποπρωτεϊνών οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χημική σύσταση, τις φυσικές ιδιότητες και τη μεταβολική λειτουργία. Ωστόσο όλες οι λιποπρωτεΐνες έχουν κοινό ρόλο ο οποίος συνίσταται στη μεταφορά των λιποειδών από ιστό σε ιστό με στόχο την κάλυψη των κυτταρικών αναγκών. Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν ως προς το λόγο λιποειδών προς πρωτεΐνη μέσα στο σωματίδιο καθώς και ως προς τις αναλογίες λιποειδών (τριακυλογλυκερολών, χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης, φωσφολιποειδών) που περιέχουν με αποτέλεσμα να προκύπτουν λιποπρωτεΐνες διαφορετικής πυκνότητας.

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) είναι οι κύριοι μεταφορείς της χοληστερόλης και δεσμεύουν περίπου το 60% της ολικής χοληστερόλης του ορού. Η λειτουργία τους είναι η μεταφορά της χοληστερόλης στους ιστούς, όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των μεμβρανών ή να μετατραπεί σε άλλους μεταβολίτες.

.

B.3.2 ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ LDL-C

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου. Η αθηροσκλήρυνση είναι μια εκφυλιστική νόσος του αγγειακού ενδοθηλίου και σήμερα είναι γνωστό πως τα υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξή της. (Esterbauer et al , 1987).

Η οξείδωση της LDL-c είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τόσο το πρωτεϊνικό όσο και το λιποειδικό τμήμα της λιποπρωτεΐνης υφίστανται οξειδωτικές αλλαγές. Στη συνέχεια η οξειδωμένη LDL-c δεσμεύεται και αποικοδομείται από τα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να διαπεράσουν το ενδοθήλιο και καθώς τα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται, σχηματίζεται η λιπώδης πλάκα και ο αυλός του αγγείου υφίσταται προοδευτική

απόφραξη. Συγκεκριμένα σε *in vitro* μελέτες φάνηκε πως η επώαση μακροφάγων με LDL-c που έχει υποστεί οξείδωση οδηγεί σε συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης.

Η LDL –c μπορεί να οξειδωθεί *in vitro* κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Τα ιόντα σιδήρου και χαλκού μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση της LDL μέσω οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιποειδών στο μόριο της LDL η οποία μεσολαβείται από ελεύθερες ρίζες.

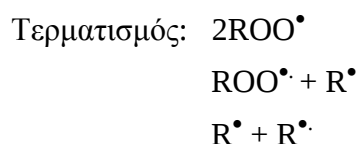
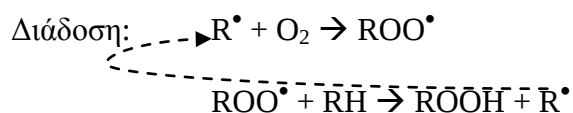
B.3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η αντιοξειδωτική δράση δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα αλλά μέσω της μελέτης της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να ελέγχουν την έκταση της οξείδωσης. (Antolovich et al,2001). Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί παρουσιάζουν ιδιαίτερη ποικιλομορφία αφού τα χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης οξείδωσης είναι ένα υπόστρωμα, ένα μέσο οξείδωσης, ενδιάμεσα προϊόντα και τελικά προϊόντα και η μέτρηση οποιουδήποτε από τα παραπάνω μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης. Ιόντα μετάλλων όπως χαλκού και σιδήρου αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέσα οξείδωσης στα τρόφιμα και στα βιολογικά συστήματα. Τα ιόντα αυτά καταλύουν την σύνθεση και την αποσύνθεση υδροϋπεροξειδίων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν προϊόντα αποικοδόμησης με υψηλή πτητικότητα. Παρόλο που από το 1933 ήταν γνωστή η ικανότητα των λιποειδών να εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση κατά τη φωτομέτρηση τους στα 230-235 nm λόγω ενός συζευγμένου διπλού δεσμού, μόλις το 1960 η παρακολούθηση της παραγωγής συζευγμένων διπλών δεσμών χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της οξείδωσης των λιποειδών. Το 1972 φάνηκε πως υπάρχουν σημαντικές ποσότητες συζευγμένων διενίων στο λιποειδικό εκχύλισμα του ορού του ανθρώπου και προτάθηκε πως τα συζυγή διένια που εντοπίζονται στο ορό υποδεικνύουν την *in vivo* οξείδωση. Επιπλέον το 95% των συζυγών διενίων που εντοπίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό φάνηκε πως προέρχονται από ένα και μόνο λιπαρό οξύ, το λινελαϊκό οξύ που όπως είναι γνωστό αποτελεί κύριο μέρος του λιποειδικού τμήματος της LDL-c. Σήμερα τα συζευγμένα διένια αξιοποιούνται ευρέως για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σε ένα δείγμα καθώς παρέχουν τη δυνατότητα της αναγνώρισης της οξειδωτικής δραστηριότητας στα αρχικά στάδια της οξείδωσης.

B.3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ LDL-c ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκτίμησης της ευαισθησίας της LDL χοληστερόλης στην οξείδωση *in vivo* βασίζεται στην επαγόμενη οξείδωση της LDL από ιοντα μετάλλων (συνήθως χαλκού και σιδήρου) (Ghaffar et al, 2010). Σήμερα ο προτεινόμενος μηχανισμός οξείδωσης της LDL από τον χαλκό περιλαμβάνει αρχικά την κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών από ελεύθερες ρίζες (lag phase). Η φάση αυτή στην ουσία αντικατοπτρίζει την αντίσταση-ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το δείγμα στην οξείδωση. Μετά την κατανάλωση όλων των ενδογενών αντιοξειδωτικών ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης από μια λιποειδική ελεύθερη ρίζα κατά την οποία τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL οξειδώνονται προς λιποειδικά υδροϋπεροξείδια (φάση διάδοσης, propagation phase)

Ο χαλκός είναι ένα στοιχείο μετάπτωσης το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως οξειδοαναγωγικός παράγοντας και να συμμετάσχει σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ικανών να προκαλέσουν οξείδωση συστατικών των κυττάρων. Έτσι, καταλύει το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η ρίζα αυτή στη συνέχεια μπορεί να προκαλέσει την αφαίρεση ενός H που είναι γειτονικό σε έναν διπλό δεσμό ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος (RH) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζας ($\text{R}\bullet$). Η ελεύθερη αυτή ρίζα μπορεί να αντιδράσει με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς σχηματισμό μιας υπερόξυ ρίζας ($\text{R-O-O}\bullet$) η οποία είναι πολύ δραστική και μπορεί με τη σειρά της να αντιδράσει με άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα και να οδηγήσει στον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (R-O-OH).



B.3.5 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΔΙΕΝΙΩΝ

Κατά το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων, από την αλλαγή της θέσης του διπλού δεσμού προκύπτουν συζευγμένα διένια, τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα αφού απορροφούν έντονα στα 234 nm. Παράλληλα επειδή τα υδροϋπεροξειδία που παράγονται είναι ιδιαίτερα ασταθείς ενώσεις, αποσυντίθενται γρήγορα σε δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης (υδροξυδιένια,οξοδιένια). Από αυτά μέσω αναγωγής και αφυδάτωσης μπορούν να προκύψουν συζευγμένα τριένια και τετραένια, τα οποία απορροφούν σε αντίστοιχα μήκη κύματος (Shahidi et al 2005).

Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης χρησιμοποιείται ευρέως για την παρακολούθηση της οξείδωσης. Παρόλο που η μέγιστη απορρόφηση των συζευγμένων διενίων εμφανίζεται στα 234 nm, συχνά επιλέγονται τα 245 nm παρόλο που η απορρόφηση των συζευγμένων διενίων σε αυτό το μήκος κύματος φτάνει το 70% της απορρόφησης στα 234 nm. Αυτό γίνεται λόγω της έντονης απορρόφησης της αλβουμίνης του BSA (bovine serum albumin) στα 234 nm, η οποία είναι σαφώς μικρότερη στα 245 nm φθάνοντας μόλις στο 15% της απορρόφησης στα 234nm (Schnitzer et al, 1995).

B.3.6 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΟΡΑΤΟΥ –ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

Η φασματοφωτομετρία βασίζεται στο φαινόμενο της απορρόφησης της ακτινοβολίας. Οι χημικές ομάδες που απορροφούν πάνω σε ένα μόριο λέγονται χρωμοφόρες και τα συζυγιακά συστήματα είναι από τις πιο συχνά απαντώμενες. Κάθε ένωση εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος λ_{max} το οποίο είναι χαρακτηριστικό της δομής της και συγκεκριμένα για τις χρωμοφόρες χημικές ομάδες που περιέχει στο μόριό της.

B.3.7 ELISA READER

Οι ενζυμικές ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (ELISA) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό, την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα μέσω της χρήσης

αντισωμάτων. Η δοκιμή γίνεται σε πλακίδιο συνήθως 96 βοθρίων, οι απορροφήσεις κάθε ενός των οποίων μετρώνται στη συνέχεια σε κατάλληλη συσκευή (ELISA reader).

Οι ELISA readers (microplate readers) μπορούν να μετρήσουν την απορρόφηση μιας ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος από τα προς προσδιορισμό συστατικά του δείγματος. Έτσι είναι δυνατή η μέτρηση της απορρόφησης σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα. (Kai et al, 2011)

Τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα μπορούν να μετρούν την απορρόφηση μόνο ενός δείγματος κάθε φορά. Έτσι η ανάγκη πραγματοποίησης πολλαπλών μετρήσεων σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα οδήγησε στην χρήση των μικροπλακών Elisa

Οι βασικές αρχές της μέτρησης της απορρόφησης είναι κοινές. Φως επιλεγμένου μήκους κύματος περνά μέσα από τα δείγματα (ουσία με τη μορφή διαλύματος) και στη συνέχεια το φως που εξέρχεται από τα δείγματα μετράται και μετατρέπεται από το plate reader σε απορρόφηση. Τα δείγματα στους ELISA plate readers τοποθετούνται σε 96 βοθρία που είναι διατεταγμένα σε μια μικροπλάκα 8×12 θέσεων. Η μικροπλάκα περνά πάνω από 8 πηγές ακτινοβολίας κάθε φορά κατά μία γραμμή μέχρι να «σαρωθούν» και οι 12 σειρές και το φως διαπερνά τα δείγματα κάθετα και όχι οριζόντια όπως συμβαίνει στα συμβατικά φασματοφωτόμετρα.

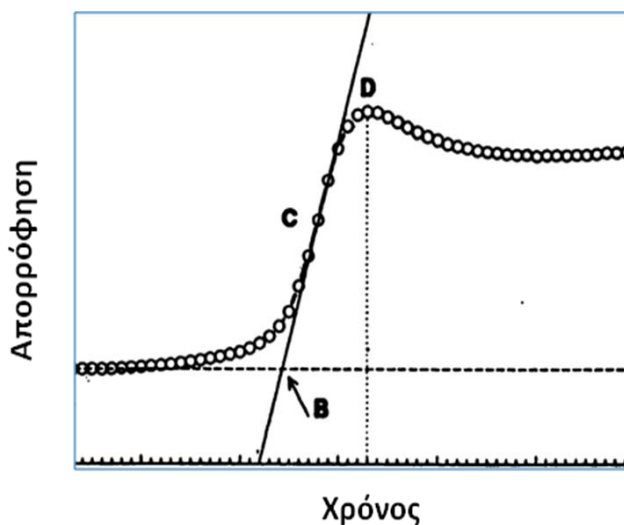
Τα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα είναι πέραν της δυνατότητας μέτρησης πολλών δειγμάτων σε μικρό χρόνο, ότι τα συμβατικά απαιτούν μεγαλύτερους όγκους δείγματος ώστε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται 400μL- 4mL ενώ στους ELISA plate readers μόλις 2-100 μL. Επί πλέον ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η δυνατότητα που παρέχεται από τους ELISA plate readers για επανάληψη της μέτρησης σε επιθυμητά χρονικά διαστήματα, γεγονός που τους καθιστά ασυναγώνιστους στην περίπτωση μελέτης της κινητικής αντιδράσεων, όπως στην περίπτωση της μελέτης της οξειδωσης της LDL-c που περιγράφεται στη συνέχεια.

B.3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ LDL ΟΡΟΥ- ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η οξείδωση της LDL είναι στην πραγματικότητα μια διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων κατά την οποία τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της LDL οξειδώνονται προς προϊόντα ικανά να απορροφούν και κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αθηρογένεσης.

Στην παρούσα παράγραφο περιγράφεται σε συντομία η διαδικασία η οποία επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση της οξείδωσης της LDL μέσω καταγραφής της αύξησης της απορρόφησης σε επιλεγμένο μήκος κύματος, που οφείλεται στα παραγόμενα συζυγή διένια. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διερεύνηση της δράσης των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών με τρόπο ποσοτικό και αναπαραγόμενο.

Το γεγονός πως ο σχηματισμός των συζυγών διενίων στο μόριο της LDL μπορεί να μετρηθεί άμεσα, χωρίς να απαιτείται η εκχύλιση-απομόνωση των λιποειδών, προσφέρει τη δυνατότητα της συνεχούς παρακολούθησης του σχηματισμού τους με την πάροδο του χρόνου. Ένα τυπικό παράδειγμα τέτοιου πειράματος περιλαμβάνει την προσθήκη σε μία κυψελίδα (i) πλάσματος ή ορού, (ii) ρυθμιστικού διαλύματος, (iii) ιόντων Cu (προοξειδωτική δράση), (iv) εκχυλίσματος του οποίου την αντιοξειδωτική δράση επιθυμούμε να μετρήσουμε και (v) τη μέτρηση της απορρόφησης στα 234 nm. Σε πειράματα αυτού του είδους απαιτείται πάντα η χρήση control, ενώ αν είναι επιθυμητή η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού ή πλάσματος εθελοντών από πειράματα παρέμβασης το (iv) παραλείπεται. Ακολουθούν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για διάστημα 3-5 ωρών και το τελικό διάγραμμα της απορρόφησης έχει την παρακάτω μορφή.



Η μεταβολή της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις. Κατά την πρώτη φάση (lag phase), τα διένια δεν αυξάνονται ή αυξάνονται με πολύ αργό ρυθμό. Στη φάση αυτή τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του πλάσματος ή του ορού προστατεύουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την οξείδωση. Όταν τα αντιοξειδωτικά «εξαντληθούν» ξεκινά η οξείδωση των λιποειδών και η φάση αυτή αποτελεί τη δεύτερη φάση, τη φάση της διάδοσης (propagation phase) κατά την οποία τα συζυγή διένια αυξάνονται πολύ γρήγορα μέχρι να φθάσουν σε μία μέγιστη τιμή η οποία και σηματοδοτείται από την αύξηση στην απορρόφηση στο επιλεγμένο μήκος κύματος. Η μετάβαση από τη lag phase στη φάση της διάδοσης δεν γίνεται ξαφνικά αλλά χαρακτηρίζεται από μία συνέχεια. Στην τρίτη και τελευταία φάση (decomposition phase) ο αριθμός των συζυγών διενίων μειώνεται σημαντικά. Η μείωση αυτή φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα όπου έπειτα από τη μέγιστη τιμή της απορρόφησης παρατηρείται μία σημαντική μείωση. Αυτό οφείλεται στην αστάθεια που χαρακτηρίζει τα συζυγή διένια τα οποία ταχέως αποσυντίθενται και εφόσον έχει σταματήσει η παραγωγή τους, ο συνολικός αριθμός τους μειώνεται. Για να διερευνηθεί περεταίρω η συμπεριφορά της απορρόφησης στα 234 nm, λήφθηκαν διαδοχικές μετρήσεις για χρονικό διάστημα πολλών ωρών. Παρατηρήθηκε πως έπειτα από τη μέγιστη απόρροφηση, στο τέλος της φάσης διάδοσης, ακολουθεί ένα διάστημα περίπου 2 ωρών κατά το οποίο η απορρόφηση μειώνεται. Μετά τις 2 ώρες, ωστόσο οι τιμές της απορρόφησης ξεκινούν να αυξάνονται αργά και σταδιακά. Η εξήγηση της αύξησης αυτής είναι ότι οι αντιδράσεις της αποσύνθεσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκες και οδηγούν σε προϊόντα τα οποία μπορούν να εμφανίσουν απορρόφηση στο εύρος των τιμών του μήκους κύματος που πραγματοποιούνται οι μετρήσεις

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

Δεκαέξι (16) στελέχη μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* εξετάστηκαν στα πλαίσια του παρόντος πειράματος. Από αυτά, 11 απομονώθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, 2 προέρχονταν από το εξωτερικό και 3 ήταν εισαγόμενα εμπορικά στελέχη, όπως φαίνεται στον Πίνακα που ακολουθεί. Από κάθε περιοχή δειγματοληψίας συλλέχθηκαν 3-4 διαφορετικά δείγματα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν στην τράπεζα μυκητιακών καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, από τα οποία έγιναν και οι καλλιέργειες που παρήγαγαν τα μανιτάρια της παρούσας εργασίας.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ/ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
LGM 22	Γαλλία
443	Τσεχία
Εμπορικό 1	
Εμπορικό 2	
Εμπορικό 3	
P69	Χελμός / Ιτιά
P57	Τρίπολη/καστανιά
P59	Ορεστιάδα/λεύκα
P15	Γραμμένη Οξιά (2)/οξιά
P104	Γαρδίκι/ έλατο
P149	Ηλιούπολη/λεύκα
P146	Σπάτα/λεύκα
P1123	Μεσσηνία
P182	Άλιμος/βραχυτίτων
P179	Βοιωτία/ έλατο
P112	Γραμμένη οξιά(1)/οξιά

Αμέσως μετά τη συλλογή τους τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και διατηρήθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα σε θρεπτικό υλικό αποτελούμενο από δεξτρόζη, εκχύλισμα πατάτας και άγαρ(PDA) σε χώρο σκοτεινό και σε θερμοκρασία δωματίου. Η καλλιέργεια των μανιταριών

έγινε σε σακούλες προπυλενίου ειδικές για τοποθέτηση σε αυτόκαυστο, οι οποίες πληρώθηκαν με υπόστρωμα αποτελούμενο από εμπλουτισμένο άχυρο σιταριού. Οι σακούλες με το υπόστρωμα αποστειρώθηκαν (1h, 121°C, 1,1 atm) και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με σπόρο (spawn) μανιταριών (3% w/w) που είχε προηγουμένως αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο με βάση τους σπόρους σιταριού (Koutrotsios et al. 2014). Ο αποικισμός του υποστρώματος από το μυκήλιο έγινε στους 25°C στο σκοτάδι. Στη συνέχεια οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού διαμορφώθηκαν σε 18°C, 95% και 700 lux/m² αντίστοιχα. Για την παραγωγή των μανιταριών τα επίπεδα CO₂ διατηρήθηκαν κάτω των 1200 ppm, η υγρασία ρυθμίστηκε στο 80% και ο φωτισμός αυξήθηκε σε 1000 lux/m². (Koutrotsios et al, 2014). Οι καρποφορίες συλλέχθηκαν, ομογενοποιήθηκαν και λυοφιλιώθηκαν. Στη συνέχεια αξιολογήθηκε το περιεχόμενο των λυοφιλιωμένων δειγμάτων καθώς και άλλων τριών εμπορικών, μη αυτόχθονων σε στερόλες και λιπαρά οξέα. Τέλος εκτιμήθηκε η πιθανή ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων τους στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού.

4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Στην αέρια χρωματογραφία η κινητή φάση είναι αέριο και επομένως τα προς διαχωρισμό συστατικά πρέπει να βρίσκονται και αυτά σε αέρια μορφή. Έτσι οι μη πτητικές ενώσεις πρέπει να μετατραπούν στα πτητικά τους παράγωγα. Αρχικά τα δείγματα σαπωνοποιούνται ώστε να ελευθερωθούν τα λιπαρά οξέα από τα μόρια των γλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων και στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα θα μετατραπούν σε πτητικούς μεθυλεστέρες (FAME) με μεθυλεστεροπίηση, ενώ οι μη σαπωνοποιήσιμες στερόλες θα προσδιοριστούν αφού πρώτα μετατραπούν σε πτητικούς τριμεθυλσιλυλαιθέρες έπειτα από σιλυλίωση .

Αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη
- Διάλυμα KOH/MeOH 0.5 M *
- Boron Trifluoride in methanol 14% solution (BF₃ - διάλυμα εμπορίου)
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl *
- n - Εξάνιο / BHT
- Διάλυμα χοληστερόλης (internal standard για στερόλες μανιταριών) *
- BSTFA (αντιδραστήριο σιλυλίωσης)

Σκεύη και όργανα:

- Δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Στατώ
- Ογκομετρικές φιάλες
- Σιφόνια πληρώσεως χωρητικότητας 10 mL
- Πουάρ
- Αυτόματη πιπέτα (100 - 1000 μ L)
- Tips
- Vials για GC
- Caps για GC
- Creamer σφράγισης (κόκκινο)
- Creamer αποσφράγισης (μπλε)
- Σπάτουλα ζύγισης
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)
- Υδατόλουτρο
- Αναδευτήρας Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Hermle 2320)
- Φυγοκεντρικός εξατμιστήρας (Speedvac)
- GC

Διαλύματα:

- Διάλυμα KOH/MeOH 0,5 M: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται επακριβώς, 28.055 g KOH και διαλύονται σε 1 L MeOH.
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται, επακριβώς, 360 g NaCl και διαλύονται σε 1 L απιονισμένου H₂O.
- Διάλυμα εξανίου που περιέχει αντιοξειδωτικό (BHT) 100 ppm: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται 100 mg BHT και διαλύονται σε 1 L n-εξανίου
- Εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται, επακριβώς, 10 mg χοληστερόλης και διαλύονται σε 100 mL n – εξανίου

Αναλυτική πορεία:

Καθόλη τη διαδικασία της ανάλυσης είναι σημαντικό ο φωτισμός να είναι κατά το δυνατόν χαμηλός για την αποτροπή της φωτομετατροπής της εργοστερόλης. Ζυγίζονται 200 mg από κάθε

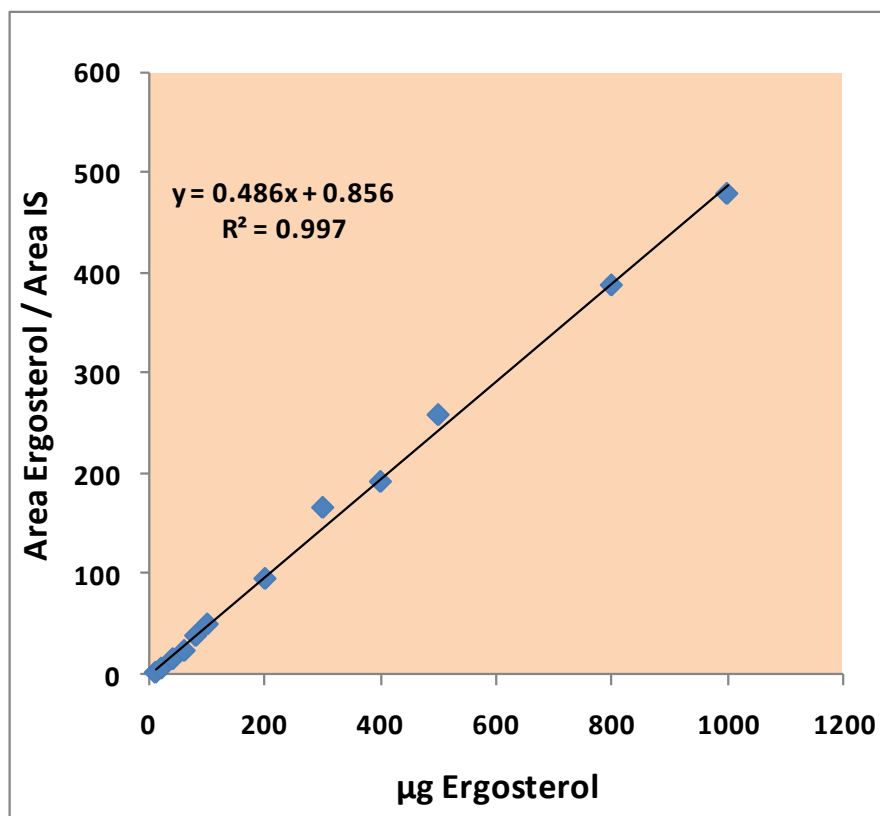
λυοφιλιωμένο δείγμα και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL με βιδωτό πώμα. Στους σωλήνες προστίθενται με σιφώνιο 2 mL διαλύματος KOH/MeOH 3M προκειμένου να σαπωνοποιηθούν τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιποειδή του δείγματος και να ελευθερωθούν τα λιπαρά οξέα και οι στερόλες που είναι συνδεδεμένες με λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μ L διαλύματος χοληστερόλης 100mg/L (εσωτερικό πρότυπο) με αυτόματη πιπέτα και πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση με vortex. Τα δείγματα τοποθετούνται για 20 λεπτά σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 60°C. Αφού οι σωλήνες κρυώσουν κάτω από νερό βρύσης προστίθεται με γυάλινο σιφώνι 1,5mL BF₃/MeOH και έπειτα από ισχυρή ανάδευση με vortex και παραμονή των δειγμάτων για 3 λεπτά σε υδατόλουτρο που έχει ρυθμιστεί στους 95 °C, τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στους αντίστοιχους πτητικούς τους μεθυλεστέρες. Το τριφθοριούχο βόριο με τη μορφή συμπλόκου με μεθανόλη αποτελεί έναν ισχυρό όξινο καταλύτη για την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων. Αφού οι σωλήνες κρυώσουν και πάλι κάτω από νερό βρύσης η αντίδραση σταματάει με προσθήκη 4 mL κορεσμένου NaCl με τη βοήθεια σιφωνίου.

Σε αυτό το σημείο τα λιποειδή των δειγμάτων βρίσκονται με τη μορφή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων και ελεύθερων στερολών.

Για την παραλαβή των λιποειδών πραγματοποιείται εκχύλιση με n- εξάνιο, διαλύτη χαμηλής πολικότητας στον οποίο τα λιποειδή των δειγμάτων διαλύονται εύκολα. Στο διάλυμα του εξανίου έχει προστεθεί αντιοξειδωτικό για την αποφυγή της οξείδωσης των λιποειδών. Μετά την προσθήκη 2mL n-εξανίου/BHT ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 5 min.

Σε αυτό το σημείο τα λιπαρά οξέα μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα σε μέρος του εξανικού εκχυλίσματος με αέρια χρωματογραφία. Έτσι παραλαμβάνονται 500 μ L με αυτόματη πιπέτα από την υπερκείμενη στιβάδα κάθε δείγματος και τοποθετούνται σε vials GC. Ακολουθεί διαχωρισμός των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

Για τον προσδιορισμό των στερολών παραλαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα 1mL από την υπερκείμενη εξανική στιβάδα κάθε δείγματος και τοποθετούνται σε vials GC. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται σε SpeedVac και τα vials τοποθετούνται σε απαγωγό και προστίθενται 250 μ L BSTFA για τη σιλυλίωση των στερολών προς πτητικούς τριμεθυλσιλυλαιθέρες. Τα GC vials αφού σφραγιστούν, αναδεύονται ισχυρά σε vortex και τοποθετούνται για 20 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 70°C. Τα σιλυλιωμένα δείγματα που προκύπτουν μπορούν να αναλυθούν στη συνέχεια με αέρια χρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας. Για ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα εργοστερόλης από το οποίο μεταφέρονται σε GC-vials ποσότητες 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 και 1000 μ g εργοστερόλης. Προστίθεται εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και σιλυλιώνονται όπως τα δείγματα.με χρήση ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας. Για ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα εργοστερόλης από το οποίο μεταφέρονται σε GC-vials ποσότητες 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 και 1000 μ g εργοστερόλης. Προστίθεται εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και σιλυλιώνονται όπως τα δείγματα.



4.2.1 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC/MS

Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος HP6890 της Agilent (Hewlett Packard) εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID), ανιχνευτή μάζας MS 6890 (Mass Selective Detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7673.

Ο διαχωρισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε σε τριχοειδή στήλη BPX70 (SGE, Melbourne, Australia) (50% PH phenylmethylpolysiloxane), μήκους 60m, εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm και πάχους εσωτερικής επικάλυψης 0.25μm. Χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως φέρον αέριο με ροή 0.8 mL/min ενώ η θερμοκρασία του εισαγωγέα του δείγματος και του ανιχνευτή ήταν 230° και 290° C αντίστοιχα. Για την ανάλυση γινόταν εισαγωγή -με ένεση- 1 μL δείγματος στο χρωματογράφο με διαχωρισμό ροής (split mode) δείγματος προς φέρον αέριο 1:20. Έτσι τελικά το 1/20 του 1 μL εισαγόταν στην στήλη. Η θερμοκρασία του φούρνου του χρωματογράφου ακολούθησε το πρόγραμμα: αρχική θερμοκρασία 130 °C, αύξηση με ρυθμό 3 °C/min έως τους 250 °C όπου και παρέμεινε σταθερή επί 15 min.

Για την ταυτοποίηση των κορυφών, οι χρόνοι κατακράτησης των λιπαρών οξέων καταγράφηκαν αρχικά με ανάλυση πολυπροτύπου 37 μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων της Sigma (Sigma L9405, St Louis, MO, USA) με χρήση του ανιχνευτή μάζας και με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών NIST και WILEY. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων.

4.2.2 Προσδιορισμός στερολών με GC/MS

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγέα split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Για την ανάλυση 1 μL σιλλυωμένου δείγματος εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο (splitless mode). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2 mm x 0.25 μm και το φέρον αέριο ήταν He υψηλής καθαρότητας, με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή μάζας ρυθμίσθηκαν στους 250 °C και 300 °C

αντίστοιχα. Η θερμοκρασία φούρνου ήταν αρχικά 210 °C, αυξήθηκε στους 300 °C με ρυθμό 5.5 °C /min και παρέμεινε στους 300 °C επί 15 min. Η ταυτοποίηση των στερολών έγινε βάσει των χρόνων κατακράτησης, και με τη χρήση των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας Wiley και NIST 2005, των φασμάτων μάζας προτύπων ουσιών και βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση χοληστερόλης ως εσωτερικού προτύπου και καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν με πρότυπα διαλύματα εργοστερόλης που περιείχαν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα προς ανάλυση δείγματα.

4.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηρότητας των δειγμάτων *Pleurotus ostreatus* στις λιποπρωτείνες του ορού

Αντιδραστήρια και όργανα

- Stock διάλυμα CuSO₄ 20 mM
- Working διάλυμα CuSO₄ 200 μM
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Ένυδρος Θεικός Χαλκός (CuSO₄ × 5H₂O, MW= 249,68)
- Απεσταγμένο Νερό (dH₂O)
- Δοκιμαστικός σωλήνας 5mL
- 96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)
- Διάλυμα ορού
- Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) – 245nm

Παρασκευή Διαλυμάτων:

- Διάλυμα Stock CuSO₄ 20 mM: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται επακριβώς, 0.0125 g CuSO₄×5 H₂O (MW= 249.68) και διαλύονται σε 2.5 mL H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

- Working Διάλυμα CuSO₄ 200μM: Για την παρασκευή του διαλύματος λαμβάνονται 20 μL stock διαλύματος και αραιώνονται με H₂O μέχρι τον όγκο των 1980 μL (Αραίωση 1:100)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) Για την παρασκευή του διαλύματος σε 1000 mL απεσταγμένου νερού διαλύονται 9 g NaCl, 0.9076 g NaHPO₄ · 2H₂O, 0.2408 g NaHPO₄·2H₂O και ρυθμίζεται το pH στο 7,4
- Μίγμα CuSO₄/PBS: Για ένα 96 well plate λαμβάνονται 21 mL PBS και προστίθενται 2 mL CuSO₄ ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 16μM.

Αρχή της Μεθόδου

Το διάλυμα του θεικού χαλκού προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Η ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης (συζυγή διένια) γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Καταγράφεται φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των εκχυλισμάτων των μανιταριών *Pleurotus* στον ορό (Lag Time).

Αναλυτική πορεία

Αρχικά παρασκευάζουμε το μητρικό διάλυμα CuSO₄ συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας CuSO₄ συγκέντρωσης 200 μM με αρραίωση 1:100 του μητρικού διαλύματος CuSO₄ με dH₂O. Ακολούθως, παρασκευάζεται το μίγμα από το διάλυμα εργασίας CuSO₄ και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS με τελική συγκέντρωση 10 μM (αραίωση 1:20). Γίνεται αρραίωση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS. Παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα των μανιταριών αραιωμένα 1:5.

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα παρελήφθησαν μετά από εκχύλιση 1g αφυδατωμένων δειγμάτων με 20mL μεθανόλη επί 24 ώρες με συνεχή ανακίνηση. Μετά την παραλαβή της μεθανόλης με φυγοκέντρηση, η εκχύλιση επαναλήφθηκε με 20mL MeOH επί 2 ώρες. Τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και αφού απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε Speedvac ανασυστήθηκαν με 2mL MeOH και χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι κοινή και για όλα τα μεθανολικά εκχυλίσματα *Pleurotus*. Αρχικά, τοποθετούνται σε πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων (96-wellplate UV) 20 μ L από το αραιωμένο δείγμα ορού. Έπειτα, τοποθετείται 1 μ L από τα αραιωμένα 1:5 μεθανολικά εκχυλίσματα των μανιταριών και τέλος, προστίθενται 230 μ L του μίγματος CuSO_4 και PBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στο Elisa Reader για 4 τουλάχιστον ώρες (μετρήσεις λαμβάνονται κάθε 2 λεπτά) και σε τελικό στάδιο λαμβάνουμε γραφήματα από τα οποία προκύπτει η μέτρηση του Lag Time.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Περιεκτικότητα άγριων ελληνικών μανιταριών του είδους *P. Ostreatus* σε λιπαρά οξέα:

Κατά τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στα στελέχη των μανιταριών υπολογίστηκαν το σύνολο των κορεσμένων(SFA), το σύνολο των μονοακόρεστων (MUFA) καθώς και το σύνολο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις παραπάνω τάξεις λιπαρών οξέων τόσο από στέλεχος σε στέλεχος όσο και ανάμεσα σε διαφορετικά δείγματα του ίδιου στελέχους (Πίνακας 1)

Πίνακας 1

Περιεκτικότητα μανιταριών σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα. Τα ελληνικά δείγματα κατατ'αχθηκαν κατά αύξουσα περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Προέλευση	SFA	MUFA	PUFA	ω6 PUFA	ω3 MUFA
Γαλλία	8,77	6,76	80,63	80,60	0,03
Τσεχία	17,07	15,09	58,84	58,13	0,71
Εμπ. Στελεχος(1)	13,44	13,07	67,07	66,99	0,08
Εμπ.Στέλεχος(2)	13,53	9,45	71,21	71,11	0,10
Εμπ.στέλεχος(3)	12,84	11,17	71,53	71,53	0
Χελμός, ιτιά	10,78	9,36	77,23	77,10	0,13
Τρίπολη, καστανιά	11,85	8,93	75,89	75,84	0,05
Ορεστιάδα, λεύκα	12,73	7,50	74,85	74,70	0,16
Γραμμένη οξυά(2),οξιά	12,85	9,81	74,33	74,22	0,12
Γαρδίκι, έλατο	12,85	10,5	73,87	73,86	0,01
Ηλιούπολη, λεύκα	11,30	10,39	72,29	72,08	0,21
Σπάτα, λεύκα	12,02	11,38	71,80	71,58	0,22
Μεσσηνία	14,12	10,85	68,91	68,75	0,17
Άλιμος,	13,25	13,22	67,11	67,05	0,07

Βοιωτία, έλατο	14,71	14,35	65,66	65,63	0,03
Γραμμένη Οξυά(1), οξιά	15,25	20,29	60,65	60,54	0,1

Σε όλα τα στελέχη, το κλάσμα που φάνηκε να κυριαρχεί είναι αυτό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (80,63%-58,84% του συνόλου των λιπαρών οξέων) ενώ ακολουθούν κατά σειρά τα κορεσμένα (17,07-8,77%) και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (6,76-20,29%). Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα που συλλέχθηκε στην περιοχή της Γραμμένης οξιάς Αιτωλοακαρνανίας (1) και αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα οξιάς, στο οποίο φαίνεται πως ενώ κυριαρχούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως και στα υπόλοιπα δείγματα, τα μονοακόρεστα υπερσχύουν των κορεσμένων.

Όσον αφορά μεμονωμένα λιπαρά οξέα, προσδιορίστηκαν 29 διαφορετικά λιπαρά οξέα με κύριο λιπαρό οξύ το πολυακόρεστο και απαραίτητο για τον άνθρωπο λινελαϊκό οξύ (18:2ω6) (80,53%-56,82%). Το δείγμα με το υψηλότερο περιεχόμενο σε λινελαϊκό οξύ ήταν το μη αυτόχθονο της Γαλλίας (80,53%) ενώ εκείνο με το χαμηλότερο περιεχόμενο το μη αυτόχθονο της Τσεχίας (56,82%).(Πίνακας 2). Όσον αφορά τα ελληνικά δείγματα το υψηλότερο περιεχόμενο σε λινελαϊκό οξύ εντοπίστηκε στο δείγμα του Χελμού από την Πελοπόννησο (76,90%) ενώ εξίσου υψηλό περιεχόμενο, υψηλότερο και από τα τρία εμπορικά δείγματα (71,26-66,58) φάνηκε να έχουν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην Τρίπολη (75,66%), την Ορεστιάδα (74,42), τη Γραμμένη οξιά(2) (74,06%), το Γαρδίκι (73,72%) και την Ηλιούπολη (71,77%).

Πίνακας 2:

Περιεκτικότητα μανιταριών σε λινελαϊό οξύ. Τα ελληνικά δείγματα τοποθετήθηκαν κατά μειούμενη περιεκτικότητα

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	% ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ
	<i>Λινελαϊκό (27,55 min)</i>
<i>Γαλλία</i>	80,53
<i>Τσεχία</i>	56,82
<i>Εμπορικό 1</i>	66,58
<i>Εμπορικό 2</i>	70,80
<i>Εμπορικό 3</i>	71,26
<i>Χελμός, ιτιά</i>	76,90
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	75,66
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	74,42
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	74,06

<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	73,72
<i>Ηλιούπολη,λένκα</i>	71,77
<i>Σπάτα. Λεύκα</i>	71,02
<i>Μεσσηνία</i>	68,51
<i>Άλιμος,</i>	66,30
<i>Βοιωτία,έλατο</i>	65,35
<i>Γραμμένη οξιά(1),οξιά</i>	60,36

Τα δύο αμέσως επόμενα σε αφθονία λιπαρά οξέα ήταν το παλμιτικό (16:0) και το ελαϊκό οξύ (18:1-9c) (Πίνακες 3,4). Στα μισά περίπου δείγματα υπερτερούσε το παλμιτικό ενώ στα άλλα μισά το ελαϊκό με παραπλήσιες, γενικά, περιεκτικότητες. Το μεγαλύτερο περιεχόμενο σε παλμιτικό οξύ (12,13-7,48%) εντοπίστηκε στο δείγμα της Βοιωτίας (12,13%) και της Γραμμένης οξιάς(1) (12,03%) αλλά και στο μη αυτόχθονο δείγμα της Τσεχίας (12,0%), ενώ η μικρότερη περιεκτικότητα εντοπίστηκε στο δείγμα της Γαλλίας (7,48%). Οι περιεκτικότητες των εμπορικών δειγμάτων σε παλμιτικό ήταν παραπλήσιες και υπολογίστηκε κατά μέσο όρο 10,59% και τα ελληνικά δείγματα με περιεκτικότητες χαμηλότερες αυτών των εμπορικών ήταν τα δείγματα από το Χελμό (9,19%),τα Σπάτα (9,25%), την Ηλιούπολη (9,27%), την Τρίπολη (9,99%) και την Ορεστιάδα (9,99%).

Όσον αφορά το ελαϊκό οξύ (19,48-6,29%) η μέγιστη τιμή εντοπίστηκε στα δείγματα από τη Γραμμένη οξιά (1) και η ελάχιστη στο μη αυτόχθονο γαλλικό μανιτάρι. Η διακύμανση των τιμών στα τρία εμπορικά στελέχη κυμαινόταν από 11,31-8,51% και μόνο τα μανιτάρια από την Ορεστιάδα (6,80%) και οριακά αυτό της Τρίπολης (8,24%) είχαν τιμές χαμηλότερες από εκείνη του εμπορικού δείγματος με τη χαμηλότερη τιμή. Μεγαλύτερη περιεκτικότητα από το εμπορικό δείγμα με την υψηλότερη τιμή (11,31%) προέκυψε στο δείγμα της Τσεχίας καθώς και στα ελληνικά δείγματα του Αλίμου (12,30%) και της Βοιωτίας (13,13%)

Πίνακες 3,4: Περιεκτικότητα μανιταριών σε ελαϊκό οξύ.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	% ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ (Ελαϊκό (26,40 min)
<i>Γαλλία</i>	6,29
<i>Τσεχία</i>	13,39
<i>Εμπορικό 1</i>	11,31
<i>Εμπορικό 2</i>	8,51

<i>Εμπορικό 3</i>	10,51
<i>Γραμμένη οξυά(1),οξιά</i>	19,48
<i>Βοιωτία,έλατο</i>	13,13
<i>Άλιμος,</i>	12,30
<i>Σπάτα. Λεύκα</i>	10,51
<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	10,18
<i>Μεσσηνία</i>	9,63
<i>Ηλιούπολη,λένκα</i>	9,50
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	9,23
<i>Χελμός, ιτιά</i>	8,84
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	8,24
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	6,80

Πίνακες 3,4: Περιεκτικότητα μανιταριών σε παλμιτικό οξύ

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	% ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ (<i>Παλμιτικό (21 min)</i>)
<i>Γαλλία</i>	7,48
<i>Τσεχία</i>	12,00
<i>Εμπορικό 1</i>	10,30
<i>Εμπορικό 2</i>	10,73
<i>Εμπορικό 3</i>	10,73
<i>Χελμός, ιτιά</i>	9,19
<i>Σπάτα. Λεύκα</i>	9,25
<i>Ηλιούπολη,λένκα</i>	9,27
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	9,99
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	9,99
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	10,01
<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	10,82
<i>Άλιμος,</i>	10,89
<i>Μεσσηνία</i>	11,86
<i>Γραμμένη οξυά(1),οξιά</i>	12,03
<i>Βοιωτία,έλατο</i>	12,13

Ακόμα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύτηκαν και πολύ μικρές ποσότητες από κάποια άλλα λιπαρά οξέα ,όπως το στεατικό (18:0),το δεκαπεντανικό (15:0), το βεχενικό (18:1ω7), το αραχιδικό (20:0),

το παλμιτελαικό (16:1), το μυριστικό (14:0), το α-λινολενικό, το αραχιδονικό και το ελαιδικό καθώς και πολύ μικρές ποσότητες (0,2-1,3%) κάποιων άλλων λιπαρών οξέων (πίνακας 5). Τέλος με τη βοήθεια ανιχνευτή μάζας ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες κάποιων δικαρβοξυλικών οξέων όπως είναι το φουμαρικό, το σουκινικό και το συμπερικό τα οποία ταυτοποιήθηκαν από τα κατιονικά θραύσματα στο φάσμα μαζών.(πίνακας 6)

Πίνακας 5:

Περιεκτικότητα μανιταριών σε λιπαρά οξέα

Λιπαροξύ	Rt (min)	Γαλλία	Τσεχία	Εμπ. 1	Εμπ. 2	Εμπ. 3	Χελμός, τιτά	Τρίπολη, καστανιά	Ορεστιάδα, λεύκα	Γραμμένη οξυά(2)	Γαρδίκι, έλατο	Ηλιοπούλη, λεύκα	Σπάτα, Λεύκα	Μεσσηνία	Άλιμος	Βοιωτία, έλατο	Γραμμένη οξυά(1)
9:0	7,03	0,00	0,00	0,00	0,07	0,01	0,06	0,00	0,05	0,05	0,03	0,06	0,16	0,02	0,00	0,00	0,00
10:0	8,25	0,00	0,00	0,03	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11:0	9,80	0,00	0,00	0,06	0,04	0,02	0,05	0,05	0,04	0,06	0,02	0,07	0,10	0,00	0,04	0,06	0,02
12:0	11,71	0,00	0,07	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
13:0	13,90	0,00	0,06	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,82	0,00	0,00	0,00	0,26	0,22	0,18	0,00
14:0	16,12	0,02	0,08	0,23	0,16	0,16	0,07	0,18	0,10	0,13	0,12	0,12	0,13	0,17	0,17	0,13	0,08
14:1	17,10	0,00	0,48	0,28	0,24	0,05	0,07	0,10	0,10	0,14	0,05	0,08	0,20	0,13	0,16	0,23	0,08
15:0	18,48	0,21	1,08	0,76	0,75	0,55	0,55	0,61	0,60	0,80	0,58	0,56	0,71	0,55	0,51	0,85	0,79
16:0	21,00	7,48	12,0	10,3	10,73	10,7	9,19	9,99	9,99	10,01	10,82	9,27	9,25	11,86	10,9	12,1	12,0
16:1	21,71	0,11	0,17	0,40	0,25	0,17	0,17	0,19	0,13	0,16	0,06	0,18	0,15	0,33	0,21	0,24	0,15
17:0	23,34	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,01	0,04	0,03	0,00	0,05	0,02	0,06	0,00	0,04	0,00	0,03
18:0	25,77	0,49	1,12	0,38	0,04	0,58	0,47	0,44	0,57	0,60	0,65	0,49	0,61	0,34	0,36	0,71	1,12
18:1n-9c	26,40	6,29	13,39	11,31	8,51	10,51	8,84	8,24	6,80	9,23	10,18	9,50	10,51	9,63	12,30	13,13	19,48
18:1n-7	26,52	0,03	0,10	0,11	0,00	0,04	0,07	0,07	0,14	0,02	0,03	0,08	0,02	0,02	0,15	0,11	0,06
18:2ω6	27,55	80,53	56,82	66,58	70,80	71,26	9,23	75,66	74,42	74,06	73,72	71,77	71,02	68,51	66,30	65,35	60,36
18:3n-3	29,00	0,03	0,71	0,04	0,10	0,00	0,11	0,05	0,16	0,12	0,01	0,15	0,21	0,1	0,07	0,03	0,1
20:0	30,32	0,09	0,00	0,00	0,09	0,05	0,00	0,00	0,05	0,01	0,00	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,09
20:1n-9	30,94	0,02	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,00	0,05	0,00	0,08
20:2n-6	32,23	0	0,07	0,3	0,22	0,16	0,09	0,12	0,16	0,02	0,06	0,23	0,22	0,20	0,20	0,11	0,06
21:0	32,68	0,06	0,78	0,32	0,35	0,19	0,12	0,33	0,35	0,13	0,06	0,44	0,30	0,32	0,23	0,26	0,05
20:3n-6	33,03	0,05	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n-6	33,56	0,00	0,80	0,06	0,09	0,00	0,09	0,06	0,06	0,13	0,01	0,06	0,29	0,03	0,08	0,17	0,04
20:3n-3	33,94	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	0,07	0,00	0,00	0,00
22:0	35,41	0,11	0,51	0,49	0,25	0,31	0,05	0,16	0,19	0,00	0,14	0,12	0,29	0,34	0,26	0,09	0,30
22:1n-9	36,09	0,20	0,84	0,88	0,27	0,36	0,11	0,31	0,21	0,15	0,10	0,30	0,33	0,59	0,20	0,38	0,22
22:2n-6	37,13	0,02	0,45	0,00	0,00	0,12	0,03	0,00	0,00	0,00	0,07	0,01	0,02	0,00	0,47	0,00	0,08
23:0	37,34	0,00	1,37	0,08	0,10	0,00	0,12	0,04	0,28	0,16	0,06	0,06	0,22	0,15	0,50	0,16	0,13
24:0	39,08	0,33	0,00	0,00	0,00	0,24	0,07	0,02	0,16	0,06	0,32	0,00	0,19	0,10	0,03	0,14	0,59
24:1	39,65	0,11	0,08	0,08	0,16	0,05	0,08	0,00	0,08	0,08	0,05	0,22	0,12	0,15	0,16	0,25	0,21
Αθροισμα		96,16	91,0	93,5	94,20	95,5	97,37	96,68	95,08	97,00	97,22	93,98	95,20	93,89	93,6	94,7	96,8

Πίνακας 6:

Περιεκτικότητα των μανιταριών της μελέτης σε δικαρβοξυλικά οξέα

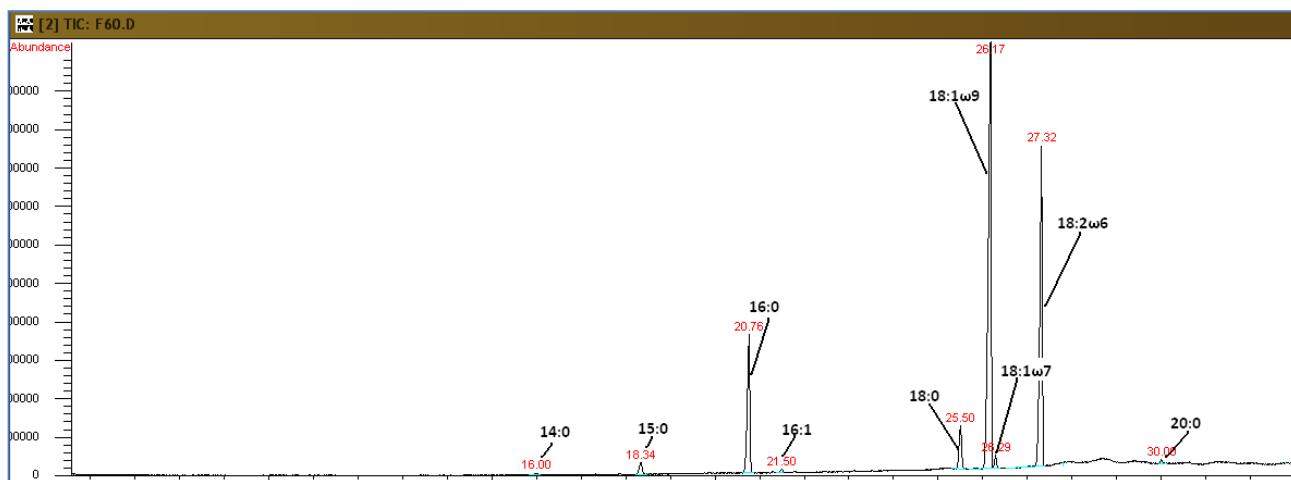
	% του συνόλου των λιπαρών οξέων		
	Φουμαρικό	Σουκινικό	Σουμπερικό
Rt (min)	7,24	8,04	40,55
<i>Γαλλία</i>	0,49	0,26	1,05
<i>Τσεχία</i>	0,4	0,27	2,02
<i>Εμπ.1</i>	0,63	0,26	3,04
<i>Εμπ.2</i>	0,19	0,25	1,16
<i>Εμπ.3</i>	0,44	0,42	0,73
<i>Χελμός, ιτιά</i>	0,3	0,1	0,55
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	0,27	0,12	0,79
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	0,17	0,2	2,13
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	0,47	0,12	0,71
<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	0,23	0,12	0,4
<i>Ηλιούπολη,λέυκα</i>	0,33	0,09	1,19
<i>Σπάτα. Λεύκα</i>	0,37	0,16	1,04
<i>Μεσσηνία</i>	0,36	0,09	1,99
<i>Άλιμος,</i>	0,49	0,11	1,28
<i>Βοιωτία,έλατο</i>	0,25	0,11	1,37
<i>Γραμμένη οξυά(1),οξιά</i>	0,18	0,13	0,79

Συμπερασματικά, σε όλα τα δείγματα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούσαν το μεγαλύτερο κλάσμα των λιπαρών οξέων, ενώ ακολουθούσαν τα κορεσμένα και τα μονοακόρεστα. Το λινελαϊκό οξύ ήταν το κύριο λιπαρό οξύ σε όλα τα δείγματα και αποτελεί και τον κύριο αντιπρόσωπο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Επειδή όμως η συνολική περιεκτικότητα των μανιταριών σε λιποειδή είναι χαμηλή θα λέγαμε πως η συμβολή τους στην επίτευξη των προτεινόμενων προσλήψεων σε απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολύ μικρή. Έτσι το ενδιαφέρον συγκεντρώνεται γύρω από τις ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που προκύπτουν από το λινελαϊκό οξύ και ευθύνονται για το ιδιαίτερο άρωμα των μανιταριών. Άλλα συχνά απαντώμενα λιπαρά οξέα είναι το

παλμιτικό, κύριο αντιπρόσωπος κορεσμένων λιπαρών οξέων, και το ελαϊκό το οποίο είναι το κύριο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ.

Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία τιμές και συγκεκριμένα με αναλύσεις που έγιναν σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* από τη Πορτογαλία (Reis et al, 2012), με αναλύσεις που έγιναν σε στελέχη από την Ινδία, την Κίνα (Dimou et al, 2002) και την Τουρκία (Ergönül et al 2013). Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφανίζονται τα αποτελέσματα των Yilmaz et al(2006) σύμφωνα με τα οποία τα μονοακόρεστα υπερτερούν των πολυακόρεστων. Έτσι το μεγαλύτερο μέρος των λιπαρών οξέων αποτελείται από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ενώ ακολουθούν τα πολυακόρεστα και τέλος τα κορεσμένα Ένα άλλο στοιχείο που δεν συμφωνεί με τη βιβλιογραφία είναι η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε στεατικό οξύ. Σύμφωνα με τους Yilmaz et al(2006), Ergönül et al(2013) και Reis et al(2012) σε στελέχη του *Pleurotus ostreatus* εντοπίστηκαν ποσότητες στεατικού οξέος σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος που η περιεκτικότητα των μανιταριών στο συγκεκριμένο οξύ φάνηκε να είναι αμελητέα(0,58%)

Χρωματογράφημα GC-MS μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων σε λιπίδια μανιταριών *Pleurotus*



5.2 Περιεκτικότητα άγριων ελληνικών μανιταριών του είδους *P. ostreatus* σε στερόλες

Κύρια στερόλη σε όλα τα δείγματα είναι η εργοστερόλη ενώ ανιχνεύθηκαν και μικρές ποσότητες κάποιων άλλων στερολών. Όσον αφορά την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε εργοστερόλη (80,81-10,42 mg/100g fw παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη αλλά και στα διαφορετικά δείγματα ίδιων στελεχών.(Πίνακας 7). Από όλα τα δείγματα (ελληνικά, μη

αυτόχθονα και εμπορικά) η μέγιστη τιμή (80,81 mg/100 g fw) παρατηρήθηκε στο δείγμα που συλλέχθηκε από την περιοχή της Γραμμένης Οξιάς (1) ενώ η ελάχιστη (10,42 mg/100g fw) στο δείγμα του Αλίμου. Το μη αυτόχθονο δείγμα της Γαλλίας (37,68 mg/100 g fw) εμφάνισε περιεκτικότητα ενδιάμεση σε σχέση με αυτή των ελληνικών δειγμάτων (μο 40,41 mg/100 g fw) ενώ η τιμή του δείγματος της Τσεχίας ήταν χαμηλή (13,45 mg/100g fw) αφού πλησίαζε την ελάχιστη τιμή που προσδιορίστηκε. Το εύρος των περιεκτικοτήτων των εμπορικών μανιταριών ήταν 51,77-79,08 mg/100 g fw. Εξαιρουμένου του δείγματος της Γραμμένης Οξιάς, το οποίο και εμφάνισε τη μέγιστη τιμή, μόνο το δείγμα της Ορεστιάδας είχε τιμή οριακά μεγαλύτερη από τα εμπορικά δείγματα, ενώ το δείγμα από το Γαρδίκι ήταν το μοναδικό που η περιεκτικότητά του σε εργοστερόλη βρισκόταν εντός του εύρους των περιεκτικοτήτων των εμπορικών δειγμάτων. Όλα τα άλλα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και των μη αυτόχθονων είχαν τιμές μικρότερες των εμπορικών.

Πίνακας 7

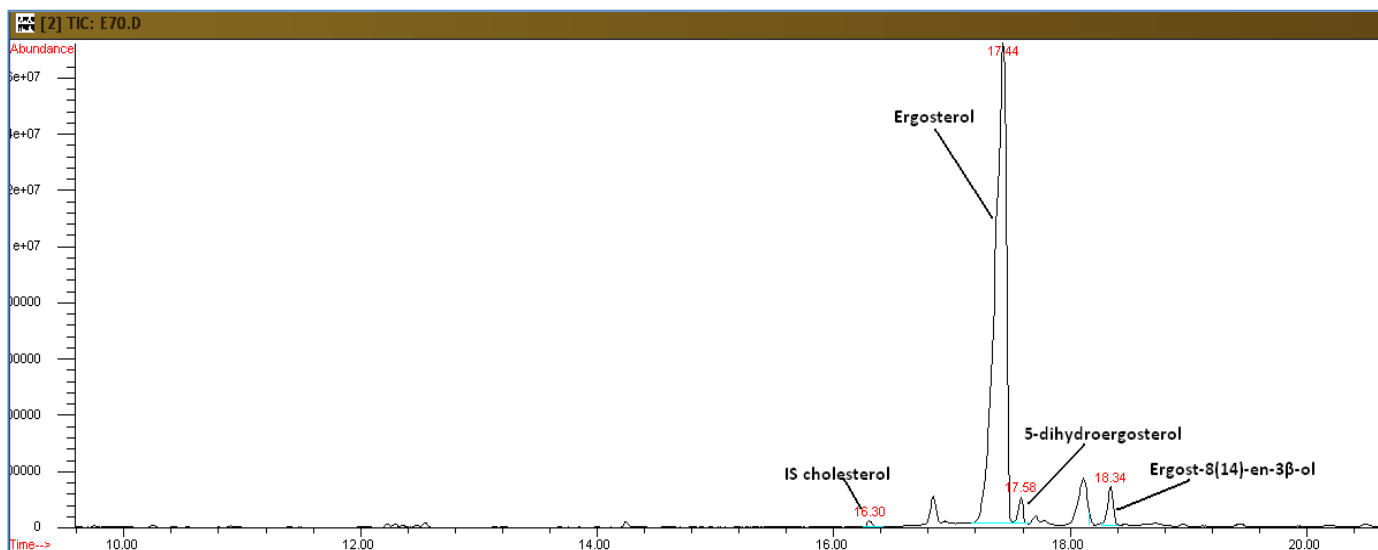
Περιεκτικότητα μανιταριών σε εργοστερόλη (mg/100 fw). Τα ελληνικά δείγματα τοποθετήθηκαν κατά αύξουσα περιεκτικότητα.±

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗ mg/100 g FW
<i>Γαλλία</i>	37,68 ± 18,78
<i>Τσεχία</i>	13,45 ± 3,10
<i>Εμπ. Στελεχος(1)</i>	51,77 ± 9,64
<i>Εμπ.Στέλεχος(2)</i>	79,08 ± 6,89
<i>Εμπ.στέλεχος(3)</i>	62,53 ± 12,32
<i>Γραμμένη Οξυά(1), οξιά</i>	80,81 ± 6,76
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	64,71 ± 17,97
<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	61,98 ± 19,22
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	47,58 ± 4,19
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	39,10 ± 12,09
<i>Σπάτα, λεύκα</i>	34,86 ± 9,85
<i>Χελμός, ιτιά</i>	34,25 ± 10,13
<i>Βοιωτία, έλατο</i>	34,19 ± 11,50
<i>Μεσσηνία</i>	18,75 ± 6,65
<i>Ηλιούπολη, λεύκα</i>	17,03 ± 0,84
<i>Άλιμος,βραχυτίτων</i>	10,42 ± 5,13

Εκτός από την εργοστερόλη σε κάποια δείγματα εντοπίστηκαν και μικρές ποσότητες των στερολών ergost-8(14)-en-3β-ol, 5α-ergosta-7,22E-dien-3β-ol (5-dihydroergosterol), 20.Xi.-Lanosta-7,9(11)-

dien-18-oic acid, 3.beta.,20,25-trihydroxy-.gamma.-lactone, Anthiaergosta-1,5,7,9,22-pentaene, 6,16- α -dimethyl-1,6-didehydroprogesterone, Anthiaergosta-1,5,7,9-tetraene.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία(Phillips,2011.Teichmann,2006. ,Gil-Ramirez,2011.Matilla 2001, Jasinghe 2005.) κύρια στερόλη των μανιταριών είναι η εργοστερόλη. Σχετικά με τα εμπορικά μανιτάρια οι τιμές της εργοστερόλης που προέκυψαν στο παρόν πείραμα έρχονται σε συμφωνία με αυτές των Teichmann(2006) και Phillips(2011). Επιπλέον κοινό εύρημα αποτελεί τόσο η μεγαλύτερη περιεκτικότητα των εμπορικών μανιταριών, σε σύγκριση με τα άγρια, σε εργοστερόλη όσο και ο προσδιορισμός σε όλα τα δείγματα της στερόλης ergosta-7,22-dienol.



Χρωματογράφημα GC-MS τριμεθυλσυλλαιθέρων των στερολών σε λιπίδια *Pleurotus ostreatus*

Τέλος στη βιβλιογραφία αναφέρεται ο προσδιορισμός μικρών ποσοτήτων 2 στερολών της ergosta-5,7-dienol (προβιταμίνη D4) και της ergosta-7-enol (fungisterol) οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν στο παρόν πείραμα.

5.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης δειγμάτων μανιταριών *P. ostreatus* στις λιποπρωτεΐνες του ορού

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τελική επιμήκυνση του lag time, δηλαδή του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση (Πίνακας 8). Η επαγόμενη από τα εκχυλίσματα των μανιταριών αύξηση προέκυψε από την αφαίρεση του χρόνου επαγωγής των control δειγμάτων από τις αντίστοιχες που

καταγράφηκαν στις θέσεις που είχαν προστεθεί τα εκχυλίσματα των μανιταριών. Η χρήση δειγμάτων control σε αυτές τις μετρήσεις είναι απαραίτητη γιατί όπως είναι γνωστό ο ορός εμφανίζει από μόνος του μια αντίσταση στην οξείδωση έτσι είναι σημαντικό η τυχόν αύξηση που θα παρατηρηθεί να οφείλεται αποκλειστικά στη δράση των μανιταριών. Η επιμήκυνση της αντίστασης του ορού στην οξείδωση εμφάνισε μεγάλη διακύμανση (0-6975 sec). Η μέγιστη τιμή (6975 sec) παρατηρήθηκε σε ένα από τα τρία εμπορικά δείγματα ενώ η ελάχιστη στο μη αυτόχthono δείγμα της Γαλλίας και στα δείγματα της Τρίπολης και της Ηλιούπολης. Από τα Ελληνικά δείγματα μεγαλύτερη επιμήκυνση έδωσε το δείγμα από το Γαρδίκι (3778 sec) ενώ σημαντικά υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν στα δύο δείγματα της Γραμμένης Οξιάς και στο δείγμα της Βοιωτίας. Το δείγμα της Γαλλίας δεν προκάλεσε καμία αύξηση στο lag time ενώ η αύξηση που προκλήθηκε από το δείγμα της Τσεχίας ήταν πολύ μικρή (60 sec)

Όσον αφορά τα εμπορικά δείγματα υπήρχε μεγάλη διακύμανση στις τιμές (369-6975 sec). Εξαιρουμένων των δειγμάτων από την Τρίπολη και την Ηλιούπολη (0 sec), τα Σπάτα (43 sec), το Χελμό (167 sec) και τον Άλιμο (209 sec), τα υπόλοιπα ελληνικά δείγματα είχαν τιμές παραπλήσιες αυτών των εμπορικών.

Πίνακας 8

Επαγόμενη από τα μανιτάρια αύξηση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση από χαλκό εκφρασμένη ως τελική αύξηση του lag time (sec).

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΥΞΗΣΗ LAG TIME (sec)
<i>Γαλλία</i>	0
<i>Τσεχία</i>	60
<i>Εμπ. Στελεχος(1)</i>	369
<i>Εμπ.Στέλεχος(2)</i>	955
<i>Εμπ.στέλεχος(3)</i>	6975
<i>Γαρδίκι, έλατο</i>	3778
<i>Βοιωτία, έλατο</i>	706
<i>Γραμμένη οξυά(2),οξιά</i>	702
<i>Γραμμένη Οξυά(1), οξιά</i>	666
<i>Ορεστιάδα, λεύκα</i>	557
<i>Μεσσηνία</i>	375
<i>Άλιμος,βραχυτίτων</i>	209
<i>Χελμός, ιτιά</i>	167
<i>Σπάτα, λεύκα</i>	43
<i>Ηλιούπολη, λεύκα</i>	0
<i>Τρίπολη, καστανιά</i>	0

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά θα λέγαμε πως τα μανιτάρια αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο τομέα έρευνας και ανάπτυξης. Με δεδομένο πως η κατανάλωση μανιταριών στην Ελλάδα φθάνει τους 11.000 τόνους και το μεγαλύτερο τμήμα καλύπτεται από εισαγωγές το ενδιαφέρον γύρω από την εμπορική αξιοποίηση Ελληνικών στελεχών αυξάνεται. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το παραπάνω πείραμα, αν και απαιτούνται και άλλες μελέτες, θα λέγαμε πως τα ελληνικά μανιτάρια είναι τουλάχιστον ανταγωνιστικά με τα εμπορικά και η εμπορική τους αξιοποίηση καθώς και χρήση τους για την δημιουργία λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων είναι τουλάχιστον ελκυστική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Antolovich M., Prenzler P.D, Patsalides E., McDonald S. , Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*,127, 183–198
2. Bauer Petrovska B. Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. 2001 *Eur Food Res Technol* (2001) 212 :469–472
3. Barreira João C.M. 2014. 'Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms'' *Food Analytical Methods* Vol. 7, Issue 1, pp 217-223.
4. Barros Lillian et al ,2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals .*Food and Chemical Toxicology*,46, pp 2742-1747
5. Chang S.T. Buswell J.A. 1996. Mushroom nutraceutical. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , Vol. 12, pp 473-476
6. Chatterjee Soumya, Biswas G, Basu S.K, Acharya K ,2011. Antineoplastic effect of mushrooms: a review. *AJCS* 5(7):904-911
7. Cheung P. C. K. 2010, The nutritional and health benefits of mushrooms *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 35, 292–299
8. Cheung P.C.K 2013. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits . *Food Science and Human Wellness* 2 (2013) 162–166
9. Deepalakshmi Krishnamoorthy ,Mirunalini S.,2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties *J Biochem Tech* 5(2):718-726
10. Dimou D.M, Georgala Ai.,Komaitis M,Aggelis G.2002. Myceliac fatty acid composition of *Pleurotus* spp and its application in the intrageneric differentiation. *Mycol. Res.* 106(8) : 925±929

11. Erick J. Dufourc 2008 Sterols and membranes dynamics'' J chem Biol. 2008 Nov. 1 (1-4) : 63-77
12. Esterbauer H, Jurgens G., Quehenberger O, Koller E. 1987 Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes *J. Lipid Res.* 28: 495-509.
13. Ergönül P.G Akata I., Kalyoncu F, Ergönül B. 2013. Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species. The Scientific World Journal Volume 2013, Article ID 163964, 4 pages
14. fluka chemika, 1995. Organosilicon Compounds, Analytical Applications, Synthetic Applications. Second edition.
15. Ghaffari M.A , Ghiasvand T. 2010. Kinetic study of low density lipoprotein oxidation by copper. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2010 / 25 (1) 29-36
16. Gil Ramirez A., Clavijo C, Palanisamy M., Soler-Rivas C., Ruiz-Rodriguez A., Marin R.F, Reglero G., Perez M., 2011. Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. Proceedings of the 7th International
17. Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7) 2011. pp110-119
18. Gropper S.S , Jack L Smith J.L., Groff J.L 4th edition. "Advanced Nutrition and Human Metabolism'' THOMSON WADSWORTH
19. Hossain Md. S., Alam N. Ruhul Amin S.M., Basunia M.A, Rahman A., 2007. Essential Fatty Acid Contents of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Agaricus bisporus*. Bangladesh J. Mushroom. 1(1): 1-7, 2007 (June)

20. Hwang Bao-Shyung, Wang Jih-Terng, Choong Youk-Meng.2003. A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography.Journal of Food Composition and Analysis 16 (2003) 169–178
21. Jasinghe Viraj J.2005. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation Food Chemistry Vol. 92, Issue 3, 541–546
22. Jasinghe Viraj, Perera CO, Barlow PJ.2005 Bioavailability of vitamin D₂ from irradiated mushrooms: an *in vivo* study British Journal of Nutrition Vol. 93 pp 951-955
23. Jeena Gajendra S,Punetha H.,Prakash Om.,Mahesh Chandra,K P S Kushwaha , 2014 .Study on in vitro antioxidant potential of some cultivated Pleurotus species (oyster mushroom), Indian journal of natural products and resources Vol 5(1),pp56-61
24. Kai J., Santiago N.,Puntambekar A., Lee S.H., Sehy D.W, Schultheis R., Han J. Ahn C.H.,2011,The next generation microplate using power of microfluidicsfor femtogram/mL level sensitivity. 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences.
25. October 2-6, 2011, Seattle, Washington, USA
26. Kalac Pavel. 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, J Sci Food Agric93: 209–218
27. Kalac Pavel,2009.Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. Food Chemistry 113 (2009) 9–16
28. Keegan Raphael-John H., Lu Z., Bogusz J.M,Williams J.E Holick M.F,2013.Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. Dermato-Endocrinology 5:1, 165–176

29. Khatun Selima, Islam A. Cakilcioglu U. Guler P., Chatterjee N.C., 2014. Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) al NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences (2014). Volumes 72–73, June 2015, Pages 1–5
30. Kleinveld Henne A , Hak-Lemmers H.L.M, Stalenhoef A.F.H, Demacker P. N.M, 1992. Improved Measurement of Low-Density-Lipoprotein Susceptibility to Copper-Induced Oxidation: Application of a Short Procedure for Isolating Low-Density Lipoprotein. Clin. Chem 38/10, 2066-2072
31. Koutrotsios, G., Mountzouris, K.C., Chatzipavlidis, I. & Zervakis, G.I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi - Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chemistry* 161, 127-135.
32. Manzi Pamela, Pizzoferrato L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68 (2000) 315±318
33. Marshall Elaine, N. G. (Tan) 2009. Make money by growing mushrooms. Nair Rural Infrastructure and Agro-Industries Division Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 2009. Diversification booklet number 7
34. Miles P.G, Shu-ting Chang. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect ,and Environmental Impact. CRC Press . 480 Pages
35. Miles P.G, Shu-ting Chang 1997 mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments World Scientific, 1997 - 194 pages
36. Mattila P., Suonpää K., Piironen V. 2000. Functional properties of edible mushrooms Nutrition Volume 16, Issues 7–8, Pages 694–696

37. Mattila Pirjo, Konko K. Eurola M., Pihlava JM, Astola J., Vahteristo L, Hietaniemi V. Kumpulainen J.,Valtonen M., Piironen,2001 V.J.Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms. . Agric. Food Chem.2001. 49,2343–2348
38. GR.Nireesha GR., L.Divya L.,Sowmya C.,Venkateshan N., M. Niranjana Babu.,LavakumaV.2013. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. IJNTPS volume 3.number 4.oct2013,pp87-98.
39. Organisation for Economic Co-operation and Development.Paris 2005. Consensus Document on the Biology of *Pleurotus* spp. (Oyster Mushroom). ENV/JM/MONO(2005)17
40. _Pedneault K., Angers P. T.J., A. R.J.,2007. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var.‘*citrino-pileatus*’ grown at different temperatures. Mycological Research Volume 111, Issue 10, Pages 1228–1234
41. Philippoussis, A. & Zervakis, G. (2000). Cultivation of edible mushrooms in Greece: presentation of the current status and analysis of future trends. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol. 15, pp. 843-848. Edited by L.Van Griensven. Maastricht.
42. Phillips Katherine M., Ruggio D.M,Horst R.L, Minor B,Simon R.R,Feeney M.J,Byrdwell W.C,Haytowitz D.B.2011. Vitamin D and Sterol Composition of 10 Types of Mushrooms from Retail Suppliers in the United States. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 7841–7853.
43. Pushpa S.,Preety A.,Sakshi S.,Jyoti A.2012. Antioxidant mushrooms :a review IRJP 2012,3(6)65-70

44. Rajarathnam S., Zakia Bano Z., Miles P.M. 2009 Pleurotus mushrooms. Part I A. morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition
45. Reis F.S. Barros L., Martins A., Ferreira I.C.F.R. 2012 Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. Food and Chemical Toxicology Vol. 50, Issue 2, Pages 191–197
46. Rop O., Mlcek J., Jurikova T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects . Nutrition Reviews Vol. 67(11):624–631
47. Royal society of chemistry. Mass spectrometry
48. Stachowiak B., Regula J. 2012. Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. Eur Food Res Technol(2012)234:369-380
49. Salazar-Medina Alex J. Sugich-Miranda R., Teran-Cabanillas E.², Hernández J., González-Aguilar G.A., Rudiño-Piñera E., Sotelo-Mundo R.R, Velázquez-Contreras E.F 2013. Antioxidant Capacity of Two Novel Bioactive Fe(III)-Cyclophane Complexes, Molecules 2013 1762-1774
50. Schnitzer E, Pinchuk I., Fainaru M., Schafer Z., Lichtenberg D, 1995. Copper-induced lipid oxidation in unfractionated plasma: the lag preceding oxidation as a measure of oxidation-resistance Biochem Biophys Res Commun. Vol. 216, No. 3 pp 854-861
51. Senatore F., Dini A, Marino A. Chemical Constituents of Some Basidiomycetes 1988. J Sci Food Agric 1988, 45, 337-345
52. Shahidi F., Zhong Y. 2005 Lipid oxidation: measurement methods. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume . 2005 John Wiley & Sons, Inc.

53. Sigma-Aldrich Co.1997.BSTFA Product Specification
54. Torres, M.C. Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I., Pérez-Coello M.S 2010. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta* Vol. 660, Issues 1–2, P 177–182
55. Teichmann A., Dutta P.C, Staffas A., Jagerstad M.2007. Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT* 40 (2007) 815–822
56. Urbain P., Singler F., Ihorst G., Biesalski H-K, Bertz H.2011 . Bioavailability of vitamin D₂ from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65:965-71
57. Valverde M.E, Hernández-Pérez T., Paredes-López O.2015 Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality. *International Journal of Microbiology* vol.2015 Article ID 376387. 14 pages.
58. Whittaker R.H 1978.Protist classification and the kingdoms of organism. *BioSystems*, 10 (1-2):3-18.
59. Wittig M. , Krings U., Berger R.G .2013. Single-run analysis of vitamin D photoproducts in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) after UV-B treatment. *Journal of Food Composition and Analysis* 31 (2013) 266–274
60. Yilmaz N. Mehtap Solmaz M., Turkekul I., Elmastas M.2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99 (2006) 168–174
61. Zervakis G.I 2001.Mycodiversity in Greece. *Boccone* 13: 119-124.

ΙΣΤΟΤΟΠΙΟΣ:

62. Society of general microbiology <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/fungi>)
63. <http://www.mushrooms.ca/nutrition/diabetes.aspx>
64. <http://freezedrying.com>, 2015 American Lyophilizer, INC.).
65. http://nutrition.med.uoc.gr/GreekTables/ximikes_analyseis/ximikes_analyseis_01.htm
66. <http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/DietaryFiber.aspx>

