



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας σε βιοδραστικά συστατικά και βιταμίνη D σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus* – Διατροφική παρέμβαση”.

Κολονίτσιου Χρύσα

Επιβλέπων καθηγητής: **Καλογερόπουλος Νικόλαος**,
Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη: **Καλιώρα Ανδριάννα**, Επίκουρη
Καθηγήτρια

Ζερβάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής
Καθηγητής, ΓΠΑ

Αθήνα, Ιούνιος 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή	
1.1. Μύκητες καιμανιτάρια.....	9
1.2. Μορφολογίαμανιταριών.....	10
1.3. Μανιτάρια Pleurotus.....	11
1.4. Διατροφική αξίαμανιταριών.....	12
1.4.1 Πρωτεΐνες.....	13
1.4.2 Υδατάνθρακες και β-γλυκάνες.....	15
1.4.3 Λιποειδή.....	17
1.4.4 Στερόλες.....	17
1.4.5 Εργοστερόλη και βιταμίνη D.....	18
1.4.6 Βιταμίνες και μέταλλα.....	20
1.4.7 Αντιοξειδωτικά και θεραπευτικάμανιτάρια.....	21
1.5 Επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας σεμανιτάρια.....	23
Σκοπός.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μεθοδολογία	
2.1 Εκτίμηση θερμιδικής αξίας τροφίμου.....	25
2.2 Προσδιορισμός αζώτου κατά Kjeldahl.....	27
2.3 Υπολογισμός τέφρας με αποτέφρωση.....	28

2.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός β-γλυκάνης.....	29
2.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών.....	30
2.5.1 Προσδιορισμός στερολών με GC/MS.....	32
2.5.2 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC/MS.....	33
2.6 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών.....	35
2.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση πολυφαινόλων με αέρια χρωματογραφία.....	35
2.6.2 Αέρια Χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/ MS) για τον προσδιορισμό πολυφαινόλων.....	37
2.6.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	38
2.6.4 Δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης.....	40
2.7 Προσδιορισμός βιταμίνης D.....	44
2.7.1 Υγρή χρωματογραφία - MS/MS.....	44
2.8 Πρωτόκολλο διατροφικής παρέμβασης με αποξηραμένα μανιτάρια <i>Pleurotus ostreatus</i> με διαφορετική περιεκτικότητα βιταμίνης D ₂	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Ενεργειακό περιεχόμενο μανιταριών <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
3.2 Εκτίμηση πρωτεΐνης μέσω αζώτου κατά Kjeldahl σε μανιτάρια του γένους <i>Pleurotus Ostreatus</i>	46
3.3 Αποτελέσματα προσδιορισμού τέφρας σε αποξηραμένα μανιτάρια <i>Pleurotus</i> ...	47
3.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού β-γλυκάνης.....	48
3.5 Περιεχόμενο στερολών στα μανιτάρια.....	48
3.6 Αποτελέσματα προσδιορισμού μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC-MC...	49

3.7	Αποτελέσματα προσδιορισμού πολυφαινόλων.....	51
3.7.1	Ολικές πολυφαινόλες με την φωτομετρική μέθοδο Folin Ciocalteu.....	51
3.7.2	Δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης- DPPH (AAR) και FRAP.....	52
3.7.3	Αποτελέσματα προσδιορισμού απλών φαινόλων με GC/MC.....	53
3.8	Αποτελέσματα διατροφικής παρέμβασης με μανιτάρια του γένους Pleurotus.....	55
 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		57
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που έπαιξαν σημαντικό ρόλο και συνέβαλαν στην παραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νίκο Καλογερόπουλο για την υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας εργασίας καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Ανδριάννα Καλιώρα για την σχεδίαση και υλοποίηση του πρωτοκόλλου της κλινικής παρέμβασης και στην προπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής Μαρίνα Πλυτά για τη βοήθειά της προκειμένου να φέρουμε εις πέρας την συλλογή του δείγματος των εθελοντών ενώ επιπρόσθετα πραγματοποίησε εξ'ολοκλήρου τις παρεμβάσεις με τα ερωτηματολόγια καταγραφής των διατροφικών συνηθειών των εθελοντριών. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα για την σημαντική βοήθεια στο εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης αλλά και την ουσιαστική συμβολή της στις αιμοληψίες των εθελοντριών. Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιο Ζερβάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον τρόφιμο όπως είναι το μανιτάρι αλλά και για τις εύστοχες υποδείξεις και παρατηρήσεις του κατά την διάρκεια της συγγραφής και της παρουσίασης της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Πολύ σημαντική ήταν και η συμβολή του Γιώργου Κουτρώτσιου, υποψήφιου Διδάκτορα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, που μου μετέδωσε πολλές από τις γνώσεις και την εμπειρία του σχετικά με τα μανιτάρια. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλες τις εθελόντριες που δέχτηκαν να πάρουν μέρος στη συγκεκριμένη μελέτη

Τέλος ευχαριστώ θερμά την εταιρία «Μανιτάρια Δίρφυς», για την προσφορά των αποξηραμένων μανιταριών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις και την κλινική παρέμβαση.

Περίληψη

Τα μανιτάρια, χάρη στην υψηλή διατροφική αξία αλλά και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, έχουν αποτελέσει μέρος της διατροφής του ανθρώπου από την αρχαιότητα. Τα νωπά μανιτάρια περιέχουν υγρασία μεταξύ 80 και 95 %, ενώ τα αποξηραμένα μανιτάρια περιέχουν κατά βάρος ~ 22% πρωτεΐνη, με τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα, ~ 5% λίπος, πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ (απαραίτητο λιπαρό οξύ που δεν συντίθεται στο ανθρώπινο σώμα), ~ 63% υδατάνθρακες συμπεριλαμβανομένων των φυτικών ινών και ~ 10% ανόργανα συστατικά ως τέφρα. Επιπλέον τα εδώδιμα μανιτάρια περιέχουν πολλά βιοδραστικά συστατικά (β-γλυκάνες, εργοστερόλη και φαινολικά συστατικά) με ποικίλα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου, και αποτελούν καλή πηγή βιταμινών, κυρίως θειαμίνης (B1), ριβοφλαβίνης (B2), νιασίνης, βιοτίνης και ασκορβικού οξέως (βιταμίνη C), ενώ είναι η μόνη μη ζωικής προέλευσης τροφή που περιέχει βιταμίνη D (εργοκαλσιφερόλη, βιταμίνη D2).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν (α) η μελέτη της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας στα βιοδραστικά συστατικά -και βιταμίνη D2- μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και (β) διατροφική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές με αποξηραμένα μανιτάρια *P.ostreatus* τα οποία είχαν παραμείνει στο σκοτάδι ή είχαν εκτεθεί σε ηλιακή ακτινοβολία, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνονται τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό των εθελοντών. Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν μακροσυστατικά (ενεργειακό περιεχόμενο, πρωτεΐνη, β-γλυκάνες, τέφρα), μικροσυστατικά (στερόλες, λιπαρά οξέα, ολικές και απλές πολυφαινόλες και βιταμίνη D₂) και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αναγωγική δύναμη). σε αποξηραμένα μανιτάρια *P. Ostreatus* που είχαν εκτεθεί σε ηλιακή ακτινοβολία επί 3 ώρες, είτε είχαν παραμείνει στο σκοτάδι. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων φάνηκε ότι η έκθεση των δειγμάτων στον ήλιο δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ενεργειακό περιεχόμενο, την τέφρα, τις β-γλυκάνες, τις ολικές φαινόλες και την αναγωγική δύναμη. Αντίθετα, η εργοστερόλη και οι μεταβολίτες της βρέθηκαν μειωμένες στα μανιτάρια που είχαν παραμείνει στον ήλιο, κάτι το αναμενόμενο εφόσον είναι γνωστό ότι η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας μετατρέπει μέρος των στερολών σε βιταμίνη D₂ και πιθανώς άλλα παράγωγα, κάτι που επιβεβαιώθηκε από τις τιμές της βιταμίνης D₂ που

ήταν αυξημένη στα δείγματα που είχαν παραμείνει στον ήλιο σε σχέση με τα υπόλοιπα (6,6mg/kg έναντι 1,5mg/kg επί ξηρού). Τέλος, ενώ οι ολικές πολυφαινόλες δεν φάνηκε να διαφέρουν σημαντικά, τα εκχυλίσματα των δειγμάτων που είχαν παραμείνει στον ήλιο έδειξαν αυξημένη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε κλινική παρέμβαση διάρκειας 6 εβδομάδων σε 11 υγιείς γυναίκες ηλικίας 18-45 ετών, κατά την οποία οι εθελόντριες κατανάλωναν κάθε ημέρα 30 gr αποξηραμένων μανιταριών που είχαν ή δεν είχαν παραμείνει στον ήλιο. Ο σχεδιασμός ήταν διπλά τυφλός και ο σκοπός ήταν να βρεθεί εάν θα υπάρξει αύξηση της βιταμίνης D2 στον ορό των εθελοντριών μετά την παρέμβαση και κατά πόσο η αύξηση αυτή θα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων βιταμίνης D στον ορό και των 2 ομάδων, αλλά τα αποτελέσματα των 2 ομάδων δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Οι πιθανές αιτίες των ευρημάτων της μελέτης συζητούνται.

Abstract

Mushrooms, thanks to their special nutritional and therapeutic properties are part of the human diet since antiquity. Fresh mushrooms contain 80 -95% water, while dry mushrooms contain on a w/w basis~ 22% protein, providing the majority of essential amino acids, ~ 5% fat, rich in linoleic acid (essential fatty acid for humans), ~ 63% carbohydrates including fiber, and ~ 10% minerals as ash. In addition, edible mushrooms contain many beneficial bioactives such as β -glucans, ergosterol, phenolic compounds and vitamins particularly thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin, biotin and ascorbic acid (vitamin C), while they are the only non-animal food that provides vitamin D (ergocalciferol, vitamin D2).

The aims of this study were (a) to examine the effect of solar radiation on bioactive constituents -including vitamin D2- of *Pleurotus ostreatus* mushrooms and (b) to test the bioavailability of mushrooms' vitamin D by a dietary intervention in healthy volunteers with dry mushrooms exposed or not exposed in solar radiation.

Dry *P. ostreatus* samples were analysed for macronutrients (energy, protein, beta-glucans, ash), micronutrients (sterols, fatty acids, total and simple polyphenols, vitamin D2) and antioxidant properties (radical scavenging capacity and reducing power). The results showed that the exposure of mushrooms to sunlight did not cause statistically significant changes in the energy content, ash, beta-glucans, total phenols and reducing power. On the contrary, sunlight exposure caused a decrement of ergosterol and its metabolites, something expected due to the known UV assisted conversion of ergosterol to vitamin D2. This was confirmed by the increased vitamin D2 content of mushrooms exposed to sunlight -6,6mg / kg dry weight compared to 1,5mg/kg of not exposed ones. While total phenolics of sunlight exposed and not exposed mushrooms did not differ significantly, the sunlight treated samples exerted increased antiradical activity.

In parallel, a 6 weeks double blind dietary intervention involving 11 healthy women aged 18-45 years, who consumed 30gr of "low" or "high" D2 mushrooms per day, was run. By the end of intervention vitamin D in volunteers' serum was increased significantly in both groups, but the increment between the two groups did not differ significantly. The findings of the study are discussed.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια είναι ετερότροφοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που κατατάσσονται στο βασίλειο των μυκήτων. Πρόσφατες εκτιμήσεις δείχνουν την ύπαρξη περίπου 5,1 εκατομμυρίων ειδών μυκήτων σε όλο τον κόσμο (Blackwell 2011). Στην ευρωπαϊκή ήπειρο υπάρχουν τουλάχιστον 75.000 είδη. Από αυτά, περισσότερα από 15.000 σχηματίζουν καρποσώματα (sporocarps) που είναι ορατά με γυμνό μάτι (Senn Irlet et al, 2007). Τα καρποσώματα αποτελούν το μορφολογικό μέρος του μύκητα που αναπτύσσεται πάνω από το έδαφος και ονομάζεται κοινώς μανιτάρι.

Παρότι υπάρχουν πάνω από 3000 εδώδιμα είδη μανιταριών, τα πιο δημοφιλή είναι τα shiitake (λεντινούλα, *Lentinus edodes*), τα αγαρικά (button mushrooms, *Agaricus bisporus*), τα πλευρώτους (oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*) και τα enoki (*Flammulina ostreatus*) (Lam&Okello 2015).

Χάρη στην ιδιαίτερη διατροφική τους αξία αλλά και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, αποτελούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου από την αρχαιότητα έως και σήμερα. Καταναλώνονται από διάφορους πολιτισμούς, όχι μόνο σαν μέρος της συνήθους διατροφής τους αλλά και σαν ένα τρόφιμο εξαιρετικά νόστιμο λόγω της ιδιαίτερης γεύσης και του αρώματός του. Σαν τροφή απευθύνονται και σε χορτοφάγους, αφού διατροφικά μοιάζουν αρκετά με τα λαχανικά. Έχουν χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο και λίπος και περιέχουν περίπου 90% νερό. Ακόμα είναι πλούσια σε πρωτεΐνη, διαιτητικές ίνες, βιταμίνες και μέταλλα (Valverde et al, 2015).

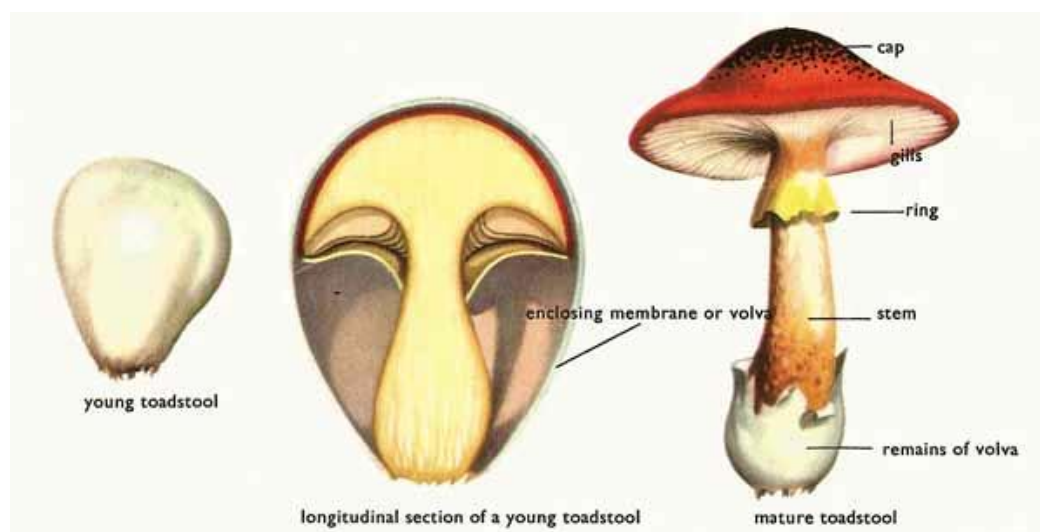
Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών που συχνά περιγράφονται ως μικρά εργοστάσια παραγωγής ενώσεων με ωφέλιμες για την υγεία δράσεις. Αυτά τα βιοδραστικά συστατικά είναι υπεύθυνα για τις ευεργετικές δράσεις που αποδίδονται στα μανιτάρια όπως αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιπερχοληστερολαιμικές, αντιφλεγμονώδεις καθώς και αντικαρκινικές. Στα μανιτάρια, έχει αναφερθεί η ύπαρξη πληθώρας βιοδραστικών

συστατικών: φαινολικά συστατικά, πολυπεπίδια, τερπένια, στεροειδή, πολυσακχαρίτες (όπως οι β-γλυκάνες) και πρωτεϊνικά σύμπλοκα των τελευταίων.

Ακόμη, αποτελούν τροφή με χαμηλή περιεκτικότητα νατρίου και πολύ υψηλής διατροφικής αξίας, αφού είναι εξαιρετική πηγή βιταμίνης Β, φυλλικού οξέος, φωσφόρου, καλίου, φυτικών ινών και πρωτεΐνης (Mattila et al, 2001, Reis et al, 2012).

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 (Kalac 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. Τα μανιτάρια τύπου «oyster» είναι συνήθως μαλακά και ποικιλοτρόπως χρωματισμένα (σκούρο μπλε, λευκό, καφέ, κίτρινο και ροζ). Η ένταση του χρώματος μπορεί να αλλάξει ανάλογα με τις αλλαγές σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, π.χ. το φως και τη θερμοκρασία. Σε γενικές γραμμές, το χρώμα είναι πιο σκούρο σε συνθήκες με περισσότερο φως και κρύο και πιο ανοιχτό σε ασθενές φως και ζεστό καιρό. Το μέγεθος μπορεί να ποικίλει από 5 έως 30 εκατοστά σε διάμετρο.

Τα βράγχια είναι υπόλευκα ή γκρι και ο μίσχος βρίσκεται συνήθως κοντά στο κέντρο του πύλου (Miles et al, 2004).

1.3 MANITAPIA *PLEUROTUS*

Τα μανιτάρια *Pleurotus* ονομάζονται γενικά “oyster mushrooms”, επειδή ο πύλος ή το καπάκι τους μοιάζει με κέλυφος στρειδιού και ο κεντρικός στύπος (stripe) συνδέεται με αυτό κάθετα ή πλαγίως (Miles&Chang 2004). Περισσότερα από 1000 είδη μανιταριών τύπου “oyster” έχουν περιγραφεί σε όλο τον κόσμο, ωστόσο μόνο τα 50 περίπου είδη από αυτά αναγνωρίζεται ότι ανήκουν στο γένος *Pleurotus* (Sharma 2014). Τα μανιτάρια αυτά αποτελούν το 30% των συνολικών εδωδιμων μανιταριών και κατέχουν την τρίτη θέση μεταξύ των ευρέως καλλιεργούμενων μανιταριών σε εύκρατα και τροπικά κλίματα σε όλο τον κόσμο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 2010 η παγκόσμια παραγωγή μανιταριών έφτασε τους 200.000 τόνους (Miles & Chang 2004).

Τα μανιτάρια του γένος *Pleurotus* καταναλώνονται ευρέως σε όλο τον κόσμο. Ένας λόγος είναι ότι η καλλιέργεια αυτών των μανιταριών είναι από τις πιο εύκολες και λιγότερο δαπανηρές ανάμεσα σε όλα τα βιομηχανικά καλλιεργούμενα εδωδιμα μανιτάρια. Ένας άλλος λόγος είναι ότι υπάρχει μια ευρεία επιλογή διαφορετικών ειδών που διατίθενται για καλλιέργεια κάτω από διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες. Είναι λοιπόν εφικτό να υπάρχει όλο το χρόνο παραγωγή μανιταριών διαφορετικών ειδών ή ποικιλιών. Τις τελευταίες δεκαετίες ο ρυθμός καλλιέργειας μανιταριών έχει αυξηθεί, ιδιαίτερα στην Ινδία, που αποτελεί μια χώρα που βασίζεται στην γεωργία ενώ επιπρόσθετα διαθέτει εύκρατο κλίμα, έδαφος πρόσφορο για καλλιέργεια αλλά και κατάλληλο ανθρώπινο δυναμικό (Miles&Chang 2004). Θεωρείται δεδομένο ότι τα μανιτάρια *Pleurotus* έχουν και θα συνεχίσουν να έχουν παγκόσμιο αντίκτυπο στη βιομηχανία μανιταριών και τελικά να συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία (Lam et al, 2015).

1.4 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ

Τα μανιτάρια έχουν από παλιά εκτιμηθεί ως μια νόστιμη και θρεπτική τροφή από πολλές κοινωνίες σε όλο τον κόσμο (Barros et al, 2008, Ferreira et al, 2009). Περιέχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας που κυμαίνεται μεταξύ 80 και 95 g / 100 g περίπου και είναι πλούσια σε πρωτεΐνη, φυτικές ίνες, βιταμίνες και μέταλλα. Κατά μέσο όρο, τα ξηρά μανιτάρια περιέχουν ~ 22% πρωτεΐνη, η οποία περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα, ~ 5% λίπος, ως επί το πλείστον με τη μορφή του λινελαϊκού οξέος (απαραίτητο λιπαρό οξύ που δεν συντίθεται στο ανθρώπινο σώμα), ~ 63% υδατάνθρακες συμπεριλαμβανομένων των ινών και ~ 10% ανόργανα στοιχεία ως τέφρα (Mattila et al, 2000). Η υψηλή διατροφική τους αξία έγκειται στο γεγονός ότι περιέχουν υψηλά ποσοτά πρωτεΐνης, φυτικών ινών, βιταμινών και μετάλλων ενώ περιέχουν πολύ χαμηλά επίπεδα λίπους (Mattila et al, 2001). Έτσι, μπορούν να καταναλωθούν πολύ εύκολα και από χορτοφάγους εφόσον προσφέρουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που έχουν ανάγκη οι ενήλικες. Επιπλέον τα μανιτάρια έχουν υψηλότερα ποσοστά πρωτεΐνης από τα περισσότερα λαχανικά, ενώ τα εδώδιμα μανιτάρια εμπεριέχουν και πολλά διαφορετικά βιοδραστικά συστατικά με ποικίλα οφέλη για τον άνθρωπο (Flegg & Maw 1997, Gruen & Wong 1982). Είναι πιθανό κάποια μανιτάρια να περιέχουν και μεταλλικά στοιχεία που υπάρχουν στο υπόστρωμα ανάπτυξης τους, συμπεριλαμβανομένων σημαντικών ποσοτήτων καλίου και μικρότερων ποσοτήτων ασβεστίου και σιδήρου.

Τα μανιτάρια αποτελούν εξαιρετική πηγή βιταμινών, κυρίως θειαμίνης (B1), ριβοφλαβίνης (B2), νιασίνης, βιοτίνης και ασκορβικού οξέως (βιταμίνη C) και είναι η μόνη μη ζωικής προέλευσης πηγή που περιέχει βιταμίνη D. Τα άγρια μανιτάρια είναι εξαιρετική πηγή βιταμίνης D₂, σε αντίθεση με τα καλλιεργούμενα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα καλλιεργούμενα μανιτάρια αναπτύσσονται συνήθως στο σκοτάδι, ενώ η UV ακτινοβολία είναι απαραίτητη για την παραγωγή βιταμίνης D₂ (Mattila et al, 2001, Guillamón et al, 2010, Mattila et al, 2002, Kalac 2013, Reis et al, 2012, Mdachi et al, 2004, Ouzouni et al, 2009, Ribeiro et al, 2009). Από εκτενείς μελέτες έχει βρεθεί ότι τα μανιτάρια συσσωρεύουν και μια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών όπως πολυφαινολικές ουσίες, πολυπεπτίδια, τερπένια, στεροειδή κ.α.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι οι συνθήκες που καλλιεργούνται τα μανιτάρια, τα χαρακτηριστικά του εδάφους, τα στάδια ανάπτυξης και οι συνθήκες με τις οποίες συλλέγονται μπορεί να επηρεάσουν την χημική σύσταση και τη διατροφική τους αξία. Επίσης, εξαιρετικές διαφορές υπάρχουν και μεταξύ των διαφόρων ειδών (Kalac 2013, Barros et al, 2012).

1.4.1. ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη επί ξηρού βάρους κυμαίνεται από 10 έως 30% και φτάνει έως και 40%.. Τα κύρια αμινοξέα είναι η λευκίνη, η βαλίνη, η γλουταμίνη, το γλουταμινικό και το ασπαραγινικό οξύ ενώ οι ποσότητες μεθειονίνης είναι πολύ περιορισμένες (Valverde et al, 2015).

Από δημοσιευμένες τιμές για την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη τεσσάρων δημοφιλών βρώσιμων μανιταριών (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp. και *Volvariella volvacea*) τα οποία καλλιεργούνται σε διάφορες χώρες, φαίνεται ότι η περιεκτικότητα των εδώδιμων μανιταριών σε πρωτεΐνη είναι, σε γενικές γραμμές, περίπου διπλάσια από αυτή των σπαραγγιών και του λάχανου, 4 φορές περισσότερη από αυτή των πορτοκαλιών και 12 φορές ψηλότερη από των μήλων. Σε ξηρό βάρος, τα μανιτάρια περιέχουν κανονικά 19 έως 35% πρωτεΐνη σε σύγκριση με το ρύζι που περιέχει 7,3%, το σιτάρι με 13,2%, τη σόγια με 39,1% και το γάλα με 25,2%. Ως εκ τούτου, σε σχέση με την περιεκτικότητα ολικής πρωτεΐνης, τα μανιτάρια κατατάσσονται χαμηλότερα από το κρέας των ζώων αλλά ψηλότερα από τα περισσότερα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος, το οποίο είναι προϊόν ζωικής προέλευσης.

Πίνακας 1: Περιεκτικότητες βασικών αμινοξέων σε διάφορα φυτικά είδη (mg/100 g νωπού προϊόντος)

Αμινοξύ	Μανιτάρια	Πατάτα	Καρότο	Κουνουπίδι
Ισολευκίνη	79-82	77	29	88
Λευκίνη	133-153	110	38	130
Λυσίνη	122-143	120	35	120
Μεθειονίνη	29-35	29	9	31
Κυστεΐνη	23-28	17	1	15
Φαινυλαλανίνη	91-111	84	26	84
Τυροσίνη	219-292	40	14	52
Θρεονίνη	98-111	71	26	84
Βαλίνη	112-124	120	43	140

Οι πρωτεΐνες σε κοινώς καλλιεργούμενα μανιτάρια περιέχουν και τα εννέα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο (Πίνακας 2). Για όλα τα μανιτάρια που απαριθμούνται στον Πίνακα, το πιο άφθονο απαραίτητο αμινοξύ είναι η λυσίνη, και τα χαμηλότερα επίπεδα μεταξύ των απαραίτητων αμινοξέων είναι εκείνα της τρυπτοφάνης και της μεθειονίνης.

Πίνακας 2 : Σύσταση εδώδιμων μανιταριών σε απαραίτητα αμινοξέα.

Αμινοξέα	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Pleurotus florida</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Volvariella diplasia</i>	<i>Volvariella volvacea</i>
Λευκίνη	7.5	7.9	7.5	6.8	7.0	5.0	4.5
Ισολευκίνη	4.5	4.9	5.2	4.2	4.4	7.8	3.4
Βαλίνη	2.5	3.7	6.9	5.1	5.3	9.7	5.4
Τρυπτοφάνη	2.0	Nd	1.1	1.3	1.2	1.5	1.5
Λυσίνη	9.1	3.9	9.9	4.5	5.7	6.1	7.1
Θρεονίνη	5.5	5.9	6.1	4.6	5.0	6.0	3.5

Φαινιλαλανίνη	4.2	5.9	3.5	3.7	5.0	7.0	2.6
Μεθειονίνη	0.9	1.9	3.0	1.5	1.8	1.2	1.1
Ιστιδίνη	2.7	1.9	2.8	1.7	2.2	4.2	3.8
Συνολικά απαραίτητα αμινοξέα	38.9	36.0	46.0	33.4	37.6	48.5	32.9

1.4.2 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΚΑΙ β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε υδατάνθρακες, κυρίως ως πολυσακχαρίτες ή γλυκοπρωτεΐνες, κυμαίνεται μεταξύ 50-90%, με πιο άφθονους τους πολυσακχαρίτες όπως χιτίνη, α- και β-γλυκάνες και ημικυτταρίνες (π.χ. μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες) (Manzi & Pizzoferrato 2000). Το γένος *Pleurotus* έχει εξαιρετικά υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, -περίπου 57%-, και ακατέργαστες ίνες – περί το 14% , με το 47% αυτών να αποτελείται από διαιτητικές ίνες (Miles et al, 2004.)

Οι πολυσακχαρίτες στα μανιτάρια βρίσκονται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκανών με διαφορετικούς τύπους γλυκοζιτικών δεσμών, όπως διακλαδισμένες (1 → 3), (1 → 6) -β-γλυκάνες και γραμμικές (1 → 3) -α-γλυκάνες (Wasser 2002). Τα μανιτάρια είναι επομένως μια καλή πηγή διαιτητικών ινών (DF), λόγω της παρουσίας των εν λόγω μη αμυλούχων πολυσακχαριτών. Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με το συνολικό περιεχόμενο διαιτητικών ινών (TDF) και τη σύστασή τους στα εδώδιμα μανιτάρια. Οι φυτικές ίνες κατατάσσονται σε διαλυτές και αδιάλυτες και η διαλυτότητά τους στο νερό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μοριακή δομή τους και τη διαμόρφωση. Οι αδιάλυτες φυτικές ίνες στα μανιτάρια βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα (2,28 έως 8,99 g / 100 g ξηρού βάρους) από τις διαλυτές (0,32 έως 2,20 g / 100 g ξηρού βάρους) (Manzi & Pizzoferrato 2000, Manzi et al, 2001). Οι β-γλυκάνες αντιπροσωπεύουν το 4% έως 13% των συνολικών διαιτητικών ινών ανάλογα με το είδος του μανιταριού.

Οι φυτικές ίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης πολλών διαταραχών, όπως δυσκοιλιότητας, διαβήτη, καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD) και παχυσαρκίας. Οι ίδιες ή ακόμα και σύμπλοκά τους με πρωτεΐνες και

άλλους πολυσακχαρίτες μπορούν να απομονωθούν ως βιοδραστικά συστατικά, με πολύ ενδιαφέρουσες προοπτικές για χρησιμοποίησή τους στην παρασκευή νέων λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής (Manzi & Pizzoferrato 2000).

➤ **β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ**

Οι β-γλυκάνες είναι ευρέως διαδεδομένες στην φύση και βρίσκονται κυρίως στα φύκη, την μαγιά και στους μύκητες όπως είναι τα μανιτάρια. Ρόλος τους είναι να εξυπηρετούν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Αποτελούν μέρος των δομικών συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων, λειτουργούν σαν αποθηκευτική μορφή υδατανθράκων και κάποιες φορές δρουν προστατευτικά σε συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα (Chihara et al, 1970). Δομικά, οι β-γλυκάνες αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών που ενώνονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς και μπορεί να διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος, την διαλυτότητα και την διάταξή τους στον χώρο. Η βιοδραστικότητά τους εξαρτάται από τα παραπάνω χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα αυξάνεται με αύξηση του μοριακού τους βάρους. Το περιεχόμενο των μανιταριών σε β-γλυκάνες κυμαίνεται από 0,21g- 0,53 g/100g ξηρού βάρους. Στις υδατοδιαλυτές β-γλυκάνες ποσοστιαία ανήκει το 16-46% ενώ στις μη υδατοδιαλυτές ανήκει το 54-82% (Stachowiak et al, 2012).

Οι θεραπευτικές ιδιότητες πολλών ειδών μανιταριών έχουν αξιολογηθεί και χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για πολλούς αιώνες έως και σήμερα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι β-γλυκάνες των μανιταριών δρουν θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα και έχουν πιθανή αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, μέσω της συμμετοχής τους στον μεταβολισμό των λιπιδίων μπορούν να προκαλέσουν μείωση της χοληστερόλης και καλύτερο έλεγχο του βάρους (Ropetal, 2009). Έτσι, οι β-γλυκάνες μπορούν να αποτελέσουν ένα ισχυρό εργαλείο στην προσπάθεια μείωσης της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά επεισόδια που συμβαίνει με όλο και ταχύτερους ρυθμούς τις τελευταίες δεκαετίες.

1.4.3 ΛΙΠΟΕΙΔΗ

Γενικά, το περιεχόμενο των λιπιδίων τωνμανιταριών είναι χαμηλό. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια ανά 100 g αποξηραμένωνμανιταριών κυμαίνεται από 1,75 έως 15,5% (Hong et al, 1988). Σε αυτό περιλαμβάνονται όλες οι τάξεις των λιποειδών συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων λιπαρών οξέων, μονο- δι- και τριακυλογλυκερολών, στερολών και των εστέρων τους καθώς και φωσφολιποειδών (Chang and Miles 2004).

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). Πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη σύσταση των λιπαρών οξέων από διάφορα μανιτάρια και διευκρινίσθηκε ο ρόλος τους στην ανθρώπινη διατροφή (Wang et al, 2001). Η ομάδα των Barros et al. ανέφερε το λινελαϊκό οξύ και το ελαϊκό οξύ ως τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα στα *Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* και *Tricholoma portentosum*.

Παρά το γεγονός ότι πολλά άγρια μανιτάρια έχουν χρησιμοποιηθεί για ιατρικούς σκοπούς, λόγω των χρήσιμων συστατικών τους και της βιοδραστητικότητάς τους, πολλοί καταναλωτές δεν ήταν σε θέση να καταναλώσουν αυτά τα μανιτάρια, λόγω της σχετικής σπανιότητάς τους. Πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη τεχνικών μεθόδων καλλιέργειας με διαφορετικά υλικά υποστρώματος και συνθήκες ανάπτυξης ώστε να μπορέσουν να βελτιώσουν την εμπορική αξία αυτών των άγριων μανιταριών (Zacharia & Doshi 2004).

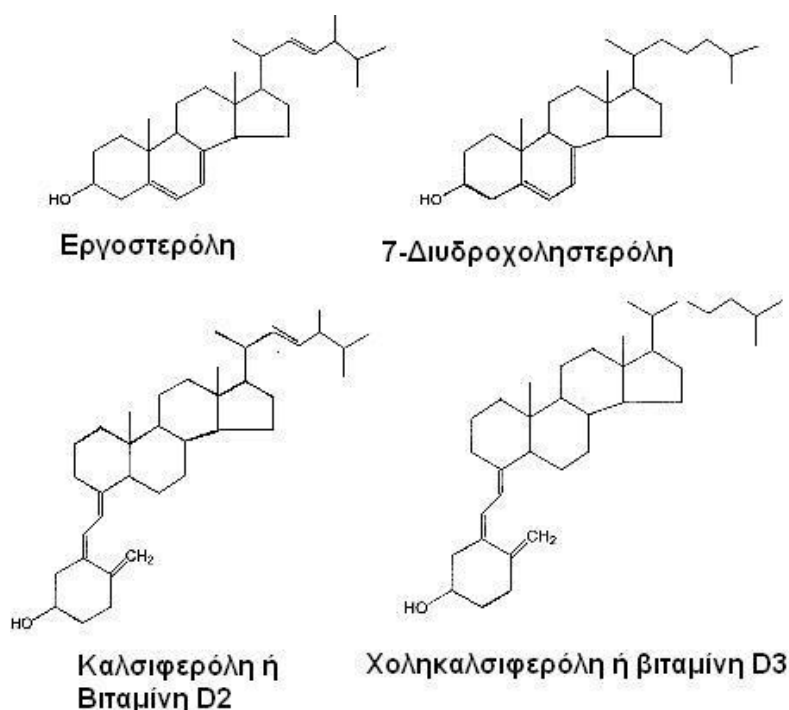
1.4.4 ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι στερόλες είναι απαραίτητο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και διακρίνονται στις ζωικές, με κύριο εκπρόσωπο τη χοληστερόλη που απαντάται αποκλειστικά στα ζώα και στις φυτοστερόλες, οι οποίες συναντώνται στα φυτά. Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 40 είδη στερολών.

Η κύρια στερόλη των μυκήτων είναι η εργοστερόλη (5,7,22-εργοστατριεν-3β-όλη. Εκτός από την εργοστερόλη, στους μύκητες ανιχνεύονται και οι μεταβολίτες της εργοστα-7,22-διενόλη (ergosta-7,22-dienol), εργοστα-5,7-διενόλη (ergosta-5,7-dienol) και εργοστα-7-ενόλη (ergosta-7-enol). Ωστόσο, η εργοστερόλη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, αποτελώντας μέχρι και το 90% του συνολικού στερολικού περιεχομένου. 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 D (Barreira et al, 2014, Senatore et al, 1988).

1.4.5 ΕΡΓΟΣΤΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D

Η βιταμίνη D γνωστή και ως «βιταμίνη του ήλιου» παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό του ασβεστίου και είναι απαραίτητη για την πρόληψη ασθενειών όπως ο ραχιτισμός στα παιδιά και η οστεομαλάκυνση στους ενήλικες. Η βιταμίνη D είναι η γενική ονομασία μιας ομάδας βιταμινών με παρόμοια βιολογική δράση με την χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃), όπως είναι η εργοκαλσιφερόλη (D₂) που είναι η μορφή της βιταμίνης D που συντίθεται με την επίδραση της UV ακτινοβολίας.



Η βιταμίνη D υπάρχει σε προϊόντα ζωικής προέλευσης όπως τα ιχθυέλαια, τα ψάρια, τα αυγά, η μαργαρίνη, το βούτυρο, το τυρί και το γάλα. Οι αυστηρά χορτοφάγοι που δεν καταναλώνουν ούτε γάλα, κινδυνεύουν να εμφανίσουν έλλειψη της βιταμίνης D.

Ο ρόλος της βιταμίνης D για την υγεία των οστών είναι πλέον γνωστός. Τελευταίες μελέτες όμως έχουν επικεντρώσει την προσοχή στους μηχανισμούς με τους οποίους η ίδια συμβάλει στο ανοσοποιητικό σύστημα και μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά για πολλές ασθένειες, ακόμα και για τον καρκίνο (Phillips & Rasor 2013).

Η βιταμίνη D₃ ή χοληκαλσιφερόλη μπορεί να παραχθεί ενδογενώς με την επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας του ήλιου από την 7-δεϋδροχοληστερόλη που υπάρχει στην επιφάνεια του δέρματος. Υπάρχει όμως μεγάλος αριθμός ατόμων που δεν συνθέτουν επαρκή ποσότητα βιταμίνης D₃ λόγω περιορισμένου χρόνου έκθεσης στον ήλιο (Holick 2013, Freedman et al, 2013, Holick 2007). Επιπλέον, η χρήση αντιηλιακών, η χαμηλή πρόσληψη τροφίμων ή/και διατροφικών συμπληρωμάτων πλούσιων σε βιταμίνη D καθώς και η ελάττωση της δυνατότητας σύνθεσης της ενεργής μορφής της βιταμίνης D λόγω ηλικίας, συμβάλλουν στην ύπαρξη επιπέδων χαμηλότερων του φυσιολογικού στον ανθρώπινο οργανισμό (Holick 2013). Η συγκέντρωση της 25-OH-D (καλσιδιόλης) στον ορό του αίματος του ανθρώπου αποτελεί τον δείκτη που καθορίζει τα επίπεδα της βιταμίνης D στον οργανισμό. Εκτιμάται ότι το 30-50% του πληθυσμού της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών έχουν ανεπαρκή επίπεδα βιταμίνης D.

Η βιταμίνη D με τη μορφή της D₂ χρησιμοποιείται σε πολλά συμπληρώματα διατροφής και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Στην φύση, τα άγρια μανιτάρια περιέχουν μικρή ποσότητα βιταμίνης D₂. Δεδομένου ότι τα μανιτάρια αποτελούν πλούσια πηγή εργοστερόλης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην διατροφή χορτοφάγων και μη, σαν πηγή βιταμίνης D₂, εφόσον η εργοστερόλη θα μπορούσε να μετατραπεί σε βιταμίνη D (Jashinghe et al, 2005).

1.4.6 BITAMINEΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ

Έχει αναφερθεί ότι τα βρώσιμα μανιτάρια είναι καλή πηγή για αρκετές βιταμίνες όπως οι θειαμίνη (βιταμίνη B1), ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2), νιασίνη, βιοτίνη και ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Η συνήθης περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ είναι 150–300 mg kg⁻¹. Η περιεκτικότητα στο είδος *Agaricus spp.* φαίνεται να είναι χαμηλότερη, ενώ στα δημοφιλή *Boletus edulis* and *Cantharellus cibarius* αναφέρονται μεγαλύτερες τιμές.

Όσο αφορά το σύμπλεγμα των βιταμινών B, οι Caglarirmak et al. (2011) ανέφεραν συγκεντρώσεις ίσες με 1.7–6.3, 2.6–9.0, 1.4–5.6 και 63.8–83.7 mg kg⁻¹ θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, πυριδοξίνης και νιασίνης αντίστοιχα. Αρκετά υψηλότερες τιμές βρέθηκαν για την νιασίνη (29.2 mg kg⁻¹ ξηρού βάρους) και την ριβοφλαβίνη (33.2 mg kg⁻¹ ξηρού βάρους) σε φρέσκα μανιτάρια *B. Edulis*, οι οποίες μειώθηκαν αρκετά μετά από μούλιασμα σε νερό ή θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες (Jaworska et al, 2009). Σε επτά είδη καλλιεργούμενων μανιταριών τα συνολικά φυλλικά κυμαίνονταν μεταξύ 124 και 442 μg kg⁻¹ νωπού βάρους με οριακές τιμές στα γένη *L. Edodes* και *P. Ostreatus* (Phillips et al, 2011).

Η συνήθης περιεκτικότητα σε ολικές τοκοφερόλες είναι 0,5-3 mg kg⁻¹ ξηρού βάρους, σημαντικά χαμηλότερη από ότι στα λαχανικά. Αρκετά είδη έχουν υψηλότερες περιεκτικότητες (*Reticulatus Boletus* και *Suillus variegatus*), αλλά γενικά τα καλλιεργούμενα είδη φαίνεται να έχουν χαμηλότερα ποσοστά γ-τοκοφερόλης από τα άγρια μανιτάρια (Pereira et al, 2012, Vaz et al, 2011, Heleno et al, 2011, Grangeia et al, 2011, Reis et al, 2011).

Το β-καροτένιο, η πλέον ισχυρή προβιταμίνη A, έχει μικρότερη αφθονία στα μανιτάρια σε σχέση με τα φυτά. Οι συγκεντρώσεις του είναι χαμηλές και κυμαίνονται από μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μέχρι 6 mg kg⁻¹ ξηρού βάρους (Pereira et al, 2012).

Αυξημένη προσοχή έχει επικεντρωθεί στην εργοστερόλη, την προβιταμίνη της εργοκαλσιφερόλης (βιταμίνη D2). Πρόσφατα στοιχεία αναφέρουν περιεκτικότητες 3000-7000 mg kg⁻¹ σε ξηρά μανιτάρια (Kalac 2009, Mattila et al, 2002, Phillips et al, 2011). Η εργοστερόλη σε διάφορα είδη μανιταριών κυμαίνεται μεταξύ 640 και 1770 mg kg⁻¹ ξηρού βάρους. Ένα σχετικά υψηλό περιεχόμενο εργοστερόλης θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική πηγή για άτομα με περιορισμένη πρόσληψη

χοληκαλσιφερόλης από τρόφιμα ζωικής προέλευσης, π.χ. για vegans και χορτοφάγους.

Επιπλέον, τα μανιτάρια αποτελούν και πολύ καλή πηγή ιχνοστοιχείων . τα οποία υπάρχουν στο υπόστρωμα, προσλαμβάνονται από το μυκήλιο του μανιταριού και μεταφέρονται προς το καρπόσωμα. Όπως και στα ανώτερα φυτά, το στοιχείο που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση είναι το κάλιο (K) και ακολουθούν ο φώσφορος (P), το νάτριο (Na), το ασβέστιο (Ca), και το μαγνήσιο (Mg). Αυτά θεωρούνται ότι είναι τα σημαντικότερα ανόργανα συστατικά. Υπολογίζεται ότι η συγκέντρωση του K, P, Na, Ca, Mg αποτελεί περίπου το 56 έως 70% της συνολικής τέφρας με το K να αντιπροσωπεύει σχεδόν το 45%. Το Na και Ca είναι παρόντα σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις σε όλα τα μανιτάρια εκτός των *L. edodes* στα οποία το Ca υπερσχύει.

Στοιχείο	g/kg ξηρού βάρους
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

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 ορισμένα μανιτάρια δρουν ως βιοσυσσωρευτές. Έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διακυμάνσεις σε μετρήσεις που αναφέρονται σε είδη που καλλιεργούνται σε μη ρυπασμένες ή σε ρυπασμένες περιοχές καθώς και σε δρόμους με μεγάλη κίνηση ή μέσα σε πόλεις. Το κάδμιο και ο υδράργυρος είναι στοιχεία με υψηλή βιοσυσσώρευση από υποστρώματα σε πολυάριθμα είδη μανιταριών. Παρ 'όλα αυτά, η σχέση μεταξύ της ρύπανσης του εδάφους με τοξικά ιχνοστοιχεία και τα επίπεδά τους στο καρπόσωμα των μανιταριών δεν είναι τόσο στενή που να επιτρέψει τη χρήση ενός είδους μανιταριού ως αξιόπιστου δείκτη τοπικής ρύπανσης.

1.4.7 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια είναι πλούσια πηγή δευτερογενών μεταβολιτών με αξιόλογες βιοδραστικότητες και παρουσιάζουν ένα πολύ ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένων αντιμυκητιακών, αντιφλεγμονωδών, χημειοπροστατευτικών, αντιικών, αντιβακτηριακών, αντιπαρασιτικών, ανοσορρυθμιστικών και ηπατοπροστατευτικών (Kim et al, 2012, Benedict&Brady 1972, Iwalokun et al, 2007). Πολλά εκχυλίσματα έχουν ευρεία χρήση στην Ιαπωνία, την Κορέα και την Κίνα, ως εν δυνάμει επικουρικά σε ακτινοθεραπείες και χημειοθεραπείες (Sullivan et al, 2006, Borchers et al, 2008). Τόσο τα καρποσώματα όσο και τα μυκήλια διαφόρων μανιταριών περιέχουν ενώσεις όπως τερπενοειδή, στεροειδή, πολυφαινόλες, , αλκαλοειδή, πολυσακχαρίτες και διαιτητικές ίνες που ασκούν διάφορες φαρμακολογικές και αντιοξειδωτικές δράσεις (Breene 1990, Akyuz & Kirbag 2009).

Οι φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα τα φαινολικά οξέα, είναι τα κύρια αντιοξειδωτικά που συναντάμε στα μανιτάρια. Τα φαινολικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες: τα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκιναμωμικά. 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 (Kalac 2009). Τα φαινολικά οξέα συνήθως δεσμεύονται σε διάφορες πολύπλοκες δομές. Το περιεχόμενο των συνολικών φαινολικών οξέων ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ 4-80 mg/kg ξηρού βάρους και φαίνεται πως το *p*-υδροξυβενζοϊκό αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο φαινολικό οξύ. Σημαντικό να αναφέρουμε ότι η αντιοξειδωτική αξία των μανιταριών είναι συγκρίσιμη με αυτή των λαχανικών.

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση διαφόρων ασθενειών, όπως ισχαιμία, αρτηριοσκλήρωση, διαβήτη, αρθρίτιδα, φλεγμονή και καρκίνο, καθώς και για τη διαδικασία της γήρανσης (Kim et al, 2012, Valko et al, 2007, Gutteridge 1993). Λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, τα αντιοξειδωτικά των μανιταριών θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην πρόληψη των ασθενειών αυτών (Halliwell 2012). Τα μυκήλια πολλών καλλιεργούμενων ειδών

φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για την απομόνωση αντιοξειδωτικών και τη χρήση τους ως λειτουργικών προϊόντων διατροφής.

1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΕ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Όπως αναφέρθηκε, η κύρια στερόλη που υπάρχει στα μανιτάρια είναι η εργοστερόλη. Με τη επίδραση UV-ακτινοβολίας η εργοστερόλη μπορεί να μετατραπεί σε εργοκαλσιφερόλη (D_2) μέσω της φωτόλυσης στην οποία υπόκειται και τελικά να παραχθεί μέσω της 7-δεϋδροχοληστερόλης, η ενεργή μορφή της βιταμίνης D (1,25 διϋδροξυ-βιταμίνη D_2) με αυθόρμητη αναδιάταξη (Teichmann et al, 2007). Η ποσότητα εργοστερόλης που υπάρχει στα μανιτάρια υπολογίζεται σε χιλιοστογραμμάρια, αλλά αν υποθέσουμε ότι ακόμα και μερικά μικρογραμμάρια βιταμίνης D_2 έχουν δραστηριότητα ($1\mu\text{g} = 40\text{ IU}$), η μετατροπή ενός σχετικά μικρού ποσού εργοστερόλης σε βιταμίνη D_2 έχει ως διατροφικό αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της βιταμίνης D. Όλα τα μανιτάρια περιέχουν εργοστερόλη αλλά η συγκέντρωση της βιταμίνης D_2 ποικίλλει.

Ανεπάρκεια βιταμίνης D, που ορίζεται ως συγκέντρωση 25- (OH)- D χαμηλότερη από 50 nmol / L , επικρατεί σχεδόν στο ήμισυ του πληθυσμού και λιγότερο από το ένα τέταρτο των ενηλίκων φτάνει σε επίπεδα που θεωρούνται επαρκή (δηλαδή άνω των 75 nmol / L). Ακόμη και κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών, τα περισσότερα άτομα δεν φτάνουν σε ικανοποιητικά επίπεδα 25- (OH)-D. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ημερήσιες προσλήψεις σε μg βιταμίνης D που απαιτούνται για να διατηρήσουν επαρκή επίπεδα βιταμίνης D στους ηλικιωμένους κυμαίνονται μεταξύ 7,9 και 42,8 (18). Επιπλέον, το Ινστιτούτο Ιατρικής των ΗΠΑ αύξησε πρόσφατα το RDA για τη βιταμίνη D σε $15\text{ }\mu\text{g / d}$ (600 IU). Δεδομένου ότι οι συνήθεις διαιτητικές πηγές είναι φτωχές σε βιταμίνη D, με τιμές που τυπικά κυμαίνονται από 0,1 έως $16,1\text{ }\mu\text{g / 100 g}$ για το πλήρες γάλα και τα ιχθυέλαια, αντίστοιχα, η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης D είναι χαμηλότερη από $15\text{ }\mu\text{g}$ ημερησίως στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, με την υψηλότερη μέση ημερήσια πρόσληψη (περίπου $10\text{ }\mu\text{g/ημέρα}$) στις Σκανδιναβικές χώρες. Στην Ιρλανδία, το 72% των ανδρών και το 78% των γυναικών είχαν μέση ημερήσια πρόσληψη της βιταμίνης D λιγότερο από $5\text{ }\mu\text{g / ημέρα}$ και πάνω από το 90% του πληθυσμού μικρότερη από $10\text{ }\mu\text{g}$ ημερησίως (Stepien et al, 2013).

Τα τελευταία χρόνια, σε μια προσπάθεια για την καταπολέμηση της χαμηλής διαιτητικής πρόσληψης της βιταμίνης D, η προσοχή έχει στραφεί στην παραγωγή τροφίμων ενισχυμένων σε βιταμίνη D.

Σκοπός

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας σε βιοδραστικά συστατικά και βιταμίνη D σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus* και στη συνέχεια να γίνει διατροφική παρέμβαση με αποξηραμένα μανιτάρια διαφορετικής περιεκτικότητας σε βιταμίνη D₂, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυξάνονται τα επίπεδα της βιταμίνης στον ορό των εθελοντών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα μανιτάρια στα οποία έγιναν οι αναλύσεις των μακροσυστατικών και μικροσυστατικών ανήκουν στο είδος *Pleurotus ostreatus*. Τα δείγματα ήταν σε μορφή αποξηραμένης σκόνης, σε αεροστεγώς κλεισμένα σακουλάκια, μακριά από την επίδραση του φωτός. Αναλύθηκαν δύο είδη δειγμάτων: (α) Μανιτάρια που πριν ξηρανθούν είχαν εκτεθεί σε ηλιακή ακτινοβολία επί 3 ώρες και κωδικοποιούνται με S και (β) μανιτάρια που παρέμειναν στο σκοτάδι πριν και μετά την ξήρανση και κωδικοποιούνται με D. Τα S και D μανιτάρια καλλιεργήθηκαν, συλλέχθηκαν, ξηράνθηκαν σε ρεύμα θερμού αέρα, κονιοποιήθηκαν και συσκευάστηκαν σε αεροστεγείς συσκευασίες από την εταιρία «Μανιτάρια Δίρφυς» που μας τα προσέφερε για την παρούσα μελέτη. Τα μανιτάρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε κλινική παρέμβαση διάρκειας 6 εβδομάδων σε 11 υγιείς γυναίκες ηλικίας 18-45 ετών. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης κάθε εθελόντρια κατανάλωνε κάθε ημέρα 30 gr αποξηραμένων D ή S μανιταριών. Ο σχεδιασμός ήταν διπλά τυφλός και ο σκοπός ήταν να βρεθεί εάν θα υπάρξει αύξηση της βιταμίνης D στον ορό των εθελοντριών μετά την παρέμβαση και κατά πόσο η αύξηση αυτή θα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης.

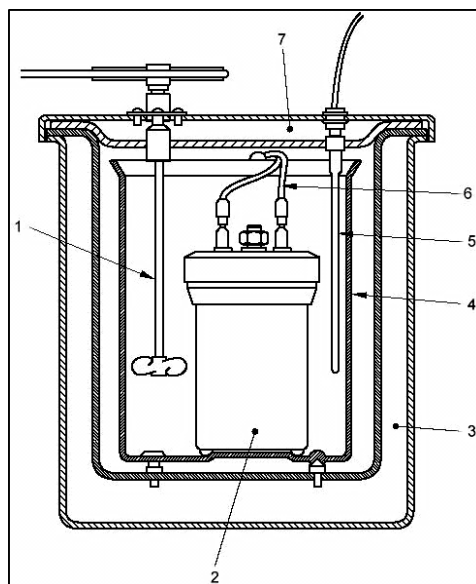
2.1 Εκτίμηση θερμιδικής αξίας τροφίμων

Ο προσδιορισμός της θερμιδικής αξίας των τροφίμων μπορεί να είναι (α) άμεσος ή (β) έμμεσος

(α) Άμεσος προσδιορισμός της θερμιδικής αξίας των τροφίμων.

Η θερμιδική αξία των τροφίμων είναι δυνατό να μετρηθεί με άμεσο τρόπο από την θερμότητα που εκλύεται κατά την πλήρη καύση ζυγισμένης ποσότητάς τους σε ένα θερμιδόμετρο τύπου οβίδας (Bomb Calorimeter, Σχ. 1). Η καύση του δείγματος γίνεται σε ατσάλινη οβίδα (Σχ.1 2) και η θερμότητα που εκλύεται θερμαίνει ένα εξωτερικό δοχείο (Σχ.1, 4) που περιέχει γνωστή ποσότητα νερού και αναδευτήρα (Σχ.1, 1) και περιβάλλεται από καλή μόνωση ώστε να μην είναι δυνατή η απώλεια θερμότητας προς το εξωτερικό περιβάλλον. Η αύξηση της θερμοκρασίας του εξωτερικού δοχείου καταγράφεται με θερμόμετρο (Σχ.1, 5). Από την αύξηση της θερμοκρασίας υπολογίζεται το θερμιδικό περιεχόμενο του δείγματος που κάηκε. Η βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με καύση καθαρής πρότυπης ουσίας αναφοράς, συνήθως βενζοϊκού οξέος.

Ο παραπάνω τρόπος επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό της θερμιδικής αξίας των μανιταριών *Pleurotus* που αναλύσαμε.



Σχήμα 1. Θερμιδόμετρο καύσης.

1. αναδευτήρας, 2. οβίδα καύσης,
3. μόνωση, 4. εξωτερικό δοχείο,

(β) Τυπολόγιο -Υπολογισμοί

Διατήρηση ενέργειας: $Q \text{ απώλεια} + Q \text{ κέρδος} = 0$ (1)

Στην καύση: $Q_{\text{καύσης}} = Q_{\text{κέρδος θερμιδομέτρου}}$ (2)

ή $Q_C + Q_F = Q_\Theta$ (3)

όπου Q_C = θερμότητα καύσης δείγματος (τρόφιμο κλπ) και

Q_F = θερμότητα που αποδίδουν βοηθητικά καύσης.

Ο τύπος (3) αναλύεται ως εξής:

$$\boxed{H_o \times m_p + Q_F = \Theta_\Theta \times \Delta T} \quad (5)$$

όπου H_o = ενεργειακό περιεχόμενο (θερμιδική αξία δείγματος) (τρόφιμο κλπ)

m_p = βάρος δείγματος (g)

Q_F = ($n \times Q_{\text{νήματος}} + Q_{\text{σύρματος}}$) (J) (βοηθητικά μέσα καύσης δείγματος)

Θ_Θ = σταθερά θερμιδομέτρου (J/°K)

ΔT = η αύξηση θερμοκρασίας του εξωτερικού δοχείου νερού

Ο τύπος (5) είναι ο βασικός για προσδιορισμό (α) της σταθεράς του θερμιδομέτρου και (β) του ενεργειακού περιεχομένου των δειγμάτων.

(β.1) Προσδιορισμός Σταθεράς Θερμιδομέτρου Θ_Θ

Προσδιορίζεται πειραματικά κάθε φορά που πραγματοποιούμε μέτρηση. Για τον προσδιορισμό μετράμε τις εκλυόμενες θερμότητες από γνωστή ποσότητα πρότυπης ουσίας της οποίας η θερμότητα καύσης είναι γνωστή με μεγάλη ακρίβεια. Ως πρότυπο στη θερμιδομετρία χρησιμοποιούμε καθαρό βενζοϊκό οξύ, το οποίο καίγεται εντελώς (οργανική ένωση), είναι σταθερό, κρυσταλλικό, μη πτητικό.

Με γνωστά τα m_p , H_o και μετρώντας το ΔT με το θερμιδόμετρο, προσδιορίζουμε το Θ_Θ από την εξίσωση:

$$\boxed{\Theta_\Theta = [26452 \times m_p + (n \times 50 + 30)] / \Delta T} \quad (6)$$

(β.2) Προσδιορισμός Ενεργειακού Περιεχομένου Τροφίμου (H_o)

Για προσδιορισμό σε δείγμα τροφίμου, το τρόφιμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο υγρασίας (αφυδατωμένο) και σε μορφή δισκίου (pellet). Με γνωστά τα m_p , Θ_θ και μετρώντας το ΔT με το θερμιδόμετρο, προσδιορίζουμε το H_o από την εξίσωση:

$$H_o = [\Theta_\theta \times \Delta T - (n \times 50 + 30)] / m_p \quad (7)$$

2.2 Προσδιορισμός αζώτου κατά KJELDAHL

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα κύρια αζωτούχα συστατικά των τροφίμων, όπου κατά περίπτωση απαντούν και άλλες αζωτούχες οργανικές ενώσεις, όπως προϊόντα αποικοδόμησης και μεταβολισμού των πρωτεϊνών, κυρίως πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα, αμίνες, νουκλεϊνικά οξέα, νουκλεοτίδια, ετεροκυκλικά πτητικά αζωτούχα παράγωγα (πυραζινικά, πυριδινικά, πυρραζολικά κ.ά.), παράγωγα της γουανιδίνης (κρεατίνη και κρεατινίνη) και μεθυλιωμένα παράγωγα της ξανθίνης. Οι πρωτεΐνες μπορούν να προσδιορισθούν στα τρόφιμα με τη βοήθεια χρωματομετρικών, φασματοφωτομετρικών και ηλεκτροφορητικών μεθόδων. Ωστόσο για την μέτρηση της περιεκτικότητας των τροφίμων σε αζωτούχες οργανικές ενώσεις, που σχεδόν στο σύνολό τους είναι πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται μέθοδοι προσδιορισμού του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου (μέθοδοι Dumas και Kjeldahl).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου (N%) κατά Kjeldahl, από τη συγκέντρωση του οποίου υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες με τη βοήθεια της σχέσης: Πρωτεΐνη % = N% $\times$ 6,25, όπου 6,25 είναι γενικός συντελεστής μετατροπής του οργανικού αζώτου των τροφίμων σε πρωτεΐνες. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ειδικές συσκευές καύσης και απόσταξης της εταιρίας Gerhardt, η πρώτη αποτελούμενη από μονάδα καύσης και πλυντρίδα Turbosog Scrubber, αναγκαία για τη δέσμευση και εξουδετέρωση των τοξικών αερίων που σχηματίζονται κατά την υγρή καύση των δειγμάτων. Ακόμη χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί γυάλινοι σωλήνες καύσης και αντιδραστήρια ελεύθερα αζώτου. Η ποσότητα

του δείγματος επιλέχθηκε με κριτήριο την εκτιμώμενη περιεκτικότητα των επιμέρους αφυδατωμένων δειγμάτων σε οργανικό άζωτο, που πρέπει να κυμαίνεται από 20 μέχρι 40 mg.

Αρχή μεθόδου:

Προξυγισμένη ποσότητα αφυδατωμένου δείγματος *Pleurotus* μεταφέρεται σε σωλήνα καύσης. Η οργανική ύλη οξειδώνεται με πυκνό & θερμό θειικό οξύ παρουσία καταλύτη (CuSO_4), και το άζωτο (εκτός από αυτό των νιτρικών) μετατρέπεται ποσοτικά σε αμμωνία και αυτή σε θειικό αμμώνιο.

Με προσθήκη περίσσειας NaOH , το θειικό αμμώνιο διασπάται και παράγεται αμμωνία, η οποία αποστάζει με υδρατμούς, συμπυκνώνεται με ψύξη και διαβιβάζεται σε πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,5N) όπου δεσμεύεται με την μορφή χλωριούχου αμμωνίου. Ακολουθεί οπισθογκομέτρηση της περίσσειας HCl με πρότυπο διάλυμα NaOH (0,5N) με δείκτη ερυθρό του μεθυλίου. Από τον όγκο του προτύπου διαλύματος NaOH που καταναλώθηκε υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε οργανικό άζωτο ($\text{N}\%$) υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{N (\% d.w.)} = [(V - \alpha) \times 0,7] / W(\text{g}),$$

όπου $V = 25 \text{ mL}$ (όγκος του HCl 0.5N στην κωνική), $\alpha = \text{mL NaOH } 0.5\text{N}$ που καταναλώθηκαν κατά την οπισθογκομέτρηση και W το βάρος του δείγματος σε g.

Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Pr (\% d.w.)} = \text{N} \times C,$$

όπου $C = 6,25$ είναι ο γενικός συντελεστής μετατροπής σε πρωτεΐνες του οργανικού αζώτου των τροφίμων (για τα μανιτάρια χρησιμοποιούμε επίσης τον συντελεστή $C = 4,38$).

2.3 Υπολογισμός τέφρας με αποτέφρωση

Ως τέφρα τροφίμου ορίζεται το υπόλειμμα από ανόργανα συστατικά, που παραμένει μετά την θέρμανση του δείγματος γύρω στους 500°C που έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη καύση των οργανικών συστατικών (λίπη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες, οργανικά οξέα, κ.λ.π.). Το υπόλειμμα θεωρείται ότι αποτελεί το μέτρο των ανόργανων συστατικών του τροφίμου (mineral content).

Εργαστηριακό μέρος:

- Ζυγίζεται ποσότητα αφυδατωμένου και κονιοποιημένου μανιταριού μέσα σε κάψα πορσελάνης, η οποία έχει προηγουμένως καθαριστεί, πυρακτωθεί και ζυγιστεί.
- Η κάψα με το τρόφιμο θερμαίνεται σε προγραμματιζόμενο εκτεφρωτή, αρχικά ήπια και στη συνέχεια έντονα στους 500-550 °C μέχρι να γίνει αποτέφρωση.

Το % ποσοστό της ολικής τέφρας στο δείγμα του τροφίμου δίνεται από τη σχέση:

$$\% \text{ ολική τέφρα} = \frac{\text{Βάρος τέφρας}}{\text{Βάρος δείγματος}} \times 100 = \frac{w_3 - w_1}{w_2 - w_1} \times 100$$

Όπου: w_1 = Βάρος κάψας πορσελάνης, w_2 = Βάρος κάψας πορσελάνης + Βάρος δείγματος, w_3 = Βάρος κάψας πορσελάνης + Βάρος τέφρας

2.4 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός β-γλυκανών

Η περιεκτικότητα των λυοφιλωμένων δειγμάτων Pleurotus σε β-γλυκάνες προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με την χρήση κατάλληλου kit της Megazyme (Ιρλανδία) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η δοκιμασία βασίζεται σε υδρόλυση των πολυσακχαριτών (1, 3: 1, 6-β-D-γλυκάνη, 1,3-β-D-γλυκάνη, και α-γλυκάνη) ή των συμπλόκων τους με πρωτεΐνη με εκτεταμένη χημική υδρόλυση (με υδροχλωρικό οξύ για τις ολικές γλυκάνες) ή/και ενζυμική (με εξω-1, 3-β-γλυκανάση και β-γλυκοσιδάση για τις ολικές γλυκάνες ή αμυλογλυκοσιδάση και ιμπερτάση για την α-γλυκάνη) προς το μονομερές D-γλυκόζη. Οι ολικές γλυκάνες μπορούν να υπολογιστούν στη συνέχεια από την απορρόφηση της D-γλυκόζης στα 510 nm σε σύγκριση με την απορρόφηση γνωστής ποσότητας προτύπου D-γλυκόζης. Το περιεχόμενο σε β-γλυκάνες υπολογίζεται στη συνέχεια από τη διαφορά μεταξύ της ποσότητας της D-γλυκόζης που λαμβάνεται από τις ολικές γλυκάνες (α- και β-γλυκάνες) και των α-γλυκανών.

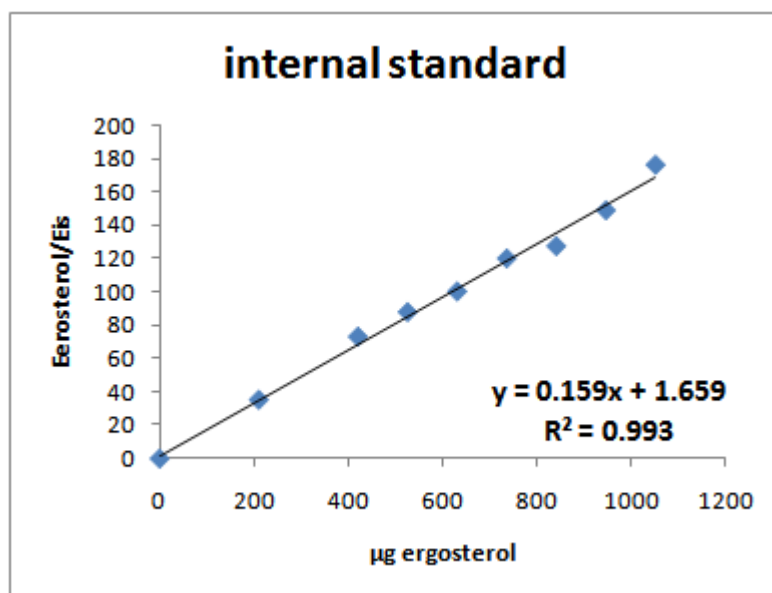
2.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι χειρισμοί έγιναν κατά το δυνατόν σε μειωμένο φωτισμό για αποφυγή της φωτομετατροπής της εργοστερόλης. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1. Ζύγισμα 200mg λυοφιλιωμένου και κονιοποιημένου δείγματος μανιταριού σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml, με βιδωτό πώμα
2. Προσθήκη 2 mL διαλύματος KOH/MeOH 3 N.
3. Προσθήκη 20 μ L προτύπου διαλύματος χοληστερόλης 100 mg/L (εσωτερικό πρότυπο).
4. Καλή ανακίνηση σε vortex.
5. Παραμονή των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 60°C για 20min
6. Κρύωμα των δοκιμαστικών σωλήνων με νερό βρύσης.
7. Προσθήκη 1,5 mL BF₃/Μεθανόλης
8. Καλή ανακίνηση στο vortex.
9. Παραμονή των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 95°C για 3min.
10. Κρύωμα των σωλήνων με νερό βρύσης.
11. Προσθήκη 4 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl.
12. Προσθήκη 2 mL διαλύματος n-εξανίου με αντιοξειδωτικό BHT (100 ppm).
13. Καλή ανακίνηση στο vortex.
14. Φυγοκέντρωση στις 2500 rpm για 5 min.

Για τον προσδιορισμό των στερολών ως τριμεθυλσιλυλαιθέρων (TMS): • Μεταφέρονται 1000 μL από την στιβάδα του n-εξανίου σε vials GC. • Εξατμιση μέχρι ξηρού με άζωτο ή Speedvac. • Προσθήκη 250 μL BSTFA. • Σφράγιση των GC vials. • Ανακίνηση στο vortex. • Παραμονή των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 70°C επί 20 min. • Τοποθέτηση των vials σε βαθειά ψύξη (-40°C) μέχρι να αναλυθούν στο GC/MS.	Για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων ως μεθυλεστέρων (FAME): Μεταφέρονται 500 μL από την στιβάδα του n-εξανίου σε vials GC, τα οποία σφραγίζονται. Εάν η μέτρηση σε GC δεν πρόκειται να γίνει άμεσα, τα δείγματα τοποθετούνται σε ψύξη (-20°C) μέχρι να αναλυθούν.
---	---

15. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα εργοστερόλης από το οποίο μεταφέρονται σε GC-vials όγκοι που περιέχουν 10, 20, 40, 60, 80,



100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 και 1000 μg εργοστερόλης. Προστίθεται εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και σιλυλιώνονται όπως τα δείγματα.

Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς εργοστερόλης

* Παρασκευή διαλυμάτων:

- Για την παρασκευή κορεσμένου διαλύματος NaCl ζυγίζονται επακριβώς 360g NaCl και διαλύονται σε 1 L απιονισμένου H₂O.
- Για την παρασκευή διαλύματος KOH/MeOH 0.5 M επακριβώς 28.055 g KOH και διαλύονται σε 1 L MeOH.
- Εξάνιο που περιέχει αντιοξειδωτικό (BHT): Ζυγίζονται 100 mg BHT και διαλύονται σε 1 L n-εξανίου (διάλυμα 100ppm)
- Για την παρασκευή εσωτερικού προτύπου χοληστερόλης: ζυγίζονται, επακριβώς 10 mg χοληστερόλης και διαλύονται σε 100 mL n - εξανίου.

2.5.1 Προσδιορισμός στερολών με GC/MS

ΓΕΝΙΚΑ

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 τριμεθυλσιλυλαιθέρες με τη διαδικασία της σιλυλίωσης.

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονιακού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Για την ανάλυση, 1 μ L σιλυλιωμένου δείγματος εισάγεται όλο στον αεριοχρωματογράφο χωρίς διαχωρισμό ροής δείγματος προς φέρον αέριο (splitless mode). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν μια HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2 mm x 0.25 μ m 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. Εκτός της χοληστερόλης (IS) και της εργοστερόλης, η αναγνώριση των οποίων έγινε με χρήση

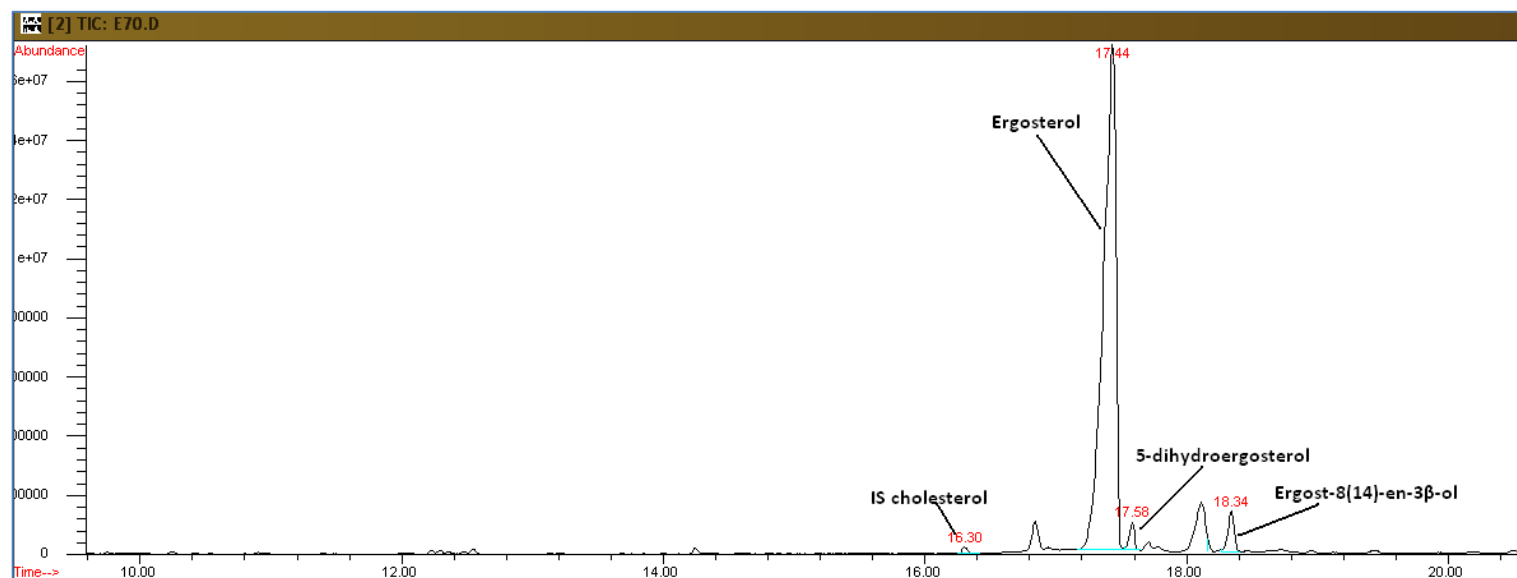
καθαρών προτύπων, η ταυτοποίηση των υπόλοιπων στερολών έγινε βάσει των χρόνων κατακράτησης, σε συνδυασμό με τη χρήση των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας και βιβλιογραφικών δεδομένων (Teichmann et al. 2007, Phillips et al. 2011). Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση εσωτερικού προτύπου χοληστερόλης και οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν με πρότυπα διαλύματα εργοστερόλης που περιείχαν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα προς ανάλυση δείγματα.

2.5.2 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC/MS

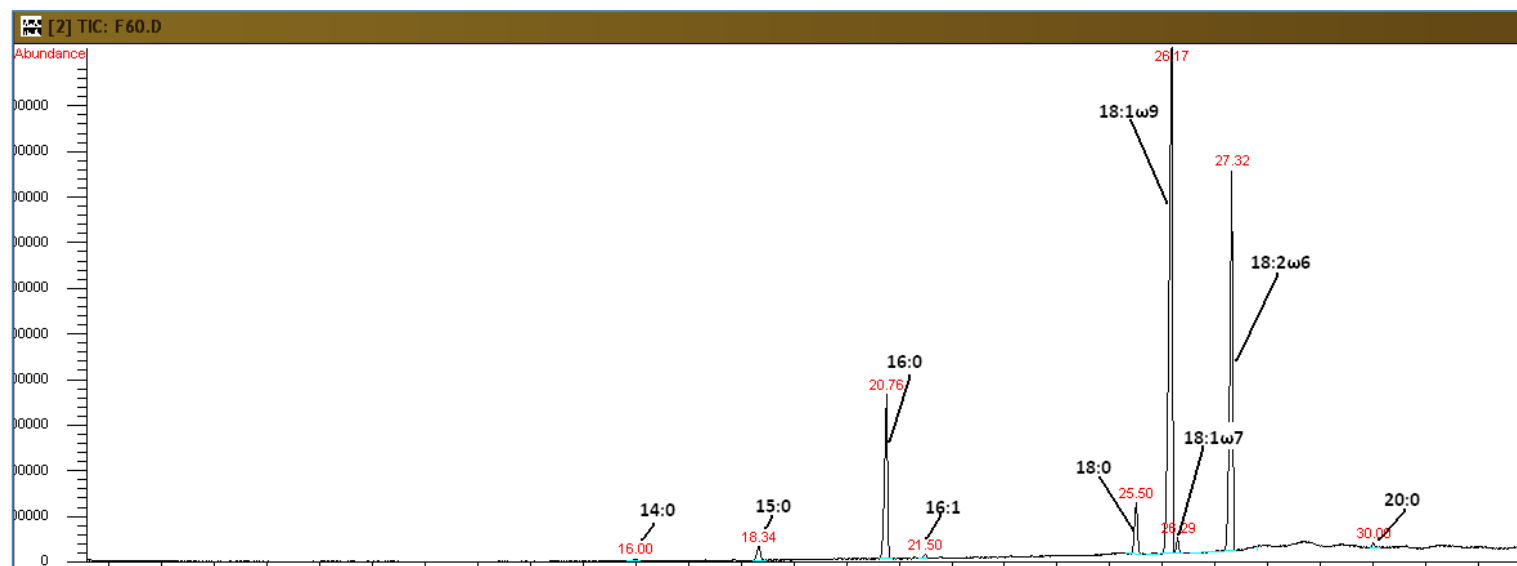
Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος HP6890 της Agilent (Hewlett Packard) εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID), ανιχνευτή μάζας MS 6890 (Mass Selective Detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7673.

Ο διαχωρισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε σε τριχοειδή στήλη J&W DB-23 (Agilent) 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 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.



Χρωματογράφημα GC-MS τριμεθυλσιλλαιθέρων των στερολών σε λιπίδια *Pleurotus Ostreatus*.



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

2.6 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

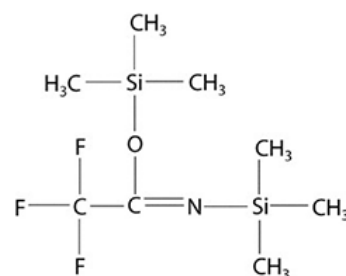
Πειραματική Πορεία

1. Αφυδατωμένα δείγματα *P. ostreatus* (0,5g) μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 12 mL με βιδωτό πώμα και εκχυλίστηκαν με 10ml μεθανόλης επί 48 ώρες υπό διαρκή ανακίνηση.
2. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm) για 10 λεπτά.
3. Έγινε παραλαβή της οργανικής φάσεως σε προζυγισμένο σωλήνα.
4. Στο στερεό υπόλειμμα επαναλήφθηκε η εκχύλιση επί 2 ώρες
5. Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με εξάτμιση σε Speed Vac στους 45° C (σχεδόν μέχρι ξηρού).
6. Τα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα λισμα αραιώθηκαν μέχρι τα 2 mL με μεθανόλη, μεταφέρθηκαν σε Eppendorf των 2 mL και φυλάχθηκαν στους -20° C για περαιτέρω ανάλυση.

2.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση απλών πολυφαινολών με αέρια χρωματογραφία .

Οι πολυφαινόλες είναι μη πτητικές ουσίες, οι οποίες θα παρέμεναν στη στήλη της Αέριας Χρωματογραφίας. Η αντίδραση σιλυλίωσης καθιστά δυνατή τη μετατροπή ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες και οι στερόλες στα πτητικά τους παράγωγα. Ο όρος σιλυλίωση αναφέρεται στην αντικατάσταση ενός υδρογόνου μιας ένωσης με μια ομάδα αλκυλοσιλυλίου. Η αντίδραση σιλυλίωσης περιλαμβάνει τη μετατροπή των -OH σε αιθερομάδες και τη μετατροπή των -COOH σε εστερομάδες

Το αντιδραστήριο BSTFA χρησιμοποιείται για την παρασκευή πτητικών παραγώγων αλκοολών, αμινών, καρβοξυλικών οξέων, στεροειδών και στερολών. Στα πλεονεκτήματα του BSTFA και των παραγώγων του (τριφθοροακεταμίδιο, τριμεθυλσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο,) περιλαμβάνονται η μεγάλη πτητικότητα (συγκριτικά με άλλους παράγοντες σιλυλίωσης) και η μεγάλη διαλυτότητα στους



συχνότερα χρησιμοποιούμενους διαλύτες σιλυλίσωσης. Επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας σιλυλίσωσης χωρίς την ανάγκη χρήσης επιπλέον διαλύτη.

Επειδή τα αντιδραστήρια σιλυλίσωσης αντιδρούν με το νερό πρέπει να λαμβάνεται 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 γίνεται στο στερεό υπόλειμμα που προκύπτει μετά την πλήρη απομάκρυνση όλων των διαλυτών κάτω από αδρανές ρεύμα αζώτου ή με χρήση SpeedVac.

Υλικά- Αντιδραστήρια

- Μεθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων *Pleurotus ostreatus*
- Εσωτερικό πρότυπο 3-(4- υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη (19,2 $\mu\text{g/mL}$)
- Αντιδραστήριο σιλυλίσωσης(BSTFA, (bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, δις-τριμεθυλσιλυλ-τριφθοροακεταμίδιο) σε πυριδίνη

Όργανα

- SpeedVac
- Φιαλίδια (GC vials)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ρυθμιζόμενες πιπέτες 1000 μL και 100 μL
- Υδατόλουτρο
- Πώματα για φιαλίδια GC
- Εργαλείο για τη σφράγιση των vials

Πειραματική πορεία:

1. Λαμβάνονται από κάθε εκχύλισμα 50-200 μL και μεταφέρονται σε κατάλληλα φιαλίδια (vials) για σιλυλίσωση.
2. Στο κάθε vial προστέθηκαν 50 μL εσωτερικού προτύπου (Internal Standard).
3. Στη συνέχεια τα vials τοποθετούνται στον εξατμιστήρα Speed Vac για εξάτμιση μέχρι ξηρού.

4. Μετά το πέρας της εξάτμισης, στο μίγμα πολυφαινολών προστέθηκαν 250 μL σιλυλιωτικού αντιδραστηρίου BSTFA. Με αυτό τον τρόπο οι πολυφαινόλες μετατρέπονται στους τριμεθυλσιλλαιθέρες (TMS) τους.
5. Τέλος, τα vials με το μίγμα πολυφαινολών και σιλυλιωτικού αντιδραστηρίου σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο για 20 λεπτά στους 70 $^{\circ}\text{C}$, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση σιλυλίωσης.
6. Στη συνέχεια, τα δείγματα μετρήθηκαν με GC/ MS.

2.6.2 Αέρια Χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/ MS) για τον προσδιορισμό απλών πολυφαινολών.

Όργανα και αντιδραστήρια

•Συσκευή αέριας χρωματογραφίας της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένη με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονιακού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683.

•Συλλιωμένα μεθανολικά εκχυλίσματα μανιταριών

Πειραματική Πορεία

Ο διαχωρισμός των πολυφαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία, ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με φασματογράφο μάζας με την τεχνική της εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring). Με αυτή την μέθοδο, η ανίχνευση των πολυφαινολών και των τερπενικών οξέων βασίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων, σε χρόνο κατακράτησης (RT) ± 0.05 min του αναμενόμενου χρόνου κατακράτησης των συστατικών στα πρότυπα διαλύματα και ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε ένα απο τα τρία ιόντα που ορίζεται ως ιόν στόχος (target), ενώ η παρουσία του συστατικού επιβεβαιώνεται απο τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (qualifiers) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα.

Η αεριοχρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ήταν η τριχοειδής στήλη HP-5 MS με επικάλυψη 5% phenyl–95% methyl siloxane, μήκους 30 m, με εσωτερική διάμετρο 0,25 mm και πάχος εσωτερικής επίστρωσης 0,25 μm . Ο εισαγωγέας τέθηκε στους 250 $^{\circ}\text{C}$ και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την

αεριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή MSD (MSD transfer line) στους 300°C. Η εισαγωγή 1 μL δείγματος έγινε με σχάση δείγματος 20:1 (split ratio 20:1). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό He με ροή 0.6 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αεριοχρωματογράφου που εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό ήταν : 70°C για 5 min, 70-130°C με ρυθμό ανόδου 15°C/min, 130-160°C με ρυθμό ανόδου 4°C/min και παραμονή για 15 min και τέλος άνοδος από 160-300°C με ρυθμό 10°C/min και παραμονή στην τελική θερμοκρασία για 15 min.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με την μέθοδο εσωτερικού προτύπου. Ως τέτοιο επελέγη η 3-(4- υδρόξυ – φαινυλο) -1- προπανόλη. Μια σειρά προτύπων διαλυμάτων – μιγμάτων των συστατικών που προσδιορίζονται – οδήγησε στην κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς για κάθε συστατικό σε περιοχή συγκεντρώσεων από 80-3500 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές με καλούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης ($R^2 > 0.996$) για όλες τις ουσίες που προσδιορίστηκαν. Η ανίχνευση των πολυφαινόλων και των τερπενικών οξέων βασίστηκε στην παρουσία των επιλεγμένων προς σάρωση ιόντων με ανοχή $\pm 0.05 \cdot \text{RT}$. Οι ποσοτικοί υπολογισμοί έγιναν βάσει των ιόντων στόχων (target ions) ενώ χρησιμοποιήθηκαν και 1-2 ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) η αναλογία των σημάτων των οποίων επιβεβαιώνει ή απορρίπτει την υπόθεση ταυτοποίησης του κάθε συστατικού.

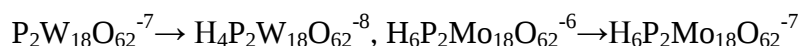
2.6.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)
- Κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v)
- Απιονισμένο νερό
- Αναδευτήρας Vortex
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών
- Φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 1,5mL
- Αυτόματες πιπέττες (10-1000 μL), tips
- Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας δεν είναι γνωστή η στοιχειομετρία:



Το προϊόν είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (750nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του FC και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

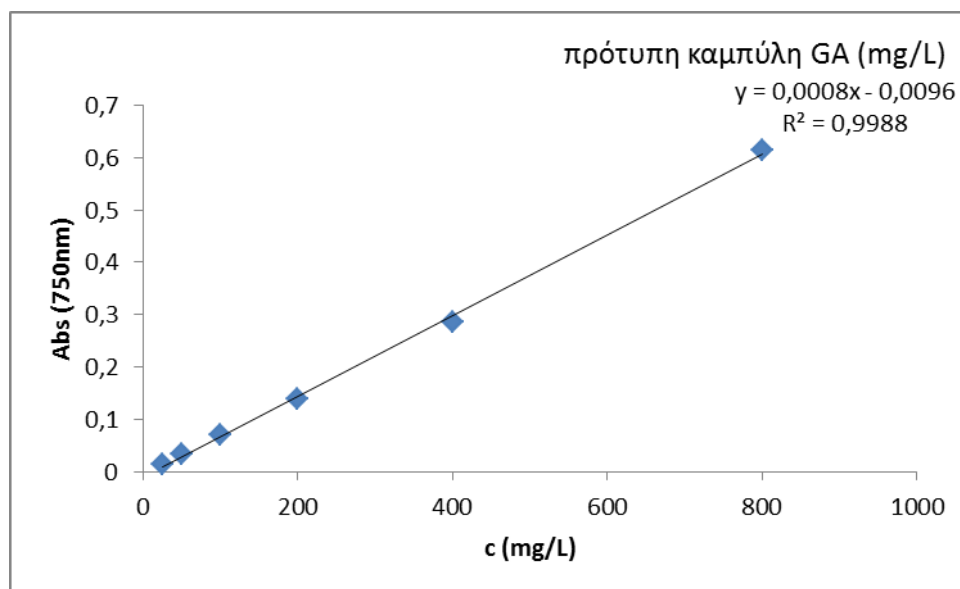
Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδιο Eppendorf τοποθετούνται 790μL απιονισμένου νερού και έπειτα 10μL μεθανολικού εκχυλίσματος αφυδατωμένων μανιταριών. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος χρησιμοποιείται μεθανόλη. Στη συνέχεια, προστίθενται 50μL αντιδραστηρίου FC, ακολουθεί ανάδευση, ενώ μετά το πέρας 1min προστίθενται 150μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% w/v). Το μίγμα ανακινείται εκ νέου, και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm ως προς το τυφλό δείγμα, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος (GA) συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800mg/L. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του GA σε mg/L και ψ η απορρόφηση στα 750nm. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα

750 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 1).



Σχήμα 5 : Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Gallicacid- GA) $\mu\text{g/mL}$.

Παρατηρήσεις

- Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu πρέπει να μείνει εκτός ψυγείου 1 ώρα πριν την χρήση του και να παραμένει στο σκοτάδι, καθώς είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο και οξειδώνεται εύκολα.
- Το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v), παρασκευάζεται μια ημέρα πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού.
- Το τελικό προϊόν της αντίδρασης αναμένουμε να έχει χρώμα από μπλε ανοιχτό έως μπλε σκούρο.

2.6.4 Δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης

A) Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH')

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα DPPH[•] σε MeOH (3,9mg σε 100 mL)

MeOH

Λουτρό υπερήχων (sonicator)

Αναδευτήρας Vortex

Φιαλίδια Eppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

Αρχή μεθόδου

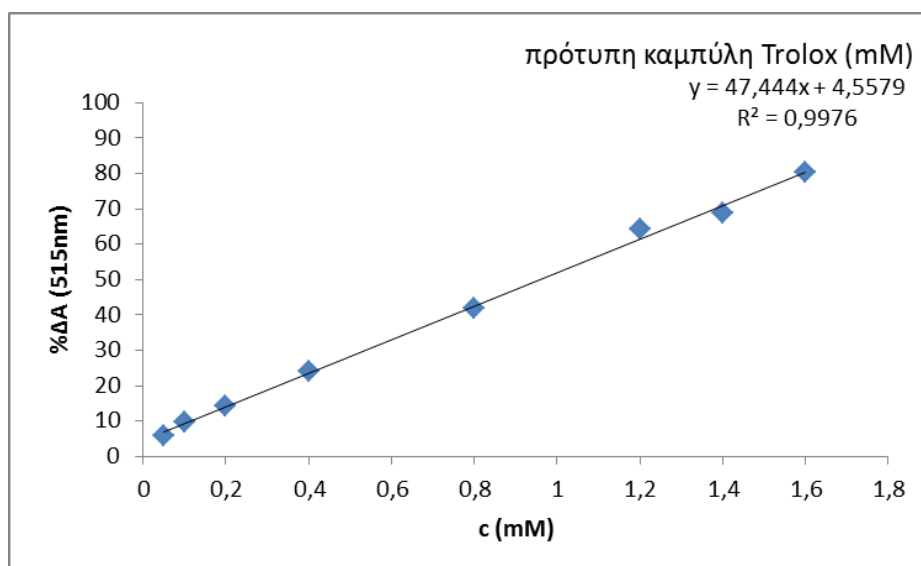
Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•]. Η δέσμευση αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515nm.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδια Eppendorf προστίθενται 25 μL δείγματος –αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη- συγκέντρωσης 2mg/mL ή μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό και 975μL DPPH[•]. Ακολουθεί ανάδευση και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30min. Η απορρόφηση μετράται σε t=0 min και t=30 min στα 515 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω της πρότυπης καμπύλης.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την αξιολόγηση των μετρήσεων της απορρόφησης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της Βιταμίνης E) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (Trolox equivalents). Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του Trolox σε mM και ψ η %ΔA₅₁₅, όπου $\% \Delta A_{515} = [(A^0_{515} - A^{30}_{515}) / A^0_{515}] \times 100$.



Σχήμα 6 : Καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τα ισοδύναμα Trolox (mmol).

B) Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

Αντιδραστήρια-Όργανα

FeCl_3 , (3 mM σε 5 mM HCl)]

TPTZ [(2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine), (2, 4, 6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη)]

1mM σε 0,05M HCl

Απιονισμένο νερό

Υδατόλουτρο

Αναδευτήρας Vortex

Αυτόματες πιπέττες (100-1000μL), tips

Φιαλίδια Eppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αρχή μεθόδου

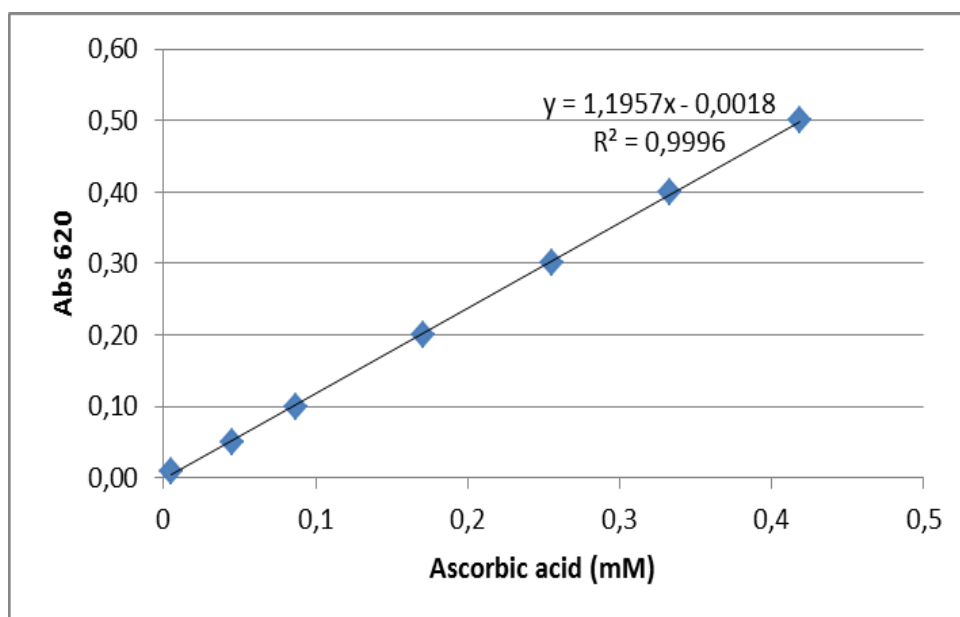
Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) εκτιμά την αντιοξειδωτική δράση όλων των συστατικών του διαλύματος που μπορούν να δράσουν αναγωγικά, μετρώντας την αναγωγική τους δύναμη. Η δοκιμή FRAP βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να ανάγουν το σύμπλοκο TPTZ-Fe (III) σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο TPTZ-Fe (II).

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο Eppendorf αναμιγνύονται 50μl διαλύματος αφυδατωμένου ροφήματος αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, κατάλληλα αραιωμένου, με 50μL FeCl_3 (3mM σε 5mM HCl) ή 50μL απιονισμένο νερό για τη παρασκευή του λευκού δείγματος. Ακολουθεί καλή ανάδευση και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30min σε υδατόλουτρο στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL διαλύματος TPTZ και ακολουθεί ανάδευση. Ο Fe^{+2} που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ. Το δείγμα παραμένει για 10min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 620nm. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς βιταμίνης C (η βιταμίνη C ανάγει το Fe^{3+} σε Fe^{2+}) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE, ascorbic acid equivalents).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του ασκορβικού οξέος σε mM και ψ η απορρόφηση στα 620nm



Σχήμα 7 : Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος σε Mm.

2.7 Προσδιορισμός βιταμίνης D

Ο προσδιορισμός της βιταμίνης D πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Food Allergens Laboratory με LC-MS/MS. Ως εσωτερικό πρότυπο (I.S.) χρησιμοποιήθηκε η μορφή της βιταμίνης D της οποίας δε ζητείται ο προσδιορισμός, π.χ. αν ζητείται ο προσδιορισμός της D₂ χρησιμοποιείται ως I.S. η D₃ και αντίστροφα.

Τρόπος εργασίας:

- Σε σωλήνα falcon των 50mL ζυγίζεται 1g αφυδατωμένου μανιταριού.
- Προστίθενται με διακριβωμένη πιπέτα 10mL ακετονιτρίλιου, στη συνέχεια 4g MgSO₄ και 1g NaCl.
- Αναδεύεται ισχυρά με το χέρι επί 1min και τοποθετείται σε υπέρηχους επί 1min.
- Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 3000 στροφές/min για 5 min.
- Μικρή ποσότητα του υπερκείμενου υγρού διηθείται από φίλτρο 0,45μm και εγχύεται στο LC-MS/MS.

2.7.1. Υγρή χρωματογραφία - MS/MS:

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε:

- Υγροχρωματογράφος με στήλη Eclipse XDB C-18, μήκους 15cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και μεγέθους σωματιδίων 3,5μm και θερμοκρασία στήλης 40 °C.
- Διαλύτης έκλουσης A: 80% νερό, 20% CH₃OH που περιέχει 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH. Για 1L διαλύτη A απαιτούνται 315,50 mg HCCONH₄ και 1 mL HCOOH.
- Διαλύτης έκλουσης B: Μεθανόλη που περιέχει 5mM HCCONH₄ και 0,1% HCOOH. Για 1L διαλύτη B απαιτούνται 315,50 mg HCCONH₄ και 1mL HCOOH.
- Ροή διαλύτη έκλουσης 0,25 mL/min.
- Πηγή ηλεκτροδιάχυσης ESI.

Ο υπολογισμός έγινε με σύγκριση των χρωματογραφικών κορυφών της βιταμίνης

D και του εσωτερικού προτύπου στο εκχύλισμα του δείγματος με τις αντίστοιχες κορυφές στο πρότυπο διάλυμα.

2.8 Πρωτόκολλο κλινικής παρέμβασης με αποξηραμένα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* με διαφορετική περιεκτικότητα βιταμίνης D₂.

Η κλινική παρέμβαση που πραγματοποιήθηκε είχε διάρκεια 6 εβδομάδες. Στην παρέμβαση συμμετείχαν υγιείς γυναίκες ηλικίας 18-45 ετών, με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος ($18,5-26 \text{ kg/m}^2$), που δεν βρίσκονταν σε κατάσταση εγκυμοσύνης ή θηλασμού, δεν ήταν χορτοφάγοι ή vegans, δεν έπιναν αλκοόλ και ήταν ψυχικά και πνευματικά υγιείς. Το πρωτόκολλο συμπεριλάμβανε καθημερινή κατανάλωση 30 gr αποξηραμένων μανιταριών που είτε είχαν παραμείνει στον ήλιο για 3 ώρες, είτε είχαν φυλαχθεί σε σκοτάδι. Ο σχεδιασμός ήταν διπλά τυφλός και σκοπός ήταν να βρεθεί εάν θα υπάρξει αύξηση της βιταμίνης D₂ στον ορό των εθελοντριών μετά την παρέμβαση, και κατά πόσο η αύξηση αυτή θα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων.

Αρχικά, η παρακολούθηση βασίστηκε στην ανάλυση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ) που χορηγήθηκε από έμπειρο διατροφολόγο με εφαρμογή διατροφολογικού λογισμικού (Nutritionist Pro). Τα άτομα που χρησιμοποιούσαν οποιαδήποτε διατροφικά συμπληρώματα που περιείχαν βιταμίνη D αποκλείστηκαν. Οι εθελόντριες με εκτιμώμενη χαμηλή διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης D που δεν πληρούσαν τα κριτήρια αποκλεισμού κλήθηκαν να δώσουν δείγμα αίματος για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων 25-υδροξυβιταμίνης D στον ορό, ύστερα από υπογραφή γραπτής δήλωσης συγκατάθεσης. Επιπρόσθετα, στον ορό μετρήθηκαν η παραθορμόνη (PTH) και το ασβέστιο.

Τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν τελικά στην μελέτη είχαν ανεπάρκεια βιταμίνης D₂ (10-30 ng/ml) και φυσιολογικό ασβέστιο στον ορό (8,5-10,5 mg/dl). Από τις 20 εθελόντριες που συμμετείχαν αρχικά, μόνο οι 11 ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο, 5 που κατανάλωσαν τα μανιτάρια που παρέμειναν στον ήλιο και 6 που κατανάλωσαν αυτά που είχαν παραμείνει στο σκοτάδι. Στην αρχή και το τέλος της παρέμβασης πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ενεργειακό περιεχόμενο μανιταριών *Pleurotus ostreatus*

Η θερμιδική αξία των αποξηραμένων μανιταριών *Pleurotus ostreatus* της μελέτης προσδιορίστηκε με θερμιδόμετρο οβίδας.

Πίνακας 1: Ενεργειακό περιεχόμενο (Ho kcal/100g ξηρού βάρους) των μανιταριών που παρέμειναν στο σκοτάδι (D) και αυτών που παρέμειναν στον ήλιο (S) για 3 ώρες.

Δείγμα	Ho (kcal/100g dw)
D1	402.3
D2	431.8
D3	408.7
D4	418.4
Μ.όρος	415,3 ± 12,8
S1	421.0
S2	427.4
S3	450.4
Μ.όρος	432,9 ± 15,5

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών δειγμάτων των μανιταριών. Σε σύγκριση με την τυπική ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη ενός ενήλικα (2000 kcal), η το ενεργειακό περιεχόμενος των μανιταριών που λαμβάνονταν ημερησίως (30 gr) ήταν περίπου 120 kcal δηλαδή αποτελούσε το 17% των συνολικών θερμίδων του διατροφολογίου των εθελοντών.

3.2 Πρωτεΐνη κατά Kjeldahl

Για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου (N%) κατά Kjeldahl, και από αυτό οι % πρωτεΐνες με τη βοήθεια της σχέσης:

$$\text{Πρωτεΐνες \%} = \text{N\%} \times 6,25$$

όπου 6,25 είναι ο γενικός συντελεστής μετατροπής σε πρωτεΐνες του οργανικού αζώτου των τροφίμων.

Σημειώνεται ότι σύμφωνα με τον Kalac (2009) για τροφές όπως τα μανιτάρια που περιέχουν σημαντικά ποσοστά μη πρωτεϊνικού αζώτου συχνά χρησιμοποιείται ένας διαφορετικός συντελεστής μετατροπής, το 4,38. Έτσι, τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών υπολογίσθηκαν και με τους δυο συντελεστές.

Πίνακας 2: Περιεχόμενη πρωτεΐνη επί ξηρού (dw) στα αποξηραμένα μανιτάρια D (σε σκοτάδι) και S (σε ήλιο).

				συντελεστής	συντελεστής
Κωδικός	W(g)	VNaOH (mL)	N% dw	Pr % dw	Pr % dw
D1	0,708	20,8	4,15	25,95	18,19
D2	0,709	20,6	4,34	27,15	19,03
D3	0,706	20,6	4,36	27,27	19,11
Μ.όρος D				26,79±0,73	18,77±0,51
S1	0,702	19,8	5,19	32,41	22,71
S2	0,706	19,7	5,25	32,84	23,02
S3	0,708	19,9	5,04	31,51	22,09
Μ.όρος S				32,26±0,68	22,60±0,47

Όπου $N (\%dw) = (V-\alpha) \times [0,7/W(g)]$,

$V = 25 \text{ ml}$ (ο όγκος του HCl 0,5N στην κωνική φιάλη),

$\alpha = \text{mL NaOH } 0,5 \text{ N}$ που καταναλώθηκαν στην προχοΐδα και

$Pr (\% dw) = N \times C$, με C τον συντελεστή μετατροπής που προαναφέραμε.

3.3 Τέφρα σε αποξηραμένα μανιτάρια *Pleurotus*

Στον Πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού τέφρας στα μανιτάρια της μελέτης

Πίνακας 3: Τέφρα στα αποξηραμένα δείγματα μανιταριών (D και S)

Κωδικός	Περιγραφή	Τέφρα
D1	παραμονή σε σκοτάδι	6,03
D2	παραμονή σε σκοτάδι	7,11
Μ.όρος		6,6±0,8
S1	παραμονή στον ήλιο	7,64
S2	παραμονή στον ήλιο	7,72
Μ.όρος		7,7±0,1

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό της τέφρας που μετρήθηκε στις δύο ομάδες των αποξηραμένων μανιταριών.

3.4 Περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες.

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των γλυκανών στα δείγματα αποξηραμένων μανιταριών που παρέμειναν στον ήλιο (S) ή σε σκοτάδι (D) δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Γλυκάνες (g/100 g DW) στα δείγματα μανιταριών

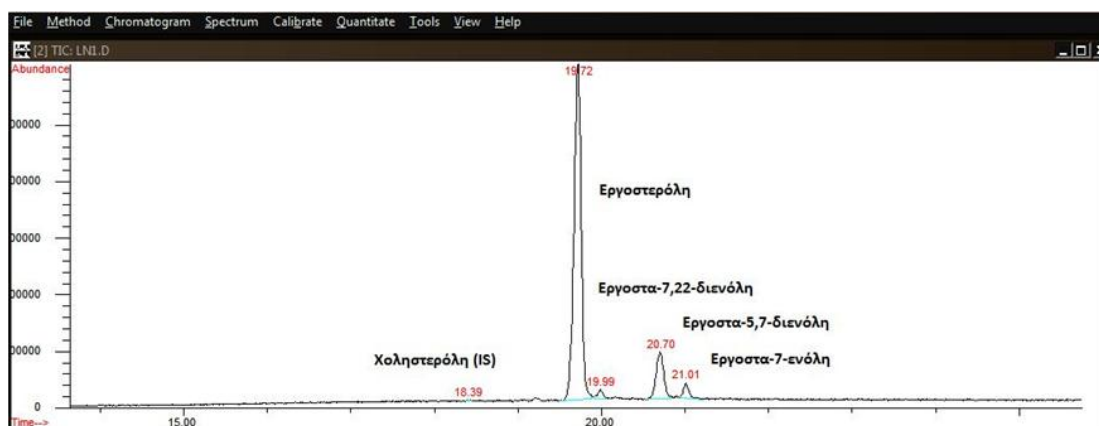
	DA (σκοτάδι)	DB (σκοτάδι)	M.O.	SD
Ολικές γλυκάνες	36,26	31,46	33,86	3,40
α-γλυκάνες	1,34	1,27	1,31	0,05
β-γλυκάνες	34,92	30,18	32,55	3,35
β-γλυκάνες (% ολικών)	96,29	95,96	96,13	0,24
	SA (παραμονή σε ήλιο)	SB (παραμονή σε ήλιο)	M.O.	SD
Ολικές γλυκάνες	34,57	34,22	34,39	0,25
α-γλυκάνες	1,15	1,23	1,19	0,06
β-γλυκάνες	33,42	32,99	33,21	0,30
β-γλυκάνες (% ολικών)	96,68	96,42	96,55	0,19

Η μέση περιεκτικότητα των δειγμάτων σε g β-γλυκάνης /100g ξηρού βάρους δείχνει ότι τα δύο δείγματα δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά.

3.5 Στερόλες στα δείγματα *Pleurotus*

Οι στερόλες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ήταν -εκτός του εσωτερικού προτύπου (χοληστερόλη)- η εργοστερόλη και οι μεταβολίτες της (Σχήμα 1). Η ταυτοποίησή τους έγινε με τη βοήθεια των χρωματογραφημάτων και των χαρακτηριστικών ιόντων που δίνουν οι Teichmann et al. (2007) και οι Phillips et al. (2011)

Σχήμα 8 . Χρωματογράφημα GC-MS τριμεθυλσιλλαιθέρων στερολών σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus ostreatus*.



Κύρια στερόλη σε όλα τα δείγματα είναι η εργοστερόλη ενώ ανιχνεύθηκαν σε μικρότερες ποσότητες οι μεταβολίτες της εργοστα-7,22-διενόλη, εργοστα-5,7-διενόλη, και εργοστα-7-ενόλη. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε εργοστερόλη ήταν (μέσοι όροι) 460,9 και 344,6 mg/100g επί ξηρού στα D και S δείγματα αντίστοιχα. Μεταξύ των δύο ομάδων μανιταριών διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της εργοστερόλης κατά 25% στα μανιτάρια που είχαν παραμείνει επί 3 ώρες στον ήλιο, κάτι αναμενόμενο, εφόσον είναι γνωστό ότι η ακτινοβόληση με ακτινοβολία UV ενισχύει την μετατροπή της στερόλης αυτής σε πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D₂ και πιθανώς άλλων παραγώγων. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και για τους μεταβολίτες της εργοστερόλης, που βρέθηκαν μειωμένοι κατά 34,1%, 17,3% και 27,4%, αντίστοιχα στα δείγματα που είχαν παραμείνει στον ήλιο.

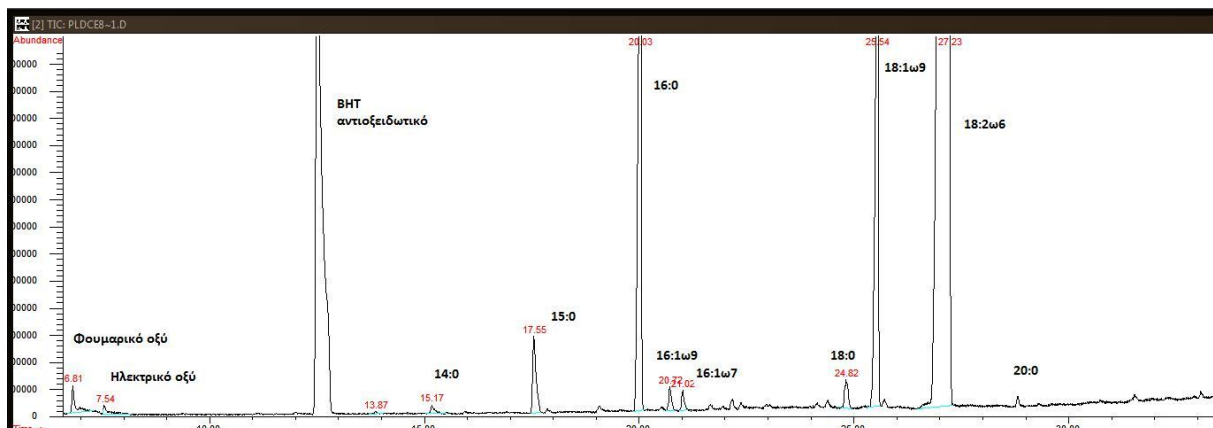
Πίνακας 5 : Εργοστερόλη και μεταβολίτες της (mg/100 g DW) στα μανιτάρια *P. ostreatus* της μελέτης (D=παραμονή σε σκοτάδι, S=παραμονή στον ήλιο)

Στερόλη	D	S	Μείωση (%)
Εργοστερόλη	460,9±105,5	344,6±66,8	25,2
Εργοστα-7,22-διενόλη	67,7±23,8	44,6±14,2	34,1
Εργοστα-5,7-διενόλη	141,2±40,1	116,8±26,5	17,3
Εργοστα-7-ενόλη	78,75±21,5	57,14±9,7	27,4
Αθροισμα στερολών	748,6±194,0	563,2±127,2	24,8

3.6 Λιπαρά οξέα

Μεταξύ των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν στα αφυδατωμένα μανιτάρια *Pleurotus* ήταν και τα δικαρβοξυλικά οξέα φουμαρικό και ηλεκτρικό, ενώ σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα βρέθηκε το λινελαϊκό (18:2ω6) ακολουθούμενο από το ελαϊκό (18:1ω9) και το παλμιτικό (16:0) (Σχήμα 2). Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται το σύνολο των κορεσμένων (SFA), το σύνολο των μονοακόρεστων (MUFA) και το σύνολο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) στα 2 είδη δειγμάτων. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις παραπάνω τάξεις λιπαρών οξέων ακόμα και στο ίδιο στέλεχος μανιταριού (Πίνακας 6).

Σχήμα 9. Τυπικό χρωματογράφημα GC-MS μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από λιπίδια μανιταριών *Pleurotus ostreatus*



Πίνακας 6: Περιεκτικότητα των λιπιδίων των μανιταριών *Pleurotus* σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA), πολυακόρεστα (PUFA), $\omega 3$ και $\omega 6$ λιπαρά οξέα, καθώς και στα δικαρβοξυλικά οξέα φουμαρικό και ηλεκτρικό εκφρασμένες ως % των λιπαρών οξέων. D=μανιτάρια που έμειναν σε σκοτάδι, S=μανιτάρια που εκτέθηκαν στον ήλιο

Κωδικός	SFA	MUFA	PUFA	$\omega 6$	$\omega 3$	$\omega 6/\omega 3$	Φουμαρικό	Ηλεκτρικό
D1	9,39	5,46	81,70	81,56	0,14	574,35	0,43	0,08
D2	9,00	5,64	80,88	80,73	0,15	538,20	1,66	0,41
S1	8,39	6,23	83,36	83,27	0,09	925,22	0,29	0,12
S2	8,70	6,67	81,27	80,85	0,12	673,75	0,64	0,21
S3	8,47	6,81	81,42	80,98	0,12	674,83	0,76	0,32
S4	8,77	6,66	80,34	79,94	0,14	571,00	1,32	0,36

Πίνακας 7 : Τάξεις λιπαρών οξέων και δικαρβοξυλικά οξέα στις 2 κατηγορίες μανιταριών (UI=unsaturation index, δείκτης ακορεστότητας)

Λ.Ο.	D	S	P
φουμαρικό	1,04	0,75	0,957
ηλεκτρικό	0,24	0,25	0,586
SFA	9,20	8,58	0,028
MUFA	5,55	6,59	0,006*
PUFA	81,29	81,60	0,770
$\omega 6$	81,14	81,26	0,921
$\omega 3$	0,15	0,12	0,160
$\omega 6/\omega 3$	556,3	711,20	0,244
UI	168,3	169,47	0,579

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών δειγμάτων όπως διακρίνουμε από τον παραπάνω πίνακα, εκτός από τα μονοακόρεστα λιπαρά που φαίνεται να αυξάνονται στα μανιτάρια που είχαν παραμείνει στον ήλιο.

3.7 Φαινολικές ενώσεις.

3.7.1 Ολικές πολυφαινόλες με την φωτομετρική μέθοδο Folin Ciocalteu

Πίνακας 8 : Ολικές πολυφαινόλες στα δείγματα αποξηραμένων μανιταριών .

Κωδικός δείγματος	Βάρος δείγματος	ABS 750 nm	μg GAE/ 100g dw	mg GAE/ 100g fw
D1	0.5060	0.411	103.2	10.32
D2	0,5078	0,451	116,9	11,69
D3	0,5042	0,458	120,2	12,02
S1	0,5146	0,440	111,5	11,15
S2	0,5051	0,460	120,7	12,07
S3	0,5075	0,442	113,8	11,38

Πίνακας 9 : Μέσος όρος περιεκτικότητας σε ολικές πολυφαινόλες για τα δύο είδη δειγμάτων.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	M.O.	SD	p-ratio
D	11,34	0,90	0,7633
S	11,53	0,48	

Τα 2 είδη δειγμάτων *Pleurotus* δεν διαφέρουν σημαντικά. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες. Σε πρόσφατη εργασία των Yue Jin et al.(2014) η ακτινοβολία με UVB μανιταριών του γένους *Pleurotus* δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφορά στις ολικές φαινόλες.

3.7.2 Αντιοξειδωτική δράση

Ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (DPPH)

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	mmol TE / gdw	mmol TE / 100g fw	μ. Όρος	<i>p</i> -ratio
D1	9,85	98,486	105,35±6,03	0,0077
D2	10,78	107,776		
D3	10,98	109,785		
S1	15,51	155,099	151,65±15,03	
S2	16,47	164,660		
S3	13,52	135,199		

TE=ισοδύναμα Trolox

Αναγωγική δύναμη (FRAP)

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	mmol TE/gdw	mmol TE / 100g fw	M. όρος	p-ratio
D1	0,244	2,443	2,92±0,42	0,4699
D2	0,308	3,076		
D3	0,323	3,228		
S1	0,312	3,117	3,11±0,08	
S2	0,319	3,185		
S3	0,303	3,025		

TE=ισοδύναμα Trolox

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μόνο στην ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, με αύξηση στα δείγματα που είχαν παραμείνει τον ήλιο. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Yue Jin et al. (2014), όπου η έκθεσημανιταριών *Pleurotus* σε ακτινοβολία UVB προκάλεσε μείωση της ικανότητας δέσμευσης του DPPH. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της ανακολουθίας μπορεί να βρίσκεται στις διαφορές έντασης της UV ακτινοβολίας, εφόσον στην προαναφερθείσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν λυχνίες UV σε μικρή απόσταση από τα μανιτάρια, ενώ στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ηλιακό φώς. Επίσης στην ικανότητα δέσμευσης του DPPH μπορεί να δρουν συνεργιστικά και κάποιες άλλες ενώσεις που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Ένα λογικό ερώτημα που προκύπτει είναι το εάν η περιεχόμενη εργοστερόλη ή η βιταμίνη D₂ στα μανιτάρια θα μπορούσαν να έχουν κάποια επίδραση στις συγκεκριμένες μετρήσεις.

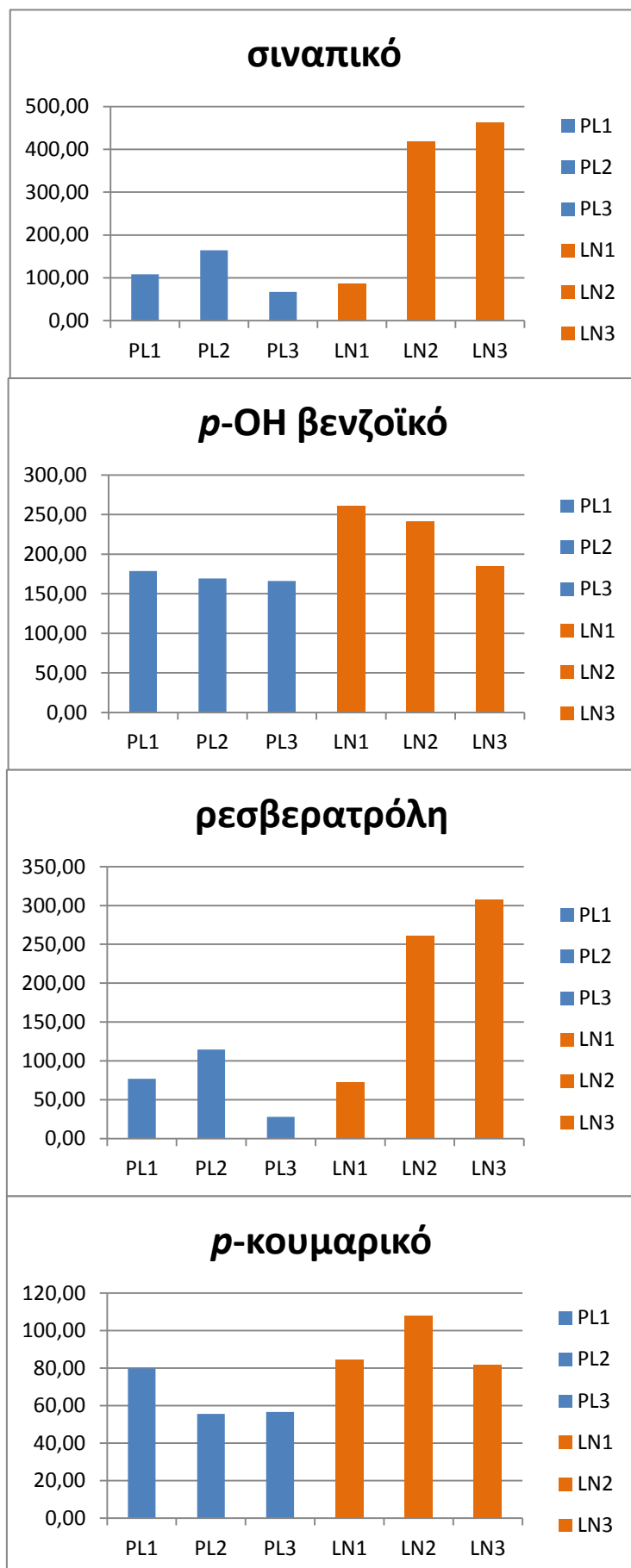
3.7.3 Απλές φαινόλες που προσδιορίστηκαν με GC/MS.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού απλών φαινολών με GC/MS στα δύο είδη δειγμάτων *Pleurotus*:

Πίνακας 10: Απλές πολυφαινόλες (μg/100g ξηρού βάρους) σε εκχυλίσματα αφυδατωμένων μανιταριών *Pleurotus ostreatus* (PL=παρέμειναν σε σκιά, LN=εκτέθηκαν στον ήλιο)

Φαινόλες	PL1	PL2	PL3	LN1	LN2	LN3	P value
Κινναμικό οξύ	79.47	56.42	63.82	74.60	63.22	38.58	0.571
Τυροσόλη	9.49	6.03	8.33	4.35	6.45	0.00	0.114
p-OH βενζοϊκό οξύ	178.75	169.24	165.95	260.57	240.84	184.55	0.068
p-OH φαινυλοξικό οξύ	102.17	94.21	68.09	47.77	--	--	
Πρωτοκατεχικό οξύ	75.06	68.51	55.39	49.83	118.57	108.95	0.306
3,4- διυδροξύ φαινυλοξικό οξύ	96.80	98.90	84.01	--	39.89	74.15	0.064
p-κουμαρικό οξύ	79.86	55.51	56.62	84.43	108.02	81.66	0.077
Καφεϊκό οξύ	17.92	18.83	6.03	9.08	55.63	11.59	0.515
Σιναπικό οξύ	108.10	164.45	67.22	86.42	418.71	463.92	0.162
Ρεσβερατρόλη	77.00	114.51	28.10	72.25	260.36	307.61	0.139
Χρυσίνη	230.12	358.96	61.13	235.19	657.75	297.64	0.316
Κατεχίνη	19.39	18.53	7.22	6.28	14.00	31.00	0.817
Καμφερόλη	52.96	55.73	7.06	25.36	71.59	95.72	0.380
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	1127.09	1279.83	678.97	956.13	2055.03	1695.37	

Συνολικά βρέθηκαν 13 απλές φαινόλες και στα δύο είδη δειγμάτων, οι οποίες όμως δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, ενώ μερικές από αυτές φάνηκαν ελαφρά αυξημένες στα δείγματα που είχαν εκτεθεί στον ήλιο, όπως φαίνεται στα παραδείγματα που ακολουθούν (Σχήμα 10):



Σχήμα 10. Συγκεντρώσεις απλών φαινολών σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* που παρέμειναν στο σκοτάδι (PL) ή εκτέθηκαν σε ηλικά ακτινοβολία (LN)

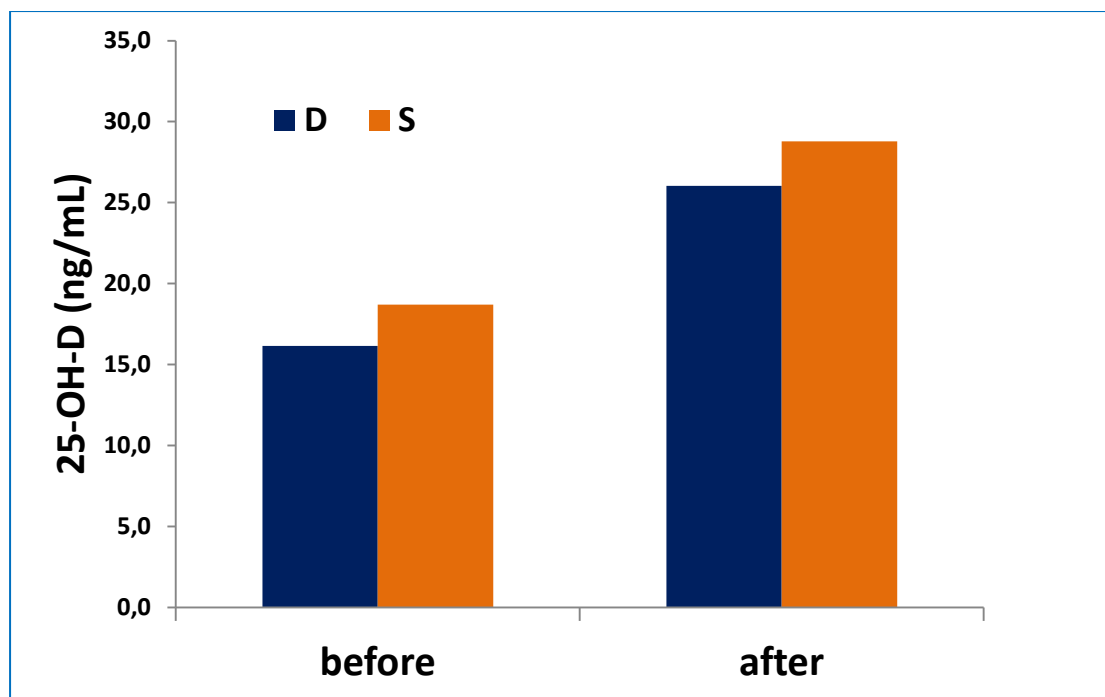
3.8. Αποτελέσματα διατροφικής παρέμβασης μεμανιτάρια *Pleurotus*.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μέτρησης της 25-OH βιταμίνης D στον ορό των εθελοντριών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση.

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις 25-OH βιταμίνης D (ng/mL) (D=μανιτάρια που παρέμειναν σε σκοτάδι, S=μανιτάρια που εκτέθηκαν σε ηλιακή ακτινοβολία)

A/A	ΣΚΕΥΑΣΜΑ	Αρχή παρέμβασης	Τέλος παρέμβασης
		25-OH-D ₂	25-OH-D
6	D	19,93	32,4
14	D	15,64	24,75
18	D	11,68	22,89
19	S	27,32	38,42
22	S	19,55	28,55
23	D	13,37	25,9
24	S	23,93	30,46
26	S	17,4	28,56
27	S	9,7	23,81
29	D	20,16	24,24
30	S	14,32	22,92

Η βιταμίνη D₂ φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά στον ορό όλων των εθελοντριών στο τέλος της παρέμβασης, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο ομάδων (διάγραμμα 1). Άλλες μελέτες, όπως αυτή των Teichman et al (2007) αλλά και των Stepien et al (2013), παρατήρησαν αύξηση της 25(OH)D₂ στον ορό των εθελοντών, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, σε μελέτη των Urbain et al (2011), η βιοδιαθεσιμότητα της D₂ ήταν αποτελεσματική στην αύξηση της 25(OH)D βιταμίνης του ορού των εθελοντών. Υπήρχαν όμως διαφορές με την παρούσα μελέτη, εφόσον τα μανιτάρια που καταναλώθηκαν ανήκαν σε άλλο είδος (button mushrooms) και είχαν δεχτεί UVB ακτινοβολία και όχι ηλιακή. Σχετικά περιορισμένος είναι ο αριθμός των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί σε σχέση με την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας σε μανιτάρια του γένους *Pleurotus*.



Σχήμα 11 : μεταβολή της 25-OH-D στον ορό των εθελοντριών πριν και μετά την διατροφική παρέμβαση με μανιτάρια

Σύμφωνα με την μελέτη EPIC (Ευρωπαϊκή Προοπτική Μελέτη για τον Καρκίνο και την Διατροφή) η μέση ημερήσια πρόσληψη βιταμίνης D για τον πληθυσμό 10 ευρωπαϊκών χωρών ,μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, ήταν 4,8 μg / ημέρα για τους άνδρες και 3,3 μg/ημέρα για τις γυναίκες. Από μελέτη που έγινε σε ελληνικό πληθυσμό (Manios et al.,2014), φάνηκε ότι σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και στα δύο φύλα το ποσοστό των συμμετεχόντων με διαιτητική πρόσληψη κάτω του EAR (μέσης απαίτησης) που είναι 10μ g/ημέρα, άγγιζε το 100%. Στην παρούσα διατροφική παρέμβαση, η ποσότητα της βιταμίνης D που δόθηκε στους εθελοντές μέσω των μανιταριών ημερησίως ήταν 4πλάσια από την EAR στην περίπτωση του συμβατικού μανιταριού και 20 φορές περισσότερη στην περίπτωση των μανιταριών που είχαν υποστεί ηλιακή ακτινοβολία.

Ενώ το πρωτόκολλο ήταν άριστα σχεδιασμένο,με διπλά τυφλό σχεδιασμό και η παρέμβαση πραγματοποιήθηκε με ένα φυσικό και πολύ υγιεινό προϊόν, υπήρξαν κάποιοι περιορισμοί. Βασικός περιορισμός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αυξημένη ηλιοφάνεια που επικρατούσε κατά την διάρκεια της παρέμβασης και πιθανότατα επηρέασε τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης D στον ορό των εθελοντριών

στις τελικές μετρήσεις. Όπως έχει προαναφερθεί, η βιταμίνη D₃ ή χοληκαλσιφερόλη μπορεί να παραχθεί ενδογενώς με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας του ήλιου από την 7-δεϋδροχοληστερόλη που υπάρχει στην επιφάνεια του δέρματος. Λόγω αυτού, και εφόσον είναι γνωστό ότι η συνολική βιταμίνη D του ορού είναι το άθροισμα της D₃ από τον ήλιο και της D₂ από το τρόφιμο, είναι πολύ πιθανό τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συνολικής βιταμίνης D των εθελοντών να είναι εν μέρει απόρροια και της παραπάνω διαδικασίας. Επίσης, τα μανιτάρια που εκτέθηκαν σε ηλιακή ακτινοβολία περιείχαν μικρότερα ποσοστά εργοστερόλης από τα συμβατικά μανιτάρια κατά το στάδιο της διατροφικής παρέμβασης, λόγω του ότι ένα μέρος της είχε μετατραπεί σε βιταμίνη D₂. Οπότε, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις βιταμίνης D₂ και εργοστερόλης στα δύο δείγματα μανιταριών είναι άλλος ένας παράγοντας που επηρέασε τα αποτελέσματα της βιταμίνης D των εθελοντών. Είναι σημαντικό να θυμηθούμε ότι υπάρχουν αρκετές ανασκοπήσεις και μεταανалύσεις που αμφισβητούν την βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D, κυρίως όμως από διατροφικά συμπληρώματα. Με βάση τα στοιχεία αυτά λοιπόν, αποτελεί σίγουρα επιτακτική ανάγκη η πραγματοποίηση και άλλων μελετών προκειμένου να μπορέσουμε να εξηγήσουμε καλύτερα τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ηλιακή ακτινοβολία επηρέασε σημαντικά μόνο την εργοστερόλη των μανιταριών και τους μεταβολίτες της, οι συγκεντρώσεις των οποίων βρέθηκαν μειωμένες στα μανιτάρια που είχαν παραμείνει στον ήλιο. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο εφόσον είναι γνωστό ότι η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας μετατρέπει μέρος της εργοστερόλης σε βιταμίνη D₂. Αυτό το συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και από τις τιμές της βιταμίνης D₂ που ήταν αυξημένες στα δείγματα που είχαν παραμείνει στον ήλιο σε σχέση με τα υπόλοιπα (μεταβολή από 1,5mg/kg σε 6,6mg/kg επί ξηρού). Στην κλινική παρέμβαση που πραγματοποιήθηκε παράλληλα, τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων βιταμίνης D στον ορό και των 2 ομάδων, τα οποία όμως δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες προκειμένου να καταστεί σαφέστερο εάν μανιτάρια του γένους *Pleurotus* ύστερα από εμπλουτισμό με βιταμίνη D μέσω έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία ως συμπλήρωμα διατροφής σε άτομα με ανεπάρκεια βιταμίνης D.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akyuz M, Kirbag S. Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. *Eur Asia J Bio Sci.* 2009; 3:58–63. doi: 10.5053/ejobios.2009.3.0.8.
2. Alam N, Yoon KN, Lee TS, Lee UY. Hypolipidemic Activities of dietary *Pleurotus ostreatus* in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology.* 2011;39(1):45-51.
3. S.P. Wasser. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 60:258–274 DOI 10.1007/s00253-002-1076-7
4. Barreira João C.M. 'Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms'' *Food Analytical Methods* 7, Issue 1, pp 217-223 (2014).
5. Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., Ferreira I.C.F.R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chemistry and Toxicology* (2008) 46: 2742–2747.
6. Benedict RG, Brady LR. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *J Pharm Sci.* 1972;61:1820–2. doi: 10.1002/jps.2600611130.
7. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species, *Am J Bot.* 2011;98:426–438. doi: 10.3732/ajb.1000298.
8. Bobek P, Galbavy S. Effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *Br J Biomed Sci.* 2008;58:164–8.
9. Bobek P, Ginter E, Jurcovicova M, Kuniak L. Cholesterol-lowering effects of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 1991;35(4):191–195.

10. Bobek P, Ozdin L, Galbavy S. Dose- and time-dependent hypercholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*. 1998;14(3):282-86.
11. Bobek P, Ozdin L, Kuniak L. Effect of oyster mushroom and isolated β -glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. *J Nutr Biochem*. 1997;8(8):469-71.
12. Bobek P, Ozdin L, Kuniak L. Mechanism hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats: reduction of cholesterol absorption and increase of plasma cholesterol removal. *Z Ernährungswiss*. 1994;33:44-50.
13. Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME. The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med*. 2008;233(3):259–76. doi: 10.3181/0708-MR-227.
14. Breene WM. Nutritional and medical value of specialty mushrooms. *J Food Protec*. 1990;53:883–94.
15. Caglarirmak N. Chemical composition and nutrition value of dried ~ cultivated culinary–medicinal mushrooms from Turkey. *Int J Med Mushr* 13:351–356 (2011).
16. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F, (1970) *Cancer Res*. 30 2776-2781.
17. Encyclopedia of human nutrition (3rd ed.) vol 4 Academic Press, Oxford, UK
18. Ergönül Pelin Günç , Ilgaz Akata, Fatih Kalyoncu and Bülent Ergönül. Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species. *ScientificWorld Journal*. 2013: 163964.
19. Ferreira I.C.F.R., Barros L., Abreu R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* (2009) 16: 1543–1560.
20. Flegg P.B and G. Maw, “Mushrooms and their possible contribution to the world,” *Mushroom Journal*, vol. 48, pp. 395–403, 1997.
21. Freedman DM, Cahoon EK, Rajaraman P, et al. Sunlight and other determinants of circulating 25-hydroxyvitamin D levels in black and white participants in a nationwide U.S. study. *Am J Epidemiol* (2013) 177:180-192.

22. Gil Ramirez A, Clavijo C et al. Edible mushrooms as potential sources of new hypoholesterolemic compounds. *Mushroom biology and mushroom products* (2011).
23. Grangeia C, Heleno SA, Barros L, Martins A and Ferreira ICFR, Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Res Int* 44:1029–1035 (2011).
24. Gruen F.H. and M. W. Wong, “Distribution of cellular amino acids, proteins and total nitrogen during fruit body development in *Flammuling velutipes*,” *Canadian Journal of Botany*, vol. 160, pp. 1339–1341, 1982.
25. Guillamón E, A. García-Lafuente, M. Lozano et al., “Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases,” *Fitoterapia*, vol. 81, no. 7, pp. 715–723, 2010.
26. Gunde-Cimerman N., Cimerman A. Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Exp Mycol*. 1995, 19(1):1-6.
27. Gutteridge JM. Free radicals in disease process: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*. 1993;19:141–158.
28. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70:257–265.
29. Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Santos-Buelga C and Ferreira ICFR, Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *LWT – Food Sci Technol* 44:1343–1348 (2011).
30. Holick MF. Vitamin D: physiology, dietary sources and requirements (2013).
31. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* (2007) 357:266–281
32. Hong JS, Kim YH, Lee KR, Kim MK, Cho CI, Part KKH. Composition of organic fatty acid in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1988;20:100–105.
33. Hossain S, Hashimoto M, Choudhury EK, Alam N, Hussain S, Hasan M, Choudhury SK, Mahmud I, Dietary mushroom (*pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolemic rats. *Clin Exp Pharmacology Physiol*. 2003, 30(7):470–75.

34. Iwalokun BA, Usen UA, Otunba AA, Olukoya DK. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *Afr J Biotech*. 2007;6:1732–9.
35. Jasinghe Virah J, Conrad O Perera. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry* 92(2005) 541-546.
36. Jaworska G and Bernas E, The effect of preliminary processing and ' period of storage on the quality of frozen *Boletus edulis* (Bull:Fr.) mushrooms. *Food Chem* 113:936–943 (2009).
37. Jayakumar T, Tomas PA, Geraldine P. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol*. 2007,42(3):183-91.
38. Kalač P, “A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, no. 2, pp. 209–218, 2013.
39. Kalac~ Pavel, 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113: 9–16.
40. Kim Seong-Eun, In-Kyoung Lee, Yun-A Jung, Ji-Hee Yeom, Dae-Won Ki, Myeong-Seok Lee, Ja-Gyeong Song, Yong-Ju Jin, Soon-Ja Seok, and Bong-Sik Yun. Mushrooms Collected from Deogyu Mountain, Muju, Korea and Their Antioxidant Activity .*Mycobiology*. 2012 Jun; 40(2): 134–137.
41. Krings Ulrich, Berger Ralf G. Dynamics of sterol and fatty acids during UVB treatment of oyster mushroom. *Food Chemistry* 149 (2014) 10-14.
42. Lam Yu Shan & Okello Edward J. Determination of lovastatine, b-glucan, total polyphenols and antioxidant activity in raw and processed oyster-culinary-medical mushroom, *Pleurotus Ostreatus*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* (2015) 17(2):117-128.
43. Mallavadhani U., Sudhakar A., Sathyanarayana K.V.S., Mahapatra A., Li W., Richard B. (2006): Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chemistry*, 95: 58–64.
44. Manzi Pamela, Pizzoferrato L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68 (2000) 315±318).

45. Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V.J Agric Food Chem. 2001 May;49(5):2343-8.
46. Mattila P, Lampi A-M, Ronkainen R, Toivo J and Piironen V, Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. Food Chem 76:293–298 (2002).
47. Mattila P., Sounpa K., Piironen V. (2000): Functional properties of edible mushrooms. Journal of Nutrition, 16: 7–8.
48. Mdachi S.J.M, M. H. H. Nkunya, V. A. Nyigo, and I. T. Urasa, “Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms,” Food Chemistry, vol. 86, no. 2, pp. 179–182, 2004.
49. Miles P.G, Shu-ting Chang. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect ,and Environmental Impact (2007) CRC Press . 480 Pages
50. Ouzouni P.K, D. Petridis, W.-D. Koller, and K. A. Riganakos, “Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece,” Food Chemistry (2009) vol. 115, no. 4, pp. 1575–1580.
51. Pedneault K., Angers P. T.J., A. R.J. Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopia* var. ‘*citrino-pileatus*’ grown at different temperatures. Mycological Research (2007) Volume 111, Issue 10, Pages 1228–1234.
52. Pereira E, Barros L, Martins A and Ferreira ICFR, Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. Food Chem 130:394–403 (2012).
53. Phillips Katherine and Amy S Rasor. A nutritionally meaningful increase in vitamin D in retail mushrooms is attainable by exposure to sunlight prior to consumption. J Nutrition and food sciences 2013:3-6
54. Phillips KM, Ruggio DM and Haytowitz DB, Folate composition of 10 types of mushrooms determined by liquid chromatography–mass spectrometry. Food Chem 129: 630–636 (2011).
55. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira IC. Food Chem Toxicol. (2012) Feb;50(2):191-7. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.056. Epub 2011 Oct 28.
56. Reis FS, Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Santos-Buelga C et al., Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from northeast Portugal. J Food Sci 76:C824–C830 (2011)

57. Ribeiro B, P. G. de Pinho, P. B. Andrade, P. Baptista, and P. Valentão, "Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: a comparative study," *Microchemical Journal* (2009) vol. 93, no. 1, pp. 29–35.
58. Rop O., Mlcek J., Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects .*Nutrition Reviews* (2009) Vol. 67(11):624–631.
59. Schneider I,Kressel G,et al. 2011.Lipid lowering effects of oyster mushroom (*pleurotus ostreatus*) in humans.*J Funct Foods*. 3(1):17-24.
60. Senatore F., Dini A, Marino A. Chemical Constituents of Some Basidiomycetes 1988. *J Sci Food Agric* 1988,45, 337-345).
61. Senn-Irlet B, Heilmann-Clausen J, Genney D, Dahlberg A (2007) Guidance for conservation of macrofungi in Europe. Document prepared for the European Council for Conservation of Fungi (ECCF) within the European Mycological Association (EMA) and the Directorate of Culture and Cultural and Natural Heritage, Council of Europe, Strasbourg.
62. Sharma Rishu and Sharma B.M.Strain improvement in *pleurotus ostreatus* using UV light and ethyl methyl sulfonate as mutagens.Department of plant pathology,Centre of Mushroom Research and Training ,Palampur,Himachal Pradesh,(2014) 176062,India.
63. Shin M.J,Rim S.J, Jang Y,et al.The cholesterol lowering effect of plant sterol containing beverage in hypercholesterolemic subjects with low cholesterol intake.*Nutrition Research* (2003) 23,489-496.
64. Shivraj Hariram Nile and Se Won Park D.Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre Contents of Wild Growing Edible Mushrooms.*Czech J. Food Sci*. 2014,Vol. 32, No. 3: 302–307.
65. Stachowiak B.,Regula J. Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. *Eur Food Res Technol* (2012)234:369-380.
66. Stepien Magdalena,Louise O'Mahony,Aifric O'Sullivan,John Collier William D.,FraserMichael J. et al. Effect of supplementation with vitamin D₂-enhanced mushrooms on vitamin D status in healthy adults *J Nutr Sci*. 2013; 2: e29.
67. Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect Biol Med*. 2006;49(2):159–70. doi: 10.1353/pbm.2006.0034.

68. Teichmann A., Dutta P.C, Staffas A., Jagerstad M. Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT* 40 (2007) 815–822.
69. Teichmann Anja, Paresch C. Dutta, Anders Staffas, Margaretha Jagerstad. Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *Science direct, LWT* 40 (2007) :815-822.
70. Urbain P, Singler F, Ihorst G, Biesalski H-K and Bertz H. Bioavailability of vitamin D₂ from UVB irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* (2011) 65, 965-971.
71. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44–84.
72. 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.
73. Vaz JA, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, Vasconcelos MH and Ferreira ICFR, Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chem* 126:610–616 (2011).
74. Wang D, Sakoda A, Suzuki M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology.* 2001;78(3):293–300.
75. Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:258–274 DOI 10.1007/s00253-002-1076-7.
76. Yilmaz N, Solmaz M, Türkekul I, Elmastaş M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry.* 2006;99(1):168–174
77. Yilmaz N. Mehtap Solmaz M., Turkekul I., Elmastas M.. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99 (2006) 168–174

78. Yue Jin, Danfeng Wang, Jiandong Lu et al. Impact of UVC radiation on antioxidant activity, malondialdehyde and quality of *Pleurotus Eryngii*. 2014.
79. Zacharia S, Doshi A. Artificial indoor cultivation of *Tricholoma crassa* (Berk.) Sacc. an ectomycorrhizal mushroom using some local substrates. *Journal of Mycology and Plant Pathology*. 2004;34:125–126.

ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

- www.chem.auth.gr
- estia.hua.gr/file/lib/default/data/14863
- nemertes.lis.upatras.gr