



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Φυσικοχημείας Τροφίμων



**Ενδοειδική διακύμανση βιοδραστικών μικροσυστατικών και
αντιοξειδωτικής δράσηςμανιταριών *Pleurotus ostreatus* από
Ελληνικά ενδαιτήματα**

Μεταπτυχιακή Διατριβή
Ελένη Κουτσοθεοδώρου

Τριμελής επιτροπή:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: **Καλογερόπουλος Νικόλαος**, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΜΕΛΗ: **Ζερβάκης Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καλιώρα Ανδριάννα, Επίκουρη Καθηγήτρια,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε από την Κουτσοθεοδώρου Ελένη, στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Το εργαστηριακό μέρος της πτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Στον Επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για το αμείωτο ενδιαφέρον, τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και για τις διορθώσεις του τελικού κειμένου.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ανδριάννα Καλιώρα και τον αναπληρωτή καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου κ. Γεώργιο Ζερβάκη για τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου παρείχαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης καθώς και για τη φιλική τους στάση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στον Γιώργο Κουτρώτσιο, υποψήφιο διδάκτορα στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ο οποίος πραγματοποίησε τις πειραματικές καλλιέργειες των μανιταριών της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων για την καλή συνεργασία καθώς και το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για την διάθεση των ερευνητικών χώρων και την παραχώρηση των οργάνων για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υψηλή διατροφική αξία των μανιταριών είναι επιστημονικά τεκμηριωμένη χάρη στο περιεχόμενο τους σε πρωτεΐνη, διαιτητικές ίνες, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία, καθώς και σε βιοδραστικές ουσίες και αντιοξειδωτικούς παράγοντες που θεωρείται ότι προάγουν την υγεία. Τα μανιτάρια είναι τρόφιμα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας, με κύριο λιπαρό οξύ το απαραίτητο λινελαϊκό οξύ και κύρια στερόλη την εργοστερόλη (πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D₂). Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus spp.*, ειδικότερα, μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και έχουν σύντομη διάρκεια καλλιέργειας, στοιχεία που διευκολύνουν την καλλιέργεια τους, μειώνουν το κόστος παραγωγής και επιδρούν θετικά στην εμπορικότητα τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύγκριση στελεχών *P. ostreatus* που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με εισαγόμενα και με εμπορικά μανιτάρια του ίδιου είδους ως προς τα βιοδραστικά συστατικά και την αντιοξειδωτική δράση τους. Συνολικά μελετήθηκαν 16 στελέχη μανιταριών του είδους *P. ostreatus*, από τα οποία 11 ήταν αυτοφυή από διάφορες περιοχές τις Ελλάδας, 2 ήταν εισαγόμενα και 3 ήταν εισαγόμενα εμπορικά. Μετά την ταυτοποίηση και τη φύλαξη μυκηλλίων τους στην τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των μανιταριών της παρούσας εργασίας, τα οποία συλλέχθηκαν, και λυοφιλιώθηκαν. Στα λυοφιλιωμένα δείγματα προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας (GC-MS) τα λιπαρά οξέα, οι στερόλες, οι απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων τους (α) μέσω της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών, (β) μέτρησης της αναγωγικής τους δύναμης και (γ) εκτίμησης της ανασταλτικής δράσης στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψε πως τα ελληνικά αυτοφυή μανιτάρια *P. ostreatus* περιέχουν ποικιλία βιοδραστικών

μικροσυστατικών, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και μάλιστα σε επίπεδα ανάλογα με τα αντίστοιχα των εμπορικών και των εισαγομένων. Με δεδομένο ότι η ετήσια κατανάλωση μανιταριών στην Ελλάδα φθάνει τους 11.000 τόνους και ότι μόνο ένα πολύ μικρό μέρος αυτής της ποσότητας καλύπτεται από την εγχώρια παραγωγή, συμπεραίνεται ότι τα ελληνικά μανιτάρια μπορούν να αξιοποιηθούν για εμπορικούς σκοπούς, όπως για παράδειγμα για την δημιουργία λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής.

ABSTRACT

The high nutritional value of mushrooms is widely recognized, as a result of their protein, dietary fiber, vitamins, minerals and trace elements, as well as health promoting bioactive compounds and antioxidants content. The fat content of the mushrooms is low with linoleic acid predominating among fatty acids, while their main sterol is ergosterol (precursor of vitamin D₂). Mushrooms of the genus *Pleurotus*, can grow on a wide variety of substrates, in a wide temperature range and at a short crop duration, features that facilitate their cultivation with lower costs and affect positively their marketability.

The purpose of this study was to compare the bioactive compounds content and antioxidant activity of *P. ostreatus* mushrooms grown in different areas of Greece with commercial and imported *P. ostreatus* strains. Sixteen *P. ostreatus* strains were compared, 11 of them isolated from various parts of Greece, 2 being imported strains and 3 being commercial strains. After identification, strains mycelia were stored in the fungal cultures bank of the General and Agricultural Microbiology Laboratory at the Agricultural University of Athens, and were subsequently cultivated for the production of the mushrooms used for this work. The fruiting bodies were collected, lyophilized and analysed for fatty acids, sterols and simple phenolics by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Total phenolic content of mushrooms extracts was determined by the Folin-Ciocalteu assay, while their antioxidant potential was evaluated through measuring (a) the free radical scavenging capacity (b) the ferric reducing power and (c) the inhibition of human serum lipoproteins oxidation.

The results showed that the wild Greek *P. ostreatus* strains contain a variety of bioactive compounds and exhibit antioxidant activity at similar levels to the corresponding commercial and wild imported mushrooms. Given that the annual consumption of mushrooms in Greece reaches 11,000 tons with only a very small fraction covered by domestic production, it is concluded that indigenous *Pleurotus*

strains could be potentially used for commercial purposes, such as for the formulation of functional foods and dietary supplements.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Γενικές πληροφορίες (Μύκητες – μανιτάρια – <i>Pleurotus ostreatus</i>)	15
1.1.1 Μύκητες	15
1.1.2 Μανιτάρια	16
1.1.3 Το γένος <i>Pleurotus</i>	17
1.2 Σύσταση και διατροφική αξία.....	19
1.3 Πολυφαινόλες.....	31
1.3.1 Φαινολικά οξέα	32
1.3.2 Φλαβόνες	33
1.3.3 Ανθοκυάνες	33
1.3.4 Κατεχίνες.....	344
1.3.5 Ταννίνες.....	34
1.3.6 Δράση πολυφαινολών	34
1.3.7 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών	37
1.3.8 Παρουσία πολυφαινολών στα μανιτάρια	38
1.4 Αντιοξειδωτική δράση και αντιοξειδωτικό περιεχόμενο	39
1.5 Τεχνικές.....	42
1.5.1 Λυοφιλίωση (freeze drying)	42
1.5.2 Αντίδραση σιλυλίωσης	43
1.5.3 Αέρια χρωματογραφία (GC).....	44
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	47
2.1 Δείγματα.....	47
2.2 Μελέτη βιοδραστικών συστατικών.....	48
2.2.1 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών με αέρια χρωματογραφία	48
2.2.2 Προσδιορισμός Πολυφαινολών	52
2.2.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	577
2.3 Αντιοξειδωτικές δοκιμές	58
2.3.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασισμένη στη δέσμευση της 1,1- διφαινυλο-2-πικρυλο-ϋδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)	58

2.3.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe ⁺³ σε Fe ⁺² (ferric reducing antioxidant power, FRAP).....	60
2.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των δειγμάτων <i>Pleurotus ostreatus</i> στις λιποπρωτεΐνες ορού	62
2.4 Στατιστική επεξεργασία	63
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 Πληροφορίες για την καλλιέργεια.....	65
3.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων σε βιοδραστικά συστατικά	65
3.2.1 Περιεκτικότητα δειγμάτων <i>P. ostreatus</i> σε λιπαρά οξέα.....	66
3.2.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων <i>P. ostreatus</i> σε στερόλες.....	68
3.2.3 Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά	72
3.2.4. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	72
3.3 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των εκχυλισμάτων των μανιταριών	73
3.3.1 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• (2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl radical scavenging assay).....	74
3.3.2 Ικανότητα αναγωγής του Fe ³⁺ (FRAP, Ferric anion Reducing Antioxidant Power)	75
3.3.3 Προστατευτική επίδραση των δειγμάτων <i>Pleurotus</i> έναντι στην οξείδωση της LDL.....	76
3.4 Συνολική αξιολόγηση δείγματος	77
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
4.1 Πληροφορίες για την καλλιέργεια.....	80
4.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων σε βιοδραστικά συστατικά	80
4.2.1 Περιεκτικότητα δειγμάτων <i>P. ostreatus</i> σε λιπαρά οξέα.....	81
4.2.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων <i>P. ostreatus</i> σε στερόλες.....	82
4.2.3 Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά	82
4.2.4. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu).....	83
4.3 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των εκχυλισμάτων των μανιταριών	83
4.3.1 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• (2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl radical scavenging assay).....	83
4.3.2 Ικανότητα αναγωγής του Fe ³⁺ (FRAP, Ferric anion Reducing Antioxidant Power)	83
4.3.3 Προστατευτική επίδραση των δειγμάτων <i>Pleurotus</i> έναντι στην οξείδωση της LDL.....	84
3.4 Συνολική αξιολόγηση δείγματος	85

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87
-------------------	----

Λίστα πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση μυκήτων του γένους *Pleurotus*

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα νωπώνμανιταριών *Pleurotus* σε αμινοξέα.

Πίνακας 3. Βιταμίνες(mg/100g) σε νωπάμανιτάρια *Pleurotus*

Πίνακας 4. Ανόργανα συστατικά(mg/100g) σε νωπάμανιτάρια

Πίνακας 5. Περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά των καρποφοριών του μύκητα *P. ostreatus* var. *salignus* (υπολογισμοί % ξηράς ουσίας)

Πίνακας 6. Τα στελέχημανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* που εξετάστηκαν

Πίνακας 7. Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με GC/MS

Πίνακας 8. Καλλιεργητικά δεδομένα των στελεχών *P. ostreatus* που μελετήθηκαν

Πίνακας 9. Περιεκτικότητα δειγμάτων σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA), και πολυακόρεστα (PUFA) λιπαρά οξέα

Πίνακας 10. Συμμετοχή των 3 σημαντικότερων λιπαρών οξέων επί του συνόλου των λιπαρών οξέων των δειγμάτων

Πίνακας 11. Περιεκτικότητα των στελεχών *P. ostreatus* σε εργοστερόλη

Πίνακας 12. Περιεκτικότητα στελεχών *Pleurotus ostreatus* σε φαινολικές ενώσεις και τερπενικά οξέα (μg/100g νωπού βάρους)

Πίνακας 13. Περιεκτικότητα των στελεχών *P. ostreatus* σε ολικά φαινολικά συστατικά

Πίνακας 14. Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• των στελεχών *P. ostreatus*

Πίνακας 15. Ικανότητα αναγωγής Fe^{+3} των στελεχών *P. ostreatus*

Πίνακας 16. Επαγόμενη από τα εκχυλίσματα *P. ostreatus* αύξηση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξειδωση από χαλκό

Πίνακας 17. Συνολική αξιολόγηση των 16 στελεχών που μελετήθηκαν

Πίνακας 18. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιεκτικότητα σε εργοστερόλη 16 στελεχών *Pleurotus ostreatus*.

Λίστα σχημάτων

Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα εργοστερόλης

Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος

Σχήμα 3. Καμπύλη αναφοράς Trolox

Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος

Σχήμα 5. Κινητική μελέτη της παραγωγής συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια της οξειδωσης λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού από Cu^{+2} , χωρίς (μάρτυρα-Control) και με την παρουσία μεθανολικού εκχυλίσματος *P.Ostreatus* (sample).

Σχήμα 6. Περιεκτικότητα των στελεχών *P. ostreatus* σε εργοστερόλη (mg/100g f.w.)

Σχήμα 7. Περιεκτικότητα των στελεχών *Pleurotus ostreatus* σε ολικά φαινολικά συστατικά

Σχήμα 8. Ικανότητα αναγωγής του Fe^{3+} από τα 16 στελέχη που μελετήθηκαν (mmol TE / 100 g f.w.)

Σχήμα 9. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των 16 στελεχών εκφρασμένο σε $\mu\text{g/ml}$

Λίστα εικόνων

Εικόνα 1. Μορφολογία μανιταριού

Εικόνα 2. Ανάπτυξη μανιταριών του είδους *P. ostreatus* στη φύση

Εικόνα 3. Ποιότητα πρωτεΐνης μανιταριών *Pleurotus*

Εικόνα 4. Τα φαινολικά οξέα

Εικόνα 5. Φλαβονόλες

Εικόνα 6. Η απορρόφηση πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό

Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών

Εικόνα 8. Σιλυλίωση με δι-τριμεθυλσιλυλ -τριφθοροακεταμίδιο

Εικόνα 9. Η ελεύθερη ρίζα DPPH•

Εικόνα 10. Χρωματογράφημα GC-MS για λιπαρά οξέα δείγματος *P.ostreatus*

Εικόνα 11. Χρωματογράφημα GC-MS των στερολών δείγματος *P.ostreatus*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρουσία μανιταριών στην Ελλάδα αριθμεί περισσότερα από 2100 καταγεγραμμένα είδη, τα οποία συναντώνται σε όλη την επικράτεια και ορισμένα από αυτά συλλέγονται για διατροφικούς σκοπούς [1]. Διεθνώς, έχουν περιγραφεί 14000 είδη ενώ ο αριθμός των εδώδιμων μανιταριών ανέρχεται σε 2000 είδη, από τα οποία τα πιο γνωστά και εμπορικά αποτελούν ποικιλίες του είδους *Agaricus bisporus*, το λευκό μανιτάρι, που καταναλώνεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα, το crimini και το portabella. Άλλα εμπορικά είδη είναι τα *Lentinus edodes* (λεντινούλα, shiitake), *Volvariella volvacea* (straw), *Pleurotus ostreatus* (oyster) και *Flammulina ostreatus* (enoki) [2].

Η Ελλάδα παρουσιάζει σχετικά σύντομη παράδοση στην καλλιέργεια μανιταριών, η οποία προσμετρά περίπου 60 χρόνια. Η καλλιέργεια ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960, με την καλλιέργεια σε πρωτόγονες συνθήκες μανιταριών του είδους *Agaricus bisporus*, και εξελίχθηκε έκτοτε σε καλλιέργειες σε ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις, αρχικά κατά την περίοδο 1976-1985, χωρίς την χρήση κατάλληλου εξοπλισμού και εξειδικευμένου προσωπικού, και μετά τη δεκαετία του 1990 με τη λειτουργία σύγχρονων μονάδων μεγάλης κλίμακας. Παράλληλα, το μανιτάρι ως προϊόν άρχισε να γίνεται περισσότερο γνωστό στον καταναλωτή [3].

Κατά τη δεκαετία του 1990 άρχισε η καλλιέργεια μανιταριών του γένους *Pleurotus*, ενώ μέχρι τότε το *Agaricus bisporus* αποτελούσε το μόνο καλλιεργούμενο είδος. Η ποικιλότητα στην προσφορά μανιταριών επηρέασε θετικά τη ζήτηση μανιταριών στη χώρα μας, όπως και η πρόσφατη έρευνα που γίνεται πάνω στις ευεργετικές ιδιότητες των τροφίμων για την υγεία του καταναλωτή. Ωστόσο μέχρι σήμερα η εγχώρια ζήτηση δεν είναι δυνατόν να καλυφθεί από τις παραγόμενες ποσότητες, οπότε πραγματοποιούνται εισαγωγές από άλλες χώρες [3].

Ανάμεσα στους εδώδιμους εμπορικούς μακρομύκητες που καλλιεργούνται στις δυτικές χώρες, μόνο δύο γένη, τα *Agaricus* και *Pleurotus* παράγουν

καρποφορίες σε ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας [4]. Η παγκόσμια παραγωγή μανιταριών του γένους *Pleurotus spp.* αυξάνεται με επιταχυνόμενους ρυθμούς τα τελευταία χρόνια. Το 1986, η παραγωγή μανιταριών του γένους *Pleurotus spp.* αντιπροσώπευε περίπου το 7% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής εδώδιμων μανιταριών, ενώ από το 1990, η παραγωγή τους ανήλθε σε ένα εκατομμύριο μετρικούς τόνους και αντιπροσώπευε το 24% της συνολικής παραγωγής εδώδιμων μανιταριών [4].

Τα μανιτάρια φαίνεται ότι παρουσιάζουν ένα πολλές φαρμακευτικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης της αντιικής, αντιβακτηριακής, αντικαρκινικής, ανοσορρυθμιστικής, καθώς και υποχοληστερολαιμικής. Αυτές οι δράσεις αποδίδονται σε μία ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων που έχουν ανιχνευτεί στα μανιτάρια, όπως φαινολικές ενώσεις, πολυπεπτίδια, τερπένια, στεροειδή, λεκτίνες, πολυσακχαρίτες (όπως β-γλυκάνες) και σύμπλοκα πολυσακχαριτών-πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα μανιτάρια αποτελούν τροφή χαμηλής θερμιδικής αξίας, χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο και ταυτόχρονα υψηλής διατροφικής αξίας, όντας πολύ καλή πηγή βιταμίνης Β, φυλλικού οξέος, φωσφόρου, καλίου, φυτικών ινών και πρωτεϊνών [2].

1.1 Γενικές πληροφορίες (Μύκητες – μανιτάρια – *Pleurotus ostreatus*)

1.1.1 Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ξεχωριστό βασίλειο και διαφέρουν σημαντικά από τα πράσινα φυτά, με κύρια διαφορά την απουσία χλωροφύλλης και τη σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Εξαιτίας του ότι διαφέρουν επιπλέον τόσο από τα φύκη, όσο και από τα βακτήρια, δεν ταξινομούνται ούτε στο φυτικό ούτε στο ζωικό βασίλειο, αλλά τοποθετούνται σε ένα τρίτο βασίλειο, ανάμεσα στα προαναφερθέντα [5].

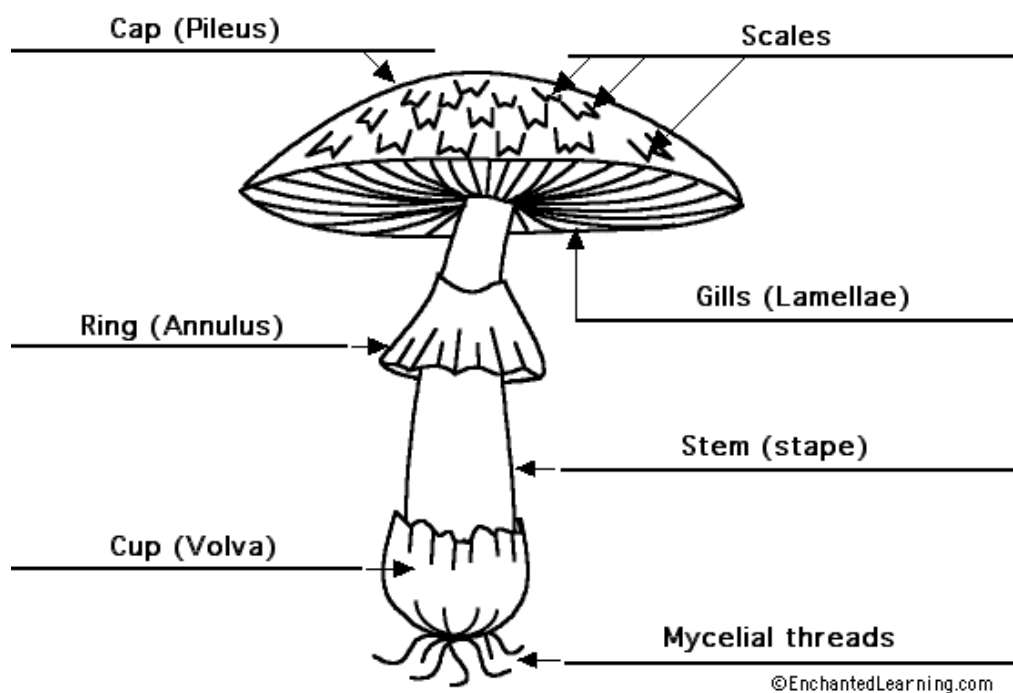
Πρόκειται για ετερότροφους, ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι χρησιμοποιούν τη διαδικασία της απορρόφησης για να προσλάβουν θρεπτικά συστατικά από το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται [6].

Οι μύκητες μπορεί να αποτελούνται από ένα μόνο κύτταρο, οπότε ονομάζονται μονοκύτταροι ή από περισσότερα κύτταρα οπότε ονομάζονται πολυκύτταροι. Οι πολυκύτταροι μύκητες έχουν υφές, οι οποίες παρουσιάζουν

εγκάρσια διαφράγματα ανά διαστήματα. Οι υφές είναι λεπτά νημάτια που διακλαδίζονται και σχηματίζουν το σώμα του μύκητα. Επειδή το σώμα αποκαλείται και μυκήλιο, οι μύκητες που διαθέτουν αυτό το χαρακτηριστικό καλούνται μυκηλιακοί [6].

1.1.2 Μανιτάρια

Μανιτάρια σχηματίζουν οι πολυκύτταροι Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες. Οι βασιδιομύκητες διαθέτουν ειδικές εξωτερικές αναπαραγωγικές δομές, τα «βασίδια», όπου φέρονται τα σπόρια τους. Τα βασίδια με τα φερόμενα βασιδιοσπόρια βρίσκονται τοποθετημένα στην κάτω επιφάνεια του πύλου



(καπέλου).

Εικόνα 1. Μορφολογία μανιταριού [7]

Τα μανιτάρια αποτελούν τις καρποφορίες των μυκήτων. Η καρποφορία του μύκητα αποτελείται από το καρπόσωμα (δηλαδή το σώμα του μανιταριού) και τον θαλλό ή μυκήλιο που δεν είναι ορατός αλλά αναπτύσσεται και διακλαδίζεται στο

υπόστρωμα ανάπτυξης του μανιταριού. Στο καρπόσωμα διακρίνονται ο κεντρικός στύπος (stipe) και ο πίλος (pileus). Οι καρποφορίες διαρκούν από 10-14 ημέρες ή και λιγότερο [8]. Υπολογίζεται ότι κάθε ανεπτυγμένος μύκητας παράγει 15-20 δισεκατομμύρια σπόρια, τα οποία ελευθερώνονται από το μητρικό σώμα και βλαστάνουν δίνοντας νέα μυκήλια, εφόσον βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες.

1.1.3 Το γένος *Pleurotus*

Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* ανήκουν στους βασιδιομύκητες. Μορφολογικά χαρακτηρίζονται από εδωδίμες καρποφορίες με έκκεντρο στύπο, το μέγεθος του οποίου μπορεί να είναι κοντό ή μακρύ, ενώ ενδέχεται και να απουσιάζει. Στον στύπο επισυνάπτεται ο πίλος, ενώ απουσιάζουν δαχτυλίδι και βόλβα. Ο πίλος ανοίγει σαν όστρακο στρειδιού κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης για αυτό το λόγο το συγκεκριμένο είδος αποκαλείται και μανιτάρι–στρείδι (oyster mushroom). Παρατηρείται διαφοροποίηση αναφορικά με το μέγεθος των μανιταριών του γένους *Pleurotus* ανάμεσα στα διάφορα είδη, καθώς και ποικιλομορφία ανάμεσα σε μανιτάρια του ίδιου είδους, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης τους (κλιματολογικές, σύσταση του υποστρώματος κ.α.). Το πλάτος των καρποφοριών κυμαίνεται από 2-3 cm και φτάνει μέχρι 15-20 cm. Ποικιλομορφία εμφανίζεται, επίσης, και ανάμεσα σε μανιτάρια του ίδιου είδους [9]. Αναφέρεται, για παράδειγμα, ότι το χρώμα των μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* κυμαίνεται από λευκό μέχρι γκρι, καφέ ή μελανόχρωμο και η παραλλακτικότητα ανάμεσα στα είδη αποδίδεται στη μεγάλη διασπορά και στην γενετική απομόνωση ανάμεσα στις ηπείρους [10]. Στο *Pleurotus ostreatus* ο στύπος έχει άσπρο χρώμα και είναι μικρός σε μέγεθος και πλευρικός. Η σάρκα είναι αρωματική, ενώ τα σπόρια έχουν γυάλινο χρώμα, που κλίνει προς ροδολουλακί και κυλινδρικό σχήμα [11].

Πίνακας 1. Ταξινόμηση μυκήτων του γένους *Pleurotus* [10]

Domain	Eukarya
Βασίλειο	Fungi
Συνομοταξία	Basidiomycota
Ομοταξία	Agaricomycetes
Τάξη	Agaricales

Οικογένεια	Pleurotacea
Γένος	Pleurotus
Είδος	<i>Pleurotus ostreatus</i>

Τα είδη *Pleurotus* αποτελούν μία τάξη εδωδιμων μανιταριών που φημίζονται για την αυξημένη σαπροφυτική τους ικανότητα και τη δυνατότητα ανάπτυξης σε μεγάλη ποικιλία κυτταρινούχων υποστρωμάτων-αποβλήτων [4]. Απαντώνται στη φύση σε απονεκρωμένους κορμούς δέντρων ή πεσμένα δέντρα (αγγειόσπερμα), όπου σαπροφυτούν, ενώ η ικανότητα αποικοδόμησης φυτικών υπολειμμάτων αποδίδεται στον μεγάλο αριθμό υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων που διαθέτουν [9]. Η ανάπτυξη τους σε δένδρα με μαλακό ξύλο, όπως λεύκα ή ιτιά, είναι ταχύτερη με εναλλαγή των βιολογικών κύκλων κατά τη διάρκεια 2-3 ετών. Αντίθετα, σε δέντρα με σκληρό ξύλο, όπως οξιά ή βελανιδιά, παρατηρείται βραδύτερη ανάπτυξη του μυκηλίου και έναρξη της καρποφορίας κατά το δεύτερο έτος και εναλλαγή των βιολογικών κύκλων για 4-5 χρόνια [5].



Εικόνα 2. Ανάπτυξη μανιταριών του είδους *P. ostreatus* στη φύση [12]

Εμφανίζουν ευρεία διασπορά στην βόρεια εύκρατη ζώνη, καθώς αναπτύσσονται σε δάση της Βόρειας Αμερικής, της Ευρώπης και της Ασίας [10, 12]. Ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες μπορούν να αναπτυχθούν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (σε νοτιότερες περιοχές) ή κατά τους μήνες Μάρτιο έως Νοέμβριο (σε βορειότερες περιοχές) [12].

Στο γένος *Pleurotus* περιλαμβάνονται περί τα 15 διαφορετικά είδη, με σημαντικότερα τα *P. ostreatus*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*. [9]. Παρατηρείται μία σύγχυση κατά τον διαχωρισμό των ειδών στη φύση, καθώς συχνά τα είδη *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* και *P. populinus* συγχέονται μεταξύ τους και καλούνται όλα *P. ostreatus*. Στην πραγματικότητα τα είδη *P. ostreatus* και *P. pulmonarius* διαφέρουν ως προς το σχήμα του καρποσώματος, που στο *P. pulmonarius* μοιάζει με το σχήμα των πνευμόνων, ενώ στο *P. ostreatus* είναι περισσότερο συμμετρικό. Επιπλέον, διαφοροποιούνται ως προς την εποχή ανάπτυξης, καθώς το *P. ostreatus* αναπτύσσεται στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική από τα τέλη του Φθινοπώρου μέχρι το Χειμώνα, ενώ το *P. pulmonarius* καρποφορεί από τα μέσα του Καλοκαιριού έως τις αρχές του Φθινοπώρου [12].

Περισσότερα από 40 είδη του γένους *Pleurotus spp.* απαντώνται σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης, ενώ στη χώρα μας απαντάται φυσικά σε όλη την επικράτεια, εξαπλωμένο από τους Θρακιώτικους λευκώνες έως και τους Κρητικούς ελαιώνες. Επιπρόσθετα, παρασιτεί στο ρίζωμα των φυτών *Eryngium campestre*, *Lasertitium latifolium*, *Ferula communis* της οικογένειας των *Ammicaceae* [5]. Ο «Πλευρωτός ο οστρεώδης», όπως είναι το επιστημονικό του όνομα στα ελληνικά, φέρει και τη λαϊκή ονομασία «ελατομανίτης», καθώς συναντάται αναπτυγμένος σε πυκνές τούφες σε κορμούς δένδρων, από το Φθινόπωρο έως το Χειμώνα [11].

Η καλλιέργεια μανιταριών του γένους *Pleurotus spp.* για βρώση έχει αποκτήσει ενδιαφέρον και μεγάλη έκταση εξαιτίας της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών που κυμαίνεται σε 10-35°C και σε διάφορα λιγνο-κυτταρινικά υποστρώματα, καθώς και της μικρότερης διάρκειας καλλιέργειας σε σύγκριση με άλλα γένη, όπως για παράδειγμα το γένος *Agaricus spp.* [4].

Μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, γεγονός που διευκολύνει την καλλιέργεια τους, μειώνει το κόστος παραγωγής και επιδρά θετικά στην εμπορικότητα τους [4].

1.2 Σύσταση και διατροφική αξία

Τα μανιτάρια *Pleurotus* διαθέτουν ιδιαίτερη υφή και γεύση που προτιμά ο καταναλωτής [9], ενώ γενικότερα ως τροφή καταναλώνεται τόσο από χορτοφάγους όσο και από το λοιπό πληθυσμό. Πολλές επιστημονικές έρευνες καταδεικνύουν την υψηλή διατροφική αξία των μανιταριών, καθώς και την παρουσία πολλών βιοενεργών συστατικών, τα οποία έχουν θετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου [13].

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό της σύστασης ποικίλων ειδών του γένους *Pleurotus*, μεταξύ των οποίων και του *Pleurotus ostreatus*. Πέρα από τον προσδιορισμό της σύστασης, έρευνες διεξάγονται για την ανίχνευση συγκεκριμένων ενώσεων, οι οποίες έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, [2]. Διαθρεπτικά στοιχεία αναφορικά με τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* που παρέχονται από το Αμερικανικό Υπουργείο Γεωργίας παρατίθενται στη συνέχεια [14]. Τα μανιτάρια αποτελούν τροφή χαμηλής θερμιδικής αξίας, χαμηλής λιποπεριεκτικότητας και υψηλής περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες και πρωτεΐνες, γεγονός που τα καθιστά πολύτιμη τροφή για άτομα με αυξημένη χοληστερόλη [13, 15]. Τα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* φαίνεται ότι περιέχουν αρκετές βιοδραστικές ενώσεις που μπορεί να ευθύνονται για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες. Σε αυτές περιλαμβάνονται η λοβαστατίνη, οι β-γλυκάνες, η λεκτίνη, οι πολυφαινόλες, η εργοστερόλη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η εργοθειονίνη, και οι βιταμίνες C και E [16].

❖ **Θερμιδική αξία:** Τα μανιτάρια *Pleurotus* είναι τρόφιμο χαμηλής θερμιδικής αξίας, καθώς 100g νωπού τροφίμου αποδίδουν 43 kcal (110 kJ), από τις οποίες 4 kcal οφείλονται στα λιπαρά, 26,1 kcal οφείλονται στους υδατάνθρακες και 13,2 kcal οφείλονται στις πρωτεΐνες [14]. Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία για τη βιοδιαθεσιμότητα και την πεπτικότητα των μανιταριών. Η υψηλή περιεκτικότητα τους σε άπεπτη χιτίνη περιορίζει τη διαθεσιμότητα άλλων συστατικών [8].

❖ **Ξηρά ουσία:** Τα μανιτάρια *Pleurotus* περιέχουν 88,8% νερό (συνεπώς 11,2% ξηρά ουσία) και 1,0% τέφρα, σύμφωνα με τον USDA [14]. Γενικότερα,

αναφέρεται ότι τα μανιτάρια περιέχουν 90% νερό, ενώ οι Manzi et al. [17] προσδιόρισαν τιμές υγρασίας που κυμάνθηκαν από 85,24% έως 94,70% σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus*. Οι ερευνητές απέδωσαν τη μεγάλη παραλλακτικότητα που διαπίστωσαν στην περιεχόμενη υγρασία στο είδος του μανιταριού, καθώς είχαν τυποποιήσει τους παράγοντες που σχετίζονταν με τις συνθήκες μετασυλλεκτικής μεταχείρισης και αποθήκευσης. Οι τιμές ξηράς ουσίας των μανιταριών *P. ostreatus* που εντοπίστηκαν στη βιβλιογραφία διαφοροποιούνται ανάμεσα στους διάφορους ερευνητές, ωστόσο είναι μικρότερες από εκείνες που δίνονται από τον USDA. Έτσι λοιπόν, οι Lam & Okello [16] αναφέρουν ότι τα μη επεξεργασμένα, ακατέργαστα μανιτάρια περιείχαν 8,3% ξηρά ουσία, τιμές παρόμοιες με εκείνες που αναφέρουν οι Jaworska and Bernas [18] (8,79%) και οι Mattila et al. [19] (7,07 – 8,04%), αλλά χαμηλότερες από την τιμή των 10,3% που αναφέρθηκε από τους Yim et al. [20]. Ανεξάρτητα από το είδος των μανιταριών, η περιεκτικότητά τους σε ξηρά ουσία κυμαίνεται μεταξύ 60-140 g/Kg (δηλαδή 6-14%) με συνηθέστερη τιμή τα 100 g/Kg [8].

- ❖ **Υδατάνθρακες:** Η περιεκτικότητα των μανιταριών *Pleurotus* σε υδατάνθρακες ανέρχεται σε 6,5g ανά 100g νωπού τροφίμου, από τα οποία 2,3g αποτελούν οι φυτικές ίνες και 1,1g τα σάκχαρα. Το κύριο σε ποσότητα σάκχαρο είναι η γλυκόζη [14]. Σε άλλα γένη μανιταριών αναφέρονται πέρα από τη γλυκόζη, ποσότητες α-τρεαλόζης και μαννιτόλης. Η μαννιτόλη φαίνεται ότι συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρποσώματος σε όγκο και σκληρότητα και η ποσότητα της διαφέρει πολύ ανάμεσα στα διάφορα γένη μανιταριών [8]. Δεν περιέχεται άμυλο, καθώς ο αποθηκευτικός υδατάνθρακας των μανιταριών είναι το γλυκογόνο, το οποίο βρίσκεται σε ποσότητα 5-10% επί του ξηρού βάρους του μανιταριού [8]. Ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι τα μανιτάρια αποτελούν σημαντική πηγή φυτικών ινών, κυρίως χιτίνης, ενώ περιέχονται και ποσότητες πολυσακχαριτών με ευεργετική δράση για την υγεία, όπως είναι οι γλυκάνες [2]. Η χιτίνη είναι ένας αδιάλυτος δομικός πολυσακχαρίτης, που ποσοτικά αντιστοιχεί σε 80-90% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος των μανιταριών. Πέρα από τη χιτίνη, τα μανιτάρια περιέχουν και άλλους δομικούς πολυσακχαρίτες, όπως ημικυτταρίνες και πηκτίνες [8].

β-γλυκάνες: Η γλυκάνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, δηλαδή μία δεξτράνη. Πολυσακχαρίτες της κατηγορίας των β- γλυκανών και σύμπλοκα πολυσακχαριτών–πρωτεϊνών από συγκεκριμένα είδη μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντικαρκινικές έρευνες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [16].

Νωπά μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* βρέθηκαν να περιέχουν 23.9% β-γλυκάνη, ποσότητα που αποτελούσε το 88% της συνολικής ποσότητας γλυκανών που προσδιορίστηκε στα μανιτάρια. Άλλοι ερευνητές βρήκαν παρόμοιες ποσότητες της ουσίας χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο σε μανιτάρια του ίδιου είδους, ενώ οι Gil-Ramirez et al. [21] ανέφεραν τη μέγιστη περιεκτικότητα των μανιταριών του είδους *P. ostreatus* σε β-γλυκάνη που ανήλθε σε 40 g/100 g ξηρού βάρους [21]. Η παραλλακτικότητα ανάμεσα στα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αποδίδεται στην επίδραση παραγόντων όπως η προέλευση των μανιταριών, οι συνθήκες ανάπτυξης (π.χ. θερμοκρασία, υπόστρωμα, pH), και η ωριμότητα των καρποσωμάτων κατά τη συγκομιδή [16].

❖ **Λιπίδια και λιπαρά οξέα:** Τα μανιτάρια έχουν χαμηλή λιποπεριεκτικότητα, ενώ το προφίλ των λιπαρών οξέων τους είναι ευεργετικό για την υγεία [8]. Τα συνολικά λιπαρά ανέρχονται σε 0,4g, ανά 100g νωπών μανιταριών *Pleurotus*. Αναφορικά με την περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά, περιέχονται μόνο 20mg παλμιτικού οξέος. Περιέχονται ακόμη 40mg λινελαϊκό οξύ (πολυακόρεστο, ω-6-λιπαρό οξύ) και 10mg ελαϊκό οξύ (μονοακόρεστο λιπαρό οξύ) [14]. Η σύσταση του μανιταριού σε λιπαρά οξέα ότι επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη του. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι κατά την ανάπτυξη των μανιταριών σε θερμοκρασίες μικρότερες από 17°C παρατηρείται αυξημένη αναλογία των ακόρεστων λιπαρών οξέων [22]. Το κύριο φωσφολιποειδές που συναντάται στα μανιτάρια είναι η φωσφατιδυλοχολίνη [8].

❖ **Πρωτεΐνες:** Η περιεκτικότητα των μανιταριών *Pleurotus* σε πρωτεΐνες ανέρχεται σε 3,3g ανά 100g νωπού βάρους, υπολογισμένη χρησιμοποιώντας τον συντελεστή μετατροπής 6,25 [14]. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε

καλλιεργώντας το είδος *P. ostreatus* var. *salignus* σε τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα προσδιορίστηκαν ποσότητες πρωτεϊνών που κυμάνθηκαν από 23,5% έως 34,6% (εκφρασμένη % ξηρού βάρους) [4]. Η πρωτεΐνη του μανιταριού θεωρείται ότι έχει υψηλότερη βιολογική αξία από τις πρωτεΐνες των πράσινων λαχανικών [4]. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας των μανιταριών σε μη-πρωτεϊνικό άζωτο, κυρίως χιτίνη, έχει προταθεί η χρήση του συντελεστή 6,14 αντί για 6,25 κατά την μετατροπή του αζώτου που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Kjeldahl σε πρωτεΐνη [23], ενώ οι Barros et al. [13] προτείνουν τη χρήση του συντελεστή μετατροπής 4,38. Για αυτό το λόγο οι περιεκτικότητες των μανιταριών σε πρωτεΐνη που είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία, είναι πιθανότατα υπερεκτιμημένες και θα πρέπει να λαμβάνονται με προσοχή καθώς συνυπολογίζεται στις τιμές που δίνονται η περιεκτικότητα των μανιταριών σε αυτούς τους πολυσακχαρίτες. Οι Manzi et al. [17] χρησιμοποίησαν τον συντελεστή 4,38 για να υπολογίσουν την πρωτεΐνη στο είδος *P. ostreatus* και διαπίστωσαν μεγάλη παραλλακτικότητα, καθώς οι τιμές πρωτεΐνης σε ξηρή βάση κυμάνθηκαν 4,55 έως 7,93%. Οι ερευνητές απέδωσαν την παρατηρούμενη διακύμανση στο μεγάλο βαθμό γενετικής διαφοροποίησης που έχει υποστεί το συγκεκριμένο είδος μύκητα [17]. Οι ίδιοι ερευνητές ωστόσο επισημαίνουν ότι η περιεκτικότητα κάθε είδους σε χιτίνη διαφέρει, με αποτέλεσμα η χρήση του συντελεστή 4,38 να μην είναι κατάλληλη σε όλες τις περιπτώσεις μανιταριών, και προτείνουν την εκτίμηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης από το άθροισμα των ποσοτήτων των επιμέρους αμινοξέων, εκφρασμένων ως ποσοστό επί ξηρού ή νωπού βάρους.

Οι Vetter and Rimoczi [24] ανέφεραν τις υψηλότερες τιμές πρωτεΐνης σε καλλιεργημένα *Pleurotus ostreatus*, καθώς και το υψηλότερο ποσοστό πεπτικότητας, ίσο με 92%. Στο στάδιο ανάπτυξης όπου ο πύλος είχε διάμετρο 5–8 cm, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ανήλθε σε 36,4% στον πύλο και 11,8% στον στύπο, επί ξηρού. Σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης τόσο η περιεχόμενη πρωτεΐνη, όσο και η πεπτικότητα αυτής μειώθηκαν [24].

- ❖ **Αμινοξέα:** Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε αμινοξέα είναι χαμηλή και αντιπροσωπεύει το 1% της ξηρής ουσίας. Η σύνθεση σε μεμονωμένα αμινοξέα φαίνεται στον Πίνακα 2 [14]. Το γλουταμινικό οξύ, το ασπαραγινικό οξύ και η αλανίνη είναι τα σημαντικότερα σε ποσότητα αμινοξέα στα

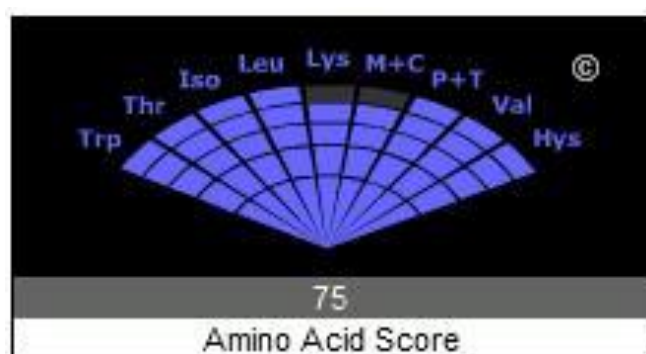
μανιτάρια του γένους *Pleurotus* [14], ενώ τα μανιτάρια του είδους *Pleurotus ostreatus* φαίνεται ότι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες γλουταμινικού οξέος, ασπαραγινικού οξέος και αργινίνης [17]. Πέρα από τα αμινοξέα που δίνονται στον Πίνακα 2, σε καλλιεργημένα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* έχει αναφερθεί και η παρουσία ορνιθίνης και γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA) [17], αμινοξέα που χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη φυσιολογική δράση. Συγκεκριμένα, το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ είναι ένα μη-απαραίτητο αμινοξύ που λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα μειώνοντας τη δραστηριότητα των νευρώνων, ενώ η ορνιθίνη αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση της αργινίνης [17].

Πίνακας 2. Αμινοξέα (mg/100 g) σε νωπά μανιτάρια *Pleurotus* [14]

Αμινοξύ	mg/100g fw	Αμινοξύ	mg/100g fw
Θρυπτοφάνη	42	Λευκίνη	168
Θρεονίνη	140	Λυσίνη	126
Ισολευκίνη	112	Μεθειονίνη	42
Κυστίνη	28	Φαινυλαλανίνη	112
Τυροσίνη	84	Βαλίνη	197
Αργινίνη	182	Ιστιδίνη	70
Αλανίνη	239	Ασπαραγινικό οξύ	295
Γλουταμινικό οξύ	632	Γλυκίνη	126
Προλίνη	42	Σερίνη	126

Από τον Πίνακα 2 προκύπτει ότι τα μανιτάρια *Pleurotus* περιέχουν 18 αμινοξέα, πολλά από αυτά σε σημαντικές ποσότητες που καλύπτουν τις ανάγκες του ανθρώπου. Υπολείπονται όμως στις ποσότητες των θειούχων αμινοξέων λυσίνης, μεθειονίνης και κυστίνης, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3. Έρευνες έχουν συνδέσει τα μανιτάρια με την παρουσία του θειούχου αμινοξέος εργοθειονίνη. Η εργοθειονίνη δεν συντίθεται από τον ανθρώπινο οργανισμό και διαθέτει ένα μοναδικό σύστημα μεταφοράς στα θηλαστικά, γεγονός που την καθιστά σημαντική για την ανθρώπινη υγεία.

Παρουσία εργοθειονίνης έχει ανιχνευθεί σε περιορισμένες διαιτητικές πηγές, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και τα μανιτάρια [2].



Εικόνα 3. Ποιότητα πρωτεΐνης μανιταριών *Pleurotus* [25]

- ❖ **Βιταμίνες:** Τα μανιτάρια *Pleurotus* περιέχουν σημαντικές ποσότητες ριβοφλαβίνης, νιασίνης και παντοθενικού οξέος, με 100g μανιταριών να καλύπτουν 21%, 25% και 13% της απαιτούμενης ημερήσιας ποσότητας [14]. Επιπρόσθετα, περιέχουν ποσότητες άλλων βιταμινών, οι οποίες φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Βιταμίνες σε 100 g νωπών μανιταριών *Pleurotus* [14]

Βιταμίνη	Ποσότητα	Βιταμίνη	Ποσότητα
Βιταμίνη Α	48,0 IU	Βιταμίνη Β6	0,1 mg
Ριβοφλαβίνη	0,3 mg	Φολικό οξύ	27,0 μg
Νιασίνη	5,0 mg	Χολίνη	48,7 mg
Παντοθενικό οξύ	1,3 mg	Βεταΐνη	12,1 mg

Στα δεδομένα που παρέχει το USDA [14] δεν αναφέρεται περιεκτικότητα σε βιταμίνη D, ωστόσο οι Phillips et al. [26] που διερεύνησαν την παρουσία της σε δείγματα μανιταριών διαφόρων γενών αναφέρουν ότι προσδιόρισαν πολύ μικρές ποσότητες εργοκαλσιφερόλης (βιταμίνης D₂) σε μανιτάρια του είδους *Pleurotus ostreatus* σε ποσότητες που κυμάνθηκαν μεταξύ 0,07 - 2,59 μg/100 g νωπού προϊόντος και ήταν κατά μέσο όρο 0,72 μg/100 g νωπού προϊόντος. Η βιταμίνη D θεωρείται ζωτικής σημασίας για την υγεία των οστών, ενώ

πρόσφατα διαπιστώθηκε ο ρόλος της στη καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην πρόληψη ορισμένων τύπων καρκίνου και άλλων ασθενειών. Η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) παράγεται στο δέρμα κατά τη διάρκεια της έκθεσης του ανθρώπου σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, ωστόσο, τα άτομα με ανεπαρκή έκθεση στον ήλιο βασίζονται σε βιταμίνη D που προσλαμβάνουν μέσω της τροφής και στα συμπληρώματα για την απόκτηση επαρκούς ποσότητας αυτής [26].

❖ **Τέφρα:** Ταμανιτάρια *Pleurotus* περιέχουν 1,0% τέφρα, σύμφωνα με τον USDA [14], ενώ οι Manzi et al. [17] προσδιόρισαν στο είδος *Pleurotus ostreatus* ποσότητες τέφρας που κυμάνθηκαν από 6,9 έως 10,5% επί ξηρού και από 0,52 έως 1,15% νωπού βάρους.

❖ **Ανόργανα συστατικά:** Ταμανιτάρια *Pleurotus* περιέχουν ποσότητες καλίου, φωσφόρου και χαλκού, οι οποίες καλύπτουν περί το 12%, της απαιτούμενης ημερήσιας ποσότητας η καθεμία [14]. Επιπλέον, περιέχουν ποσότητες άλλων ανόργανων συστατικών, που φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ανόργανα συστατικά (mg/100g) σε νωπάμανιτάρια [14]

Ανόργανο συστατικό	Ποσότητα	Ανόργανο συστατικό	Ποσότητα
Ασβέστιο	3,0	Σίδηρος	1,3
Μαγνήσιο	18,0	Φώσφορος	120
Κάλιο	420	Νάτριο	18,0
Ψευδάργυρος	0,8	Χαλκός	0,2
Μαγγάνιο	0,1	Σελήνιο	2,6 (μg)

Σε πείραμα καλλιέργειαςμανιταριών *P. ostreatus* var. *salignus* σε τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα, προσδιορίστηκαν οι ποσότητες ανόργανων

συστατικών που δίνονται στον Πίνακα 5 (εκφρασμένες % ξηρού βάρους), ενώ οι δεν ανιχνεύθηκε θείο (S), το οποίο ανιχνεύεται μόνο στα δηλητηριώδη μανιτάρια [4]. Σε άλλη μελέτη [17] που πραγματοποιήθηκε σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* το σημαντικότερο από άποψη ποσότητας μεταλλικό στοιχείο ήταν το κάλιο, η περιεκτικότητά του οποίου κυμάνθηκε από 2185 έως 3365 mg/100 g ξηρού βάρους, και ακολουθούσε το μαγνήσιο με τιμές 161-203 mg/100 g ξηρού βάρους. Η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε στις τιμές του νατρίου, οι τιμές του οποίου κυμάνθηκαν από 25,2 έως 136,0 mg/100 g ξηρού βάρους. Τα επίπεδα ασβεστίου ήταν χαμηλά και κυμάνθηκαν από 23,5 έως 48,6 mg/100 g ξηρού βάρους [17].

Πίνακας 5. Περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά των καρποφοριών του μύκητα *P. ostreatus* var. *salignus* (% ξηρού βάρους) [4]

Υπόστρωμα καλλιέργειας	Μακροστοιχεία		Ιχνοστοιχεία			
	K	Ca	Cu	Zn	Mn	Fe
Άχυρο σόργου	4,50	0,020	0,005	0,011	0,002	0,012
Άχυρο φιστικιού	4,06	0,001	0,004	0,013	0,003	0,013
Άχυρο σόγιας	4,00	0,010	0,030	0,010	0,004	0,001
Άχυρο σίτου	3,44	0,010	0,003	0,011	0,002	0,019
Φυσικό (<i>Salix</i> sp.)	4,34	0,020	0,003	0,110	0,030	0,042

- ❖ **Λοβαστατίνη:** Η λοβαστατίνη είναι ένας βιοενεργός δευτερογενής μεταβολίτης που έχει ανιχνευτεί σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus*. Ανήκει στις στατίνες, οι οποίες είναι αναστολείς της αναγωγής της HMG-coA, του ηπατικού ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση της χοληστερόλης [15]. Σε κλινική μελέτη βρέθηκε ότι η διατροφική πρόσληψη του *P. ostreatus* προκάλεσε την μεταβολή του λιπιδικού προφίλ σε πειραματόζωα και ανθρώπους, μειώνοντας την ολική χοληστερόλη και τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος [27]. Επιπλέον, σε έρευνες που διεξήχθησαν σε πειραματόζωα, η πρόσληψη αποξηραμένων μανιταριών και εκχυλισμάτων *P. ostreatus* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της HDL-χοληστερόλης [27]. Οι έρευνες για την παρουσία της λοβαστατίνης σε

μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* είναι αντικρουόμενες, καθώς υπάρχουν και μελέτες που δεν ανίχνευσαν την ουσία [16]. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ουσία παράγεται ως δευτερογενής μεταβολίτης από τους μύκητες, η συγκέντρωση της θα επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι το είδος του υποστρώματος, το pH, η θερμοκρασία, ο αερισμός, η περίοδος επώασης και το στέλεχος, ενώ η δυνατότητα ανίχνευσής της στο μανιτάρι επηρεάζεται επιπλέον από τη μεθοδολογία εκχύλισης και ανίχνευσης που εφαρμόζεται [16].

- ❖ **Στερόλες:** Τα μανιτάρια δεν περιέχουν χοληστερόλη [14], αλλά εργοστερόλη, μία στερόλη η οποία μπορεί να έχει προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων [15, 28].

Εκχυλίσματα μανιταριών που περιείχαν εργοστερόλη μελετήθηκαν σε ζωικά μοντέλα και καλλιέργειες κυττάρων για υποχοληστερολαιμική, αντι-αθηρωματική και αντικαρκινική δράση, ωστόσο ακόμη δεν έχει αποδειχθεί αν η εργοστερόλη είναι ή δεν είναι βιολογικώς ενεργό συστατικό [26]. Σε έρευνα που διεξήχθη σε πολλά είδη μανιταριών διαπιστώθηκε η παρουσία της εργοστερόλης στο είδος *P. ostreatus*, σε συγκέντρωση 68 mg/100 g νωπού προϊόντος κατά μέσο όρο [26]. Στα πλαίσια της ίδιας μελέτης προσδιορίστηκαν ακόμη κατά μέσο όρο 8,89 mg/100 g νωπού προϊόντος εργοστα-5,7-διενόλης, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν (< 1,7 mg/100 g νωπού προϊόντος) η εργοστα -7,22-διενόλη και η εργοστα -7-ενόλη. [26].

Στερόλες και βιταμίνη D

Οι στερόλες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη δόμηση των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι μόρια-κλειδιά για τη στήριξη, τη διατήρηση και ρύθμιση της ρευστότητας των κυτταρικών μεμβρανών, επηρεάζοντας έτσι άμεσα θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες. Η κύρια στερόλη των ζώων είναι η χοληστερόλη, ενώ τα φυτά περιέχουν περισσότερο πολύπλοκες στερόλες, όπως η στιγμαστερόλη και η σιτοστερόλη. Η κύρια στερόλη των μυκήτων είναι η εργοστερόλη η οποία διαφέρει δομικά από την χοληστερόλη στην ύπαρξη ενός διπλού δεσμού στο δακτύλιο B και στην ακυλοαλυσίδα, καθώς και στην ύπαρξη μιας μεθυλομάδας στον άνθρακα 24 [29].

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 [30-31]. Εκτός από την εργοστερόλη, στους μύκητες ανιχνεύονται και άλλες στερόλες όπως η φουνγκιστερόλη (fungisterol), η εργοστα-5,7-διενόλη (ergosta-5,7-dienol), η 24-μεθυλ-χοληστερόλη (24-methylcholesterol) και η μεθυλενο-χοληστερόλη (methylene cholesterol), ωστόσο η εργοστερόλη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, αποτελώντας ακόμα και το 89% του συνολικού στερολικού περιεχομένου. Όσον αφορά στα μανιτάρια *Pleurotus* έχει βρεθεί ότι υπάρχει μεγάλη διακύμανση στην περιεκτικότητα της εργοστερόλης στα σώματα καρποφορίας ανάλογα με το στέλεχος, το είδος και εξωγενείς παράγοντες, όπως ο φωτισμός και το υπόστρωμα. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε εργοστερόλη διαφέρει ανάλογα με το τμήμα του μανιταριού που μελετάται [32].

Η βιταμίνη D, γνωστή και ως «η βιταμίνη του ήλιου», κατέχει πρωταρχικό ρόλο τόσο στο σχηματισμό και ανάπτυξη των οστών, όσο και στο μεταβολισμό του ασβεστίου και η επαρκής πρόσληψή της είναι απαραίτητη για αποφυγή της ραχίτιδας στα παιδιά και της οστεομαλακίας στους ενήλικες [32].

Ο όρος βιταμίνη D δεν αντιπροσωπεύει μία μόνο βιταμίνη αλλά στην πραγματικότητα αποτελεί την γενική ονομασία μιας ομάδας βιταμινών που εμφανίζουν παρόμοια δράση με αυτή της χοληκαλσιφερόλης (βιταμίνη D₃). Πρόκειται για μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που παρέχεται από λίγα τρόφιμα κυρίως ζωικής προέλευσης (συκώτι, βοδινό, αυγά, γάλα, τυρί, βούτυρο, και λιπαρά ψάρια όπως ρέγκα, σολομός, σαρδέλες) ενώ παράλληλα μπορεί να παραχθεί ενδογενώς με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας του ήλιου από την 7-δεϋδροχοληστερόλη που υπάρχει στην επιφάνεια του δέρματος. Ανεξάρτητα από τη προέλευσή της (ήλιος, διατροφή, συμπληρώματα) η βιταμίνη D είναι βιολογικά αδρανής και πρέπει να υποστεί δυο υδροξυλιώσεις στο σώμα για να μετατραπεί στη βιολογικά ενεργή μορφή της. Η πρώτη υδροξυλίωση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, όπου η ανενεργή βιταμίνη D μετατρέπεται στην 25-OH-D ή καλσιδιόλη. Η δεύτερη υδροξυλίωση γίνεται στους νεφρούς όπου και παράγεται η [1,25(OH)₂D] ή αλλιώς 1,25 διυδροξυβιταμίνη D, που αποτελεί την ενεργή μορφή της βιταμίνης D, γνωστή και ως καλσιτριόλη. Η καλσιτριόλη προάγει την απορρόφηση του ασβεστίου στο έντερο και τη διατήρηση επαρκών συγκεντρώσεων ασβεστίου και φωσφόρου για τη φυσιολογική οστική εναπόθεση. Σήμερα υπάρχουν δεδομένα

(NIH, National Institutes of Health) που υποστηρίζουν πως ο ρόλος της βιταμίνης D στις λειτουργίες του σώματος δεν περιορίζεται μόνο στην υγεία των οστών αλλά σχετίζεται και με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού, την κυτταρική ανάπτυξη, τη μείωση της φλεγμονής.

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

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη μετατροπή της βιταμίνης D₂ στη βιολογικά ενεργή της μορφή είναι αντίστοιχη αυτής για την μετατροπή της βιταμίνης D₃. Έτσι, αφού φθάσει στον οργανισμό, με δύο διαδοχικές υδροξυλιώσεις μετατρέπεται αρχικά στο ενδιάμεσο 25-υδρόξυ-βιταμίνη D₂ και στη συνέχεια στη βιολογικά ενεργή 1,15- διϋδροξυβιταμίνη D₂.

Στα μανιτάρια φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη διακύμανση στο περιεχόμενο της βιταμίνης D από είδος σε είδος αλλά και σε διαφορετικά δείγματα του ίδιου είδους που μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική έκθεση στο φως του ήλιου κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης, καθώς και σε άλλους παράγοντες που πιθανά να επιδρούν κατά την ανάπτυξη, τη συλλογή, την αποθήκευση ή ακόμα και σε διαφορές στην ενζυμική δραστηριότητα [26].

Οι σοβαρές επιπτώσεις της ανεπάρκειας σε βιταμίνη D σε συνδυασμό με τον περιορισμένο αριθμό τροφίμων που μπορούν να αποτελέσουν πηγή αυτής της βιταμίνης οδήγησε γρήγορα στην ανάγκη εμπλουτισμού πολλών τροφίμων με βιταμίνη D₂ ή D₃ και θεωρείται πως αποτελεί έναν ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο αύξησης των επιπέδων 25(OH)D σε παιδιά και ενήλικες [33].

Η επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στην εργοστερόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή βιταμίνης D₂ με σκοπό την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής, την χρήση της βιταμίνης D σε φάρμακα καθώς και τον εμπλουτισμό τροφίμων. Πρόσφατα η παραπάνω τεχνολογία χρησιμοποιήθηκε και από τους παραγωγούς μανιταριών οι οποίοι εκμεταλλεύτηκαν την υψηλή περιεκτικότητα των μανιταριών σε εργοστερόλη

καθώς και τη δυνατότητα που παρέχεται για παραγωγή βιταμίνης D έπειτα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Όλα τα μανιτάρια με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας παράγουν σημαντικές ποσότητες βιταμίνης D και μάλιστα ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει πολύ λίγο [26].

Όσον αφορά στη βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης D από μανιτάρια-UV και την ικανότητα αύξησης των επιπέδων 25(OH)D στους ανθρώπους τα δεδομένα είναι λίγα και αντικρουόμενα. Στη μελέτη των Urbain et al. [34] φάνηκε πως η βιταμίνη D₂ από μανιτάρια-UV αυξάνει τα επίπεδα 25(OH)D σε βαθμό αντίστοιχο αυτού που προκαλούσε διατροφικό συμπλήρωμα, ενώ σε αυτήν των Stephenson et al [35] παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της 25(OH)D₂, αλλά ταυτόχρονα σημειώθηκε και μία μείωση στα επίπεδα της 25(OH)D₃. Το τελευταίο στοιχείο ενίσχυσε την υπάρχουσα διαμάχη σχετικά με την αποτελεσματικότητα των συμπληρωμάτων D₂ σε σχέση με αυτά της D₃ στην αύξηση των επιπέδων 25(OH)D. Τέλος, σύμφωνα με τους Keegan et al. [33] η πρόσληψη βιταμίνης D₂ από μανιτάρια UV είναι ικανή να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της 25(OH)D με τρόπο ανάλογο των συμπληρωμάτων είτε βιταμίνης D₃ είτε βιταμίνης D₂.

1.3 Πολυφαινόλες

Μεγάλος αριθμός φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων απαντάται στη φύση, όπως για παράδειγμα οι ανθοκυανίνες, στις οποίες οφείλεται το χρώμα πολλών σπωρολαχανικών και λουλουδιών. Πολλά φυτικά τρόφιμα, όπως λαχανικά, φρούτα, φυτικά έλαια κ.ά και ποτά, όπως οίνος, μπύρα, τσάι, κακάο κ.ά. περιέχουν πολυφαινόλες, οι οποίες επηρεάζουν τα διατροφικά χαρακτηριστικά των τροφίμων και συνδέονται με οργανοληπτικές ιδιότητες όπως η στυφή και η πικρή γεύση [36].

Στα φρούτα τα φαινολικά συστατικά αποτελούν υπόστρωμα της ενζυμικής αμαύρωσης, ενώ πολλά από αυτά δρουν ως αντιοξειδωτικά, επιβραδύνουν δηλαδή την οξείδωση των λιπιδίων επηρεάζοντας τη σταθερότητα της ποιότητας των τροφίμων και την διαθρεπτική τους αξία. Για αυτό το λόγο τα τρόφιμα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες κερδίζουν το ενδιαφέρον των καταναλωτών [38].

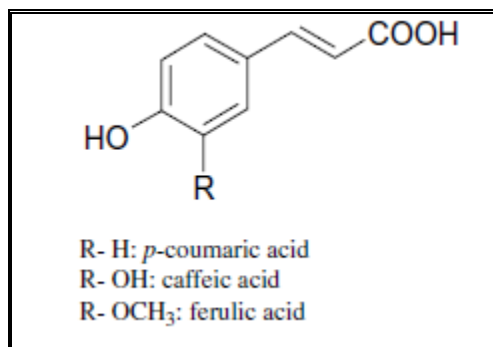
Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε τέσσερις κύριες οικογένειες, τα φαινολικά οξέα, τις φλαβόνες, τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες. Η κατάταξη των φαινολικών ενώσεων κατά Harborne γίνεται σε 15 κύριες τάξεις: απλές φαινόλες (τυροσόλη, υδροxyτυροσόλη), βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα (γαλλικό, συριγγικό, βανιλλικό), ακετοφαινόλες και φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, υδροxyκινναμωμικά οξέα (φερουλικό, καφεϊκό, σιναιπικό, κουμαρικό), κουμαρίνες και ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες, νεολιγνάνες και λιγνίνες [36].

Η τάξη των φλαβονοειδών διακρίνεται με τη σειρά της σε 13 υποκατηγορίες, τις ακόλουθες: χαλκόνες, δεϋδροχαλκόνες, χρυσόνες, φλαβόνες (πχ. απιγενίνη, λουτεολίνη), φλαβονόλες (πχ. κερκετίνη, μυρισετίνη), δεϋδροφλαβονόλες, φλαβονόνες, φλαβανόλες (πχ. επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη), φλαβανοδιόλες, ανθοκυανιδίνες (πχ. πελαργονιδίνη, κυανιδίνη), ισοφλαβονοειδή και διφλαβονοειδή, προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες [36].

Τα περισσότερα από τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα φυτά είναι συνδεδεμένα με σάκχαρα (γλυκοζίτες), αν και περιστασιακά συναντώνται και ως αγλυκόνες. Η τάξη των φλαβονοειδών διαθέτει χιλιάδες μέλη και πολλά από αυτά έχουν διερευνηθεί ως προς την αντιοξειδωτική και αντικαρκινική τους δράση.

1.3.1 Φαινολικά οξέα

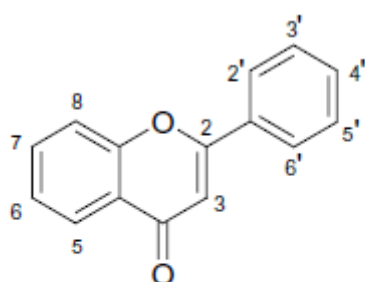
Τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο απλές φαινολικές ενώσεις, περιέχουν απλό βενζολικό δακτύλιο και οι σημαντικότερες είναι τα οξέα κινναμωμικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, ο-υδροxy-βενζοϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ.



Εικόνα 4. Τα φαινολικά οξέα [37]

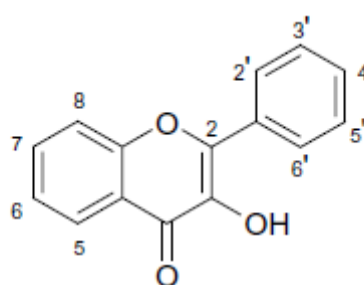
1.3.2 Φλαβόνες

Η βασική δομή των φλαβονοειδών είναι η φλαβονόλη, η οποία αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα που είναι διευθετημένα σε τρεις δακτυλίους. Οι φλαβονόλες, οι οποίες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών, διακρίνονται σε καμπφερόλη, κερκετίνη και μυρισετίνη, ανάλογα με τη μορφή του πλάγιου δακτυλίου [38].



Apigenin (4', 5, 7 - OH)

Luteolin (3', 4', 5, 7 - OH)



Quercetin (3', 4', 5, 7 -OH)

Myricetin (3', 4', 5', 5, 7 - OH)

Kaempferol (4', 5, 7 - OH)

Isorhamnetin (4', 5, 7 - OH; 3' - OCH₃)

Εικόνα 5. Φλαβονόλες [37]

Οι διάφορες τάξεις φλαβονολών διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή και την υποκατάσταση των δακτυλίων τους, και αυτές οι διαφορές επηρεάζουν την σταθερότητα της ρίζας φαινοξυλίου και κατά συνέπεια τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών [37].

1.3.3 Ανθοκυάνες

Είναι υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις με βασική δομική μονάδα το κατιόν του φλαβυλίου. Είναι γλυκοζίτες που μπορούν να υδρολυθούν και να δώσουν ένα σάκχαρο (πχ. γλυκόζη) και ένα άγλυκο παράγωγο που ονομάζεται ανθοκυανιδίνη. Η σταθερότητα τους κατά την επεξεργασία των τροφίμων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, ωστόσο είναι περισσότερο σταθερές στους φυτικούς ιστούς

σε σύγκριση με άλλες χρωστικές όπως είναι οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή [38].

1.3.4 Κατεχίνες

Από χημική άποψη οι κατεχίνες μπορούν να θεωρηθούν προϊόντα αναγωγής των φλαβονών, ενώ αποτελούν δομικά συστατικά των ταννινών μαζί με τις λευκοανθοκυανιδίνες [38].

1.3.5 Ταννίνες

Είναι πολυμερισμένες φαινολικές ενώσεις με μοριακό βάρος 500-3000 που δίνουν μαύρο χρώμα και στυφή γεύση σε πολλά φυτικά προϊόντα [38]. Με βάση τη δομή τους οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες και υδρολυμένες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι κατεχίνες και οι λευκοκυανίνες, ενώ στη δεύτερη ανήκει το ταννικό οξύ.

1.3.6 Δράση πολυφαινολών

Το ενδιαφέρον για τα πιθανά οφέλη για την υγεία των πολυφαινολών, έχει αυξηθεί λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής τους δράσης και της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών που παρατηρείται *in vitro*. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις από μελέτες σε ανθρώπινη διατροφή ότι η απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα συγκεκριμένων φλαβονοειδών είναι πολύ υψηλότερη από ό, τι αρχικά πιστευόταν. Ωστόσο, επιδημιολογικές μελέτες που διεξήχθησαν για να εξεταστεί ο ρόλος των φλαβονοειδών στην υγεία των ανθρώπων έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση τροφών που περιέχουν φλαβονοειδή προσφέρει ένα προστατευτικό αποτέλεσμα αναφορικά με την ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου και του καρκίνου. Ωστόσο, άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα φλαβονοειδή δεν ασκούν καμία επίδραση, και λίγες μελέτες αναφέρουν ότι μπορεί να υπάρξουν πιθανές βλάβες. Επειδή υπάρχουν πολλές βιολογικές δράσεις που αποδίδονται στα φλαβονοειδή, μερικά από τα οποία θα μπορούσε να είναι ευεργετικά ή επιζήμια ανάλογα με τις ιδιαίτερες περιστάσεις, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [39].

Στη διαθέσιμη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετά άρθρα που παρουσιάζουν ποικίλα οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό, από την κατανάλωση πολυφαινολών. Ορισμένα από αυτά αναφέρονται στη συνέχεια:

- Η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω των τροφών φαίνεται ότι προάγει την ανθρώπινη υγεία. Ειδικότερα, φαίνεται ότι οι διάφορες ομάδες φαινολικών ενώσεων προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από ένα εύρος προσβολών, όπως την ενδοκυτταρική προσβολή του DNA και την προσβολή των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος μέσω της δράσης τους ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και εξουδετέρωσης των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης. Τέτοια δράση φαίνεται ότι έχουν οι φαινολικές ενώσεις του τσαγιού [36].
- Επιπρόσθετα, οι πολυφαινόλες προστατεύουν τον άνθρωπο από την εμφάνιση καρδιοπαθειών, καθώς με την δράση τους έναντι της οξείδωσης προστατεύουν την LDL χοληστερόλη ώστε να μην οξειδωθεί και εναποτεθεί στους ανθρώπινους ιστούς συμβάλλοντας στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας [40,41].
- Παρουσιάζουν επίσης αντιοξειδωτική δράση ως προς τους παράγοντες που προκαλούν την οξείδωση του επιθηλιακού ιστού, παρεμποδίζοντας τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας [36]. Για αυτό το λόγο η κατανάλωση τροφίμων και ποτών, όπως το ελαιόλαδο, οι ξηροί καρποί και το κρασί που περιέχουν πολυφαινόλες έχουν συνδεθεί με μειωμένη εμφάνιση παθήσεων των στεφανιαίων [42].
- Οι πολυφαινόλες, επιπλέον, έχουν δράση κατά των μικροοργανισμών και ειδικότερα των βακτηρίων. Αντιβακτηριακή δράση εμφανίζουν κυρίως τα φαινολικά οξέα βενζοϊκό και υδροξυ-βενζοϊκό που χρησιμοποιούνται και ευρύτερα ως συντηρητικά στα τρόφιμα.
- Ακόμη, οι πολυφαινόλες παρεμποδίζουν την εμφάνιση αλλεργιών με την παρεμπόδιση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Διάφορες φαινολικές ενώσεις φαίνεται ότι διαθέτουν αυτή την ικανότητα, όπως η υδροξυτυροσόλη, η χορήγηση της οποίας στην κατάλληλη ποσότητα φαίνεται ότι είναι σε θέση να παρεμποδίσει τη δημιουργία του λευκοτριενίου B4 και στη συνέχεια τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Άλλες φαινολικές ενώσεις όπως η τυροσόλη, η ολεωρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ, η λουτεολίνη, η

απιγενίνη και η κερκετίνη έχουν αντίστοιχες δράσεις μέσω διαφορετικών μηχανισμών [43].

- Οι πολυφαινόλες εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Ενδεικτικά αναφέρεται η υδροξυτυροσόλη και η ολευρωπαΐνη, που αποτελούν συστατικά των ελιών και του ελαιολάδου και έδειξαν ότι μπορούν να έχουν ευεργετική επίδραση ως προς φλεγμονώδεις ασθένειες του γαστρεντερικού [44].
- Οι πολυφαινόλες καθυστερούν την απορρόφηση των πρωτεϊνών λόγω ένωσης τους με τις ταννίνες και καταβύθισης τους.
- Οι πολυφαινόλες καθυστερούν την απορρόφηση των μετάλλων Fe, Cu, Zn, Na, Al, δημιουργώντας σύμπλοκα με τα μέταλλα με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση σχηματισμού ελευθέρων ριζών. Τέτοια δράση φαίνεται ότι έχουν οι κατεχίνες που περιέχονται στο τσάι [36].
- Οι ταννίνες, που αποτελούν μέλη της οικογένειας των πολυφαινολών, φαίνεται ότι προκαλούν αύξηση των επιπέδων της HDL χοληστερόλης και μείωση της LDL χοληστερόλης, ενώ μείωση προκαλούν και στα επίπεδα του σακχάρου. Η αύξηση της HDL χοληστερόλης και η μείωση της LDL χοληστερόλης δρουν ευεργετικά προς την αποφυγή της θρόμβωσης, της αρτηριοσκλήρωσης, του εμφράγματος και των εγκεφαλικών επεισοδίων. Η μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης διακινείται από την LDL προς το συκώτι, όπου και αποικοδομείται. Η οξειδωση της LDL παρεμποδίζεται από τις πολυφαινόλες που υπάρχουν στο ελαιόλαδο, με αποτέλεσμα αυτό να έχει ευεργετική δράση για το καρδιαγγειακό σύστημα του ανθρώπου [44].
- Ακόμη, οι πολυφαινόλες παράγουν ενδοκυτταρικό μονοξειδίο του αζώτου το οποίο προκαλεί διαστολή των αγγείων, επομένως επιδρούν θετικά στο ανθρώπινο κυκλοφοριακό σύστημα.
- Τέλος, φαίνεται ότι παρουσιάζουν δράση κατά των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας απόπτωση στο παχύ έντερο. Οι πολυφαινόλες, ανταγωνίζονται τους παράγοντες που επηρεάζουν καθοριστικά την καρκινογένεση δρώντας ενάντια στις οξειδωτικές αντιδράσεις και μπορούν να περιορίσουν και καρκινικά κύτταρα που έχουν ήδη δημιουργηθεί [41, 45, 46].

Η μέση ημερήσια διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών στον αναπτυσσόμενο κόσμο ανέρχεται σε 150 - 1000 mg, με τις ευρωπαϊκές χώρες του Βορρά να προσλαμβάνουν μικρότερες ποσότητες σε σύγκριση με τους Ευρωπαίους του Νότου και τους Αμερικανούς πολίτες. Καθημερινή πρόσληψη πολυφαινολών σε μικρές ποσότητες φαίνεται ότι επιδρά θετικά στην πρόσληψη των καρδιοπαθειών [39]. Οι τρέχουσες διατροφικές συμβουλές περιλαμβάνουν τη σύσταση να καταναλώνονται τουλάχιστον πέντε μερίδες φρούτων και λαχανικών κάθε μέρα για τη βέλτιστη υγεία, καθεμία από τις οποίες να ανέρχεται σε 80 γραμμάρια τουλάχιστον. Τα επιδημιολογικά στοιχεία που δείχνουν το όφελος από την κατανάλωση μιας διατροφής πλούσιας σε τρόφιμα που περιέχουν πολυφαινόλες είναι πολύ ισχυρά, ωστόσο, δεν αφορούν σε συγκεκριμένες ενώσεις αλλά στο σύνολο των συστατικών ενός τροφίμου. Μεγάλο μέρος των αποδεικτικών στοιχείων σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις των διαιτητικών πολυφαινολών προέρχεται από πειράματα που έγιναν *in vitro* ή σε ζωικά μοντέλα, και με τη χρήση συγκεντρώσεων πολύ υψηλότερων από εκείνες που γενικά περιέχονται στη διατροφή του ανθρώπου. Επιπλέον, συχνά οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν αγλυκόνες πολυφαινολών ή γλυκοζιτικά τους παράγωγα και όχι δραστικοί μεταβολίτες ενώσεις [46].

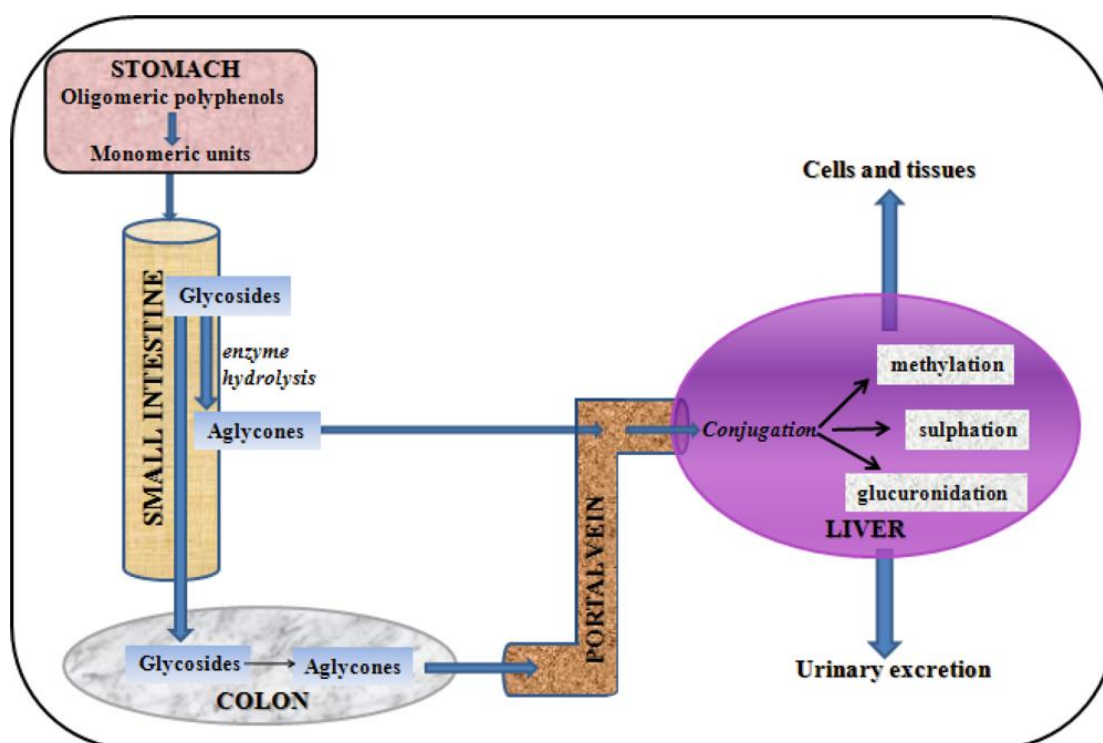
Τα στοιχεία για την αντιοξειδωτική ικανότητα των τροφίμων που παράγονται με *in vitro* μεθόδους (σε δοκιμαστικό σωλήνα) δεν μπορούν να επεκταθούν σε *in vivo* (ανθρώπινες) επιδράσεις και οι κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για να δοκιμαστούν τα οφέλη των διαιτητικών αντιοξειδωτικών παρήγαγαν μικτά αποτελέσματα. Επομένως, δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα της κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες οφείλονται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτών των τροφίμων. Τα αντιοξειδωτικά μόρια διαθέτουν ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών, πολλές από τις οποίες μπορεί να μην σχετίζονται με την ικανότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες [25].

1.3.7 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών επηρεάζει τη βιολογική τους δράση. Η βιοδιαθεσιμότητα φαίνεται να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων

φαινολικών ενώσεων και οι πιο άφθονες από αυτές στη διατροφή μας δεν είναι απαραίτητα εκείνες που έχουν το καλύτερο προφίλ βιοδιαθεσιμότητας. [36, 46]

Στην Εικόνα 6 φαίνονται οι τρόποι με τους οποίους διαχειρίζεται ο ανθρώπινος οργανισμός τις φαινολικές ενώσεις. Το παχύ έντερο διαθέτει μικροχλωρίδα που πιθανόν έχει τη δυνατότητα να διασπάσει τις πολυφαινόλες σε πιο απλές ενώσεις. Από την Εικόνα 6 φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες τροποποιούνται σε μεγάλο βαθμό κατά την διάρκεια της απορρόφησης: οι γλυκοζίτες μπορούν να υδρολυθούν στο λεπτό έντερο ή στο παχύ έντερο, και οι αγλυκόνες που αποδεσμεύονται μπορούν να απορροφηθούν. Πριν από την είσοδο στην κυκλοφορία του αίματος, οι πολυφαινόλες υφίστανται και άλλες δομικές τροποποιήσεις λόγω της διαδικασίας σύζευξης, κυρίως στο ήπαρ [45].



Εικόνα 6. Η απορρόφηση πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό [45]

1.3.8 Παρουσία πολυφαινολών στα μανιτάρια

Οι τιμές πολυφαινολών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τα μανιτάρια παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση. Οι Lam & Okello [16] προσδιόρισαν τις περιεχόμενες σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* ολικές φαινολικές ουσίες, οι οποίες ανήλθαν σε 487,1±19,9 mg GAE (Gallic Acid Equivalents, ισοδύναμα γαλλικού οξέος)/100 g νωπών μανιταριών. Οι Yim et al. [20] αναφέρουν ποσότητες 506,3 mg GAE/100 g σε μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* και οι Robaszkiewicz et al. [47] ποσότητες που ανήλθαν σε 523 mg GAE/100 g. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες προσδιορίστηκαν υψηλότερες ποσότητες πολυφαινολών, από 1254 mg GAE/100 g έως 5490 mg GAE/100 g [48, 49, 50, 51]. Οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να αποδοθούν στην εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης των φαινολικών συστατικών, στη διαφορετική προέλευση των δειγμάτων *P. ostreatus*, καθώς και σε άλλους παράγοντες, όπως το στέλεχος του μύκητα, οι συνθήκες ανάπτυξης, η διαχείριση της καλλιέργειας, η ωριμότητα των σποροσωμάτων κατά τη συγκομιδή και οι μετασυλλεκτικές επεξεργασίες [52].

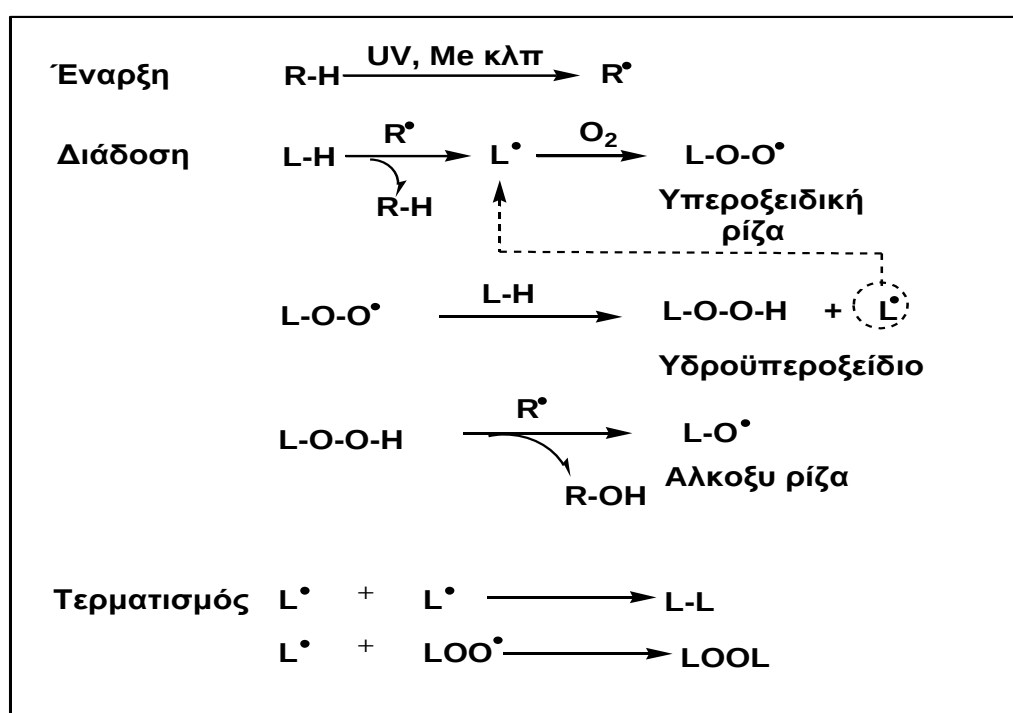
Η επεξεργασία των μανιταριών φαίνεται ότι μειώνει σε σημαντικό βαθμό τις περιεχόμενες πολυφαινόλες, ενώ οι ποσότητες που προσδιορίστηκαν σε ζεματισμένα και επεξεργασμένα μανιτάρια ήταν μόλις το ¼ της ποσότητας των φρέσκων [16]. Η μείωση της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες κατά τον βρασμό/ζεμάτισμα μπορεί να οφείλεται σε θερμική αποικοδόμηση, οξειδωση ή έκπλυση. Από την έρευνα των Lam & Okello [16] προσδιορίστηκαν απώλειες κατά τη θερμική επεξεργασία οι οποίες αποδόθηκαν σε έκπλυση, αφού βρέθηκαν μεγάλες ποσότητες πολυφαινολών στο νερό όπου ήταν εμβαπτισμένα τα μανιτάρια κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

1.4 Αντιοξειδωτική δράση και αντιοξειδωτικό περιεχόμενο

Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες παρατείνουν το χρόνο διατήρησης των τροφίμων προστατεύοντας από τις αλλοιώσεις που οφείλονται σε οξείδωση λιπών και βιταμινών [38]. Υπάρχουν αντιοξειδωτικές ουσίες που παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως είναι τα ένζυμα καταλάση, δισμουτάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καθώς και ουσίες που αποτελούν συστατικά των τροφίμων και προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη ομάδα

αντιοξειδωτικών ανήκουν οι πολυφαινόλες, τα καροτενοειδή, η βιταμίνη Ε, το ασκορβικό οξύ, το σελήνιο.

Η παρουσία στα τρόφιμα ουσιών που έχουν αντιοξειδωτική δράση συσχετίζεται με ευνοϊκές επιδράσεις στον οργανισμό του ανθρώπου, καθώς προσφέρουν προστασία από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες και στις δραστικές μορφές του οξυγόνου. Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται για τη δραστικότητα και την αστάθεια τους. Ο μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών φαίνεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών [42]

Η έναρξη της δράσης των ελευθέρων ριζών προϋποθέτει τον σχηματισμό μίας ελεύθερης ρίζας (έναρξη). Η αυτοξειδωση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υδροϋπεροξειδίων, τα οποία συντελούν στο σχηματισμό νέων ριζών υπεροξειδίων, νέων υδροϋπεροξειδίων, καθώς και νέων ριζών (διάδοση). Ως αποτέλεσμα παρατηρούνται αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπου οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζουν συνεχώς νέα άτομα μέχρι να έχουν αντιδράσει όλες οι ελεύθερες ρίζες και να παραχθούν προϊόντα χωρίς νέα παραγωγή ελευθέρων ριζών [53].

Οι φαινολικές ενώσεις κατατάσσονται στα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά, τα οποία δρουν μέσω του μηχανισμού ελευθέρων ριζών. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, παρέχουν σε αυτές άτομα υδρογόνου με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ενώσεις που δεν δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες, διακόπτοντας με αυτό τον τρόπο τις αντιδράσεις διάδοσης. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν συνεργιστική δράση, το αποτέλεσμα τους δηλαδή αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αναστέλλεται η οξείδωση είναι οι εξής [36]:

- ✓ Μέσω αντίδρασης των πολυφαινολών με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στον οργανισμό και εξουδετέρωσης αυτών. Οι πολυφαινόλες γίνονται οι ίδιες ελεύθερες ρίζες, ωστόσο είναι σταθερές ενώσεις εξαιτίας της σταθερότητας της δομής τους.
- ✓ Μέσω δέσμευσης μεταλλικών ιόντων δημιουργώντας ένα χηλικό σύμπλοκο με το ιόν του μετάλλου, τα οποία συχνά αποτελούν και τις αιτίες έναρξης μίας οξείδωσης.
- ✓ Μέσω της αναγέννησης της βιταμίνης E, η οποία αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες του ανθρώπινου οργανισμού.

Ένας αριθμός χημικών τεχνικών έχει αναπτυχθεί για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τροφίμων. Η Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) είναι μία από αυτές τις τεχνικές, με την οποία προσδιορίζεται ο βαθμός αναστολής της οξείδωσης που προκαλεί η ρίζα του υπεροξειδίου από τις ενώσεις που μας ενδιαφέρουν σε ένα χημικό περιβάλλον. Η τιμή προσδιορίζεται ως ισοδύναμα Trolox και περιλαμβάνει τόσο τον χρόνο αναστολής, όσο και τον βαθμό αναστολής της οξείδωσης. Ορισμένες νεότερες εκδοχές της ORAC χρησιμοποιούν άλλα υποστρώματα για αυτό δεν είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα ανάμεσα στις διαφορετικές εκδοχές της μεθόδου. Εκτός από τη δοκιμή ORAC, άλλα μέτρα αντιοξειδωτικής ικανότητας περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{+3}) σε δισθενή σίδηρο (Fe^{+2}) (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) και τη δοκιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Activity - TEAC). Αυτές οι δοκιμές βασίζονται σε διακριτούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν

διαφορετική ρίζα ή πηγή οξειδωσης και παράγουν διακριτές τιμές, ωστόσο δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα [25]. Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι η αναγωγική ικανότητα δεν αποτελεί απαραίτητα ένδειξη αντιοξειδωτικής ικανότητας [37].

Άλλες αντιοξειδωτικές δοκιμές είναι οι δοκιμές ABTS+ και DPPH, οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ωστόσο δείχνουν σημαντικές διαφορές ως προς την ανταπόκριση τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες. Η μέθοδος DPPH, με την οποία εκτιμάται η αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση τη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας, δεν απαιτεί ειδική προετοιμασία, ενώ η ABTS κατιονική ρίζα (radical cation) (ABTS⁺) απαιτεί το σχηματισμό της χρησιμοποιώντας ένζυμα ή χημικές αντιδράσεις. Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι η ABTS⁺ μπορεί να διαλυθεί σε υδατικά και οργανικά μέσα, στα οποία μπορεί να μετρηθεί η αντιοξειδωτική δράση, λόγω της υδρόφιλης και λιπόφιλης φύσης των ενώσεων στα δείγματα. Αντίθετα, η DPPH μπορεί να διαλυθεί μόνο σε οργανικά μέσα, ειδικά σε αιθανόλη, γεγονός που αποτελεί σημαντικό περιορισμό κατά την ερμηνεία του ρόλου των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών. Και οι δύο ρίζες παρουσιάζουν παρόμοιες διφασικές κινητικές αντιδράσεις με πολλά αντιοξειδωτικά [37].

1.5 Τεχνικές

1.5.1 Λυοφιλίωση (freeze drying)

Η λυοφιλίωση είναι μια μέθοδος ξήρανσης κατά την οποία το υπό ξήρανση δείγμα παγώνει και το νερό (σε μορφή πάγου πια) απομακρύνεται, αρχικά με εξάχνωση και στη συνέχεια με εκρόφηση [54]. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης αποτελείται από 3 στάδια: την ψύξη, την αρχική ξήρανση και τη δευτερογενή ξήρανση. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ψύξης όλο το ελεύθερο νερό του δείγματος βρίσκεται σε μορφή πάγου. Η διαδικασία της ψύξης θεωρείται το πιο κρίσιμο στάδιο κατά τη λυοφιλίωση αφού τόσο η εξάχνωση όσο και τα χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων εξαρτώνται από την κρυσταλλική δομή που θα δημιουργηθεί [55].

Στα πλεονεκτήματα της λυοφιλίωσης περιλαμβάνονται:

- η δυνατότητα αφυδάτωσης χωρίς τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών
- η αύξηση της διάρκειας ζωής
- η καλύτερη συντήρηση των χαρακτηριστικών της δομής και της εμφάνισης
- η διατήρηση των πτητικών αρωματικών και θρεπτικών τους συστατικών [56]
- η απομάκρυνση του πάγου με εξάχνωση δημιουργεί μικρούς πόρους στο προϊόν με αποτέλεσμα η επανυδάτωση να γίνεται σε μικρό χρόνο.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται:

- κόστος
- αύξηση των απαιτούμενων χειρισμών
- χρονοβόρα μέθοδος
- αυξημένος κίνδυνος οξειδωτικής τάγγισης (σε ορισμένα προϊόντα είναι πιθανό να απαιτείται η προσθήκη αντιοξειδωτικών)

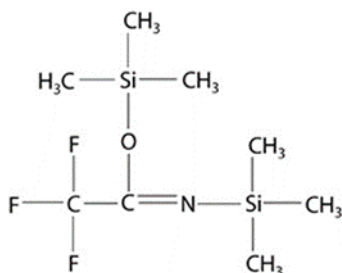
1.5.2 Αντίδραση σιλυλίωσης

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

Στην αναλυτική χημεία, η αντίδραση της σιλυλίωσης χρησιμοποιείται από τα τέλη της δεκαετίας του '50, τόσο στην αέρια χρωματογραφία, όσο και στη φασματομετρία μάζας. Η σιλυλίωση μιας πολικής ένωσης οδηγεί σε μείωση του πολικού χαρακτήρα και σε αύξηση της πτητικότητας και της θερμικής σταθερότητας. Καθίσταται έτσι δυνατή η ανάλυση πολλών μη πτητικών και ασταθών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας [57].

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

Η σιλυλίωση με δι-τριμεθυλσιλυλ -τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) χρησιμοποιείται για την τριμεθυλοσιλυλίωση αλκοολών, αμινών, καρβοξυλικών οξέων, στεροειδών και στερολών. Έχει την ικανότητα να αντιδρά γρήγορα με μια σειρά πολικών ενώσεων αντικαθιστώντας τα υδρογόνα των ενώσεων αυτών με τριμεθυλσιλυλομάδες ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Δι-τριμεθυλσιλυλ –τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA)

Στα πλεονεκτήματα του BSTFA περιλαμβάνονται:

- ✓ η μεγάλη πτητικότητα (συγκριτικά με άλλους παράγοντες σιλυλίωσης)
- ✓ η μεγάλη διαλυτότητα στους συχνότερα χρησιμοποιούμενους διαλύτες σιλυλίωσης
- ✓ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας σιλυλίωσης χωρίς την ανάγκη χρήσης επιπλέον διαλύτη

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

1.5.3 Αέρια χρωματογραφία (GC)

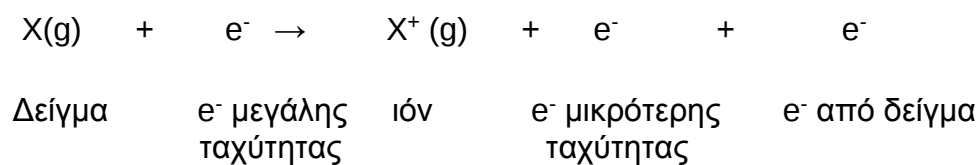
Με τον όρο χρωματογραφία εννοείται ένα πλήθος τεχνικών διαχωρισμού που βασίζονται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του υπο διαχωρισμού

μίγματος μεταξύ μιας κινητικής και μιας στατικής φάσης. Στην αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η κινητική φάση είναι αέρια, ενώ στην υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι υγρή. 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 υπό μορφή αερίων. Για τον προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων προηγείται η διαδικασία της παραγωγοποίησης προκειμένου οι μη πτητικές ενώσεις να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Για παράδειγμα για το διαχωρισμό των στερολών απαιτείται πρώτα η μετατροπή τους σε πτητικούς τριμεθυλοσιλυλαιθέρες με τη διαδικασία της σιλυλίωσης.

Υπάρχουν πολλά είδη ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία (ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας, σύλληψης ηλεκτρονίων κλπ.). Ο πιο διαδεδομένος και ιδιαίτερα χρήσιμος για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων, είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID). Οι οργανικές ενώσεις που εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή αερίου καίγονται, αφού πρώτα αναμιχθούν με υδρογόνο και αέρα. Οι ελεύθερες ρίζες $\text{CH}^\bullet$ που παράγονται κατά την καύση οξειδώνονται και σχηματίζουν ιόντα CHO^+ , τα οποία ιονίζουν τον αέρα στο χώρο του ανιχνευτή και επιτρέπουν τη δίοδο ρεύματος μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε σήμα το οποίο και καταγράφεται από τον καταγραφέα. Ο αριθμός των ιόντων που παράγονται από κάθε άτομο άνθρακα, παρόλο που είναι μικρός, είναι σταθερός. Έτσι, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα, τόσο περισσότερα ιόντα παράγονται και τόσο πιο ισχυρό είναι το σήμα και επακόλουθα τόσο μεγαλύτερη κορυφή προκύπτει στο διάγραμμα του καταγραφέα. Οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας είναι πολύ ευαίσθητοι για τις οργανικές ενώσεις. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η καταστροφή του δείγματος.

Ένα άλλο είδος ανιχνευτή είναι ο ανιχνευτής φασματογραφίας μάζας (MS). Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος είναι πολύ μικρή. Τα συστατικά του δείγματος όπως εκλούνται από τη στήλη σε αέρια μορφή, βομβαρδίζονται από ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας στο θάλαμο ιονισμού, ο οποίος θερμαίνεται στους $150\text{-}200^\circ\text{C}$, ώστε να εξασφαλίζεται πως τα δείγματα παραμένουν σε αέρια μορφή. Κατά τη σύγκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας με τα συστατικά του δείγματος ένα

ηλεκτρόνιο από ένα ενεργειακά υψηλό τροχιακό αποβάλλεται και η ένωση του δείγματος μετατρέπεται σε ένα ιόν με θετικό φορτίο.



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

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Δείγματα

Μελετήθηκαν δεκαέξι στελέχη μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus*. Από αυτά, τα έντεκα απομονώθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, δύο από αυτά είναι εμπορικά είδη του εξωτερικού (Γαλλίας, Τσεχίας) και τα υπόλοιπα τρία αποτελούνται από εμπορικά ελληνικά στελέχη. Από κάθε περιοχή δειγματοληψίας συλλέχθηκαν τρία ή τέσσερα διαφορετικά δείγματα, τα οποία ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν στην τράπεζα καλλιεργειών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Από αυτά προετοιμάστηκαν οι καλλιέργειες που παρήγαγαν τα μανιτάρια της παρούσας εργασίας. Αμέσως μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου διατηρήθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα σε θρεπτικό υλικό αποτελούμενο από δεξτρόζη, εκχύλισμα πατάτας και άγαρ (Potato Dextrose agar - PDA), σε χώρο σκοτεινό και σε θερμοκρασία δωματίου.

Η καλλιέργεια των μανιταριών πραγματοποιήθηκε σε σακούλες προπυλενίου, ειδικές για τοποθέτηση σε αυτόκαυστο, οι οποίες πληρώθηκαν με υπόστρωμα αποτελούμενο από εμπλουτισμένο άχυρο σιταριού. Οι σακούλες με το υπόστρωμα αποστειρώθηκαν (στους 121°C, υπό πίεση 1,1 atm για χρονικό διάστημα 1 ώρας) και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με σπόρο (spawn) μανιταριών (3% w/w) που είχε προηγουμένως αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο PDA, με βάση τους σπόρους σιταριού [58]. Ο αποικισμός του υποστρώματος από το μυκήλιο έγινε στους 25°C, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, οι συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού διαμορφώθηκαν σε 18°C, 95% και 700 lux/m², αντίστοιχα. Για την παραγωγή των μανιταριών τα επίπεδα CO₂ διατηρήθηκαν κάτω των 1200 ppm, η σχετική υγρασία ρυθμίστηκε σε 80% και ο φωτισμός αυξήθηκε σε 1000 lux/m² [58]. Στον πίνακα 6 που ακολουθεί παρατίθεται το όνομα κάθε στελέχους και η προέλευσή του.

Πίνακας 6. Τα στελέχη μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* που εξετάστηκαν

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ/ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
P69	Χελμός / ιτιά
P57	Τρίπολη/καστανιά
P59	Ορεστιάδα/λεύκα
P15	Γραμμένη Οξιά (2)/οξιά
P104	Γαρδίκι/ έλατο
P149	Ηλιούπολη/λεύκα
P146	Σπάτα/λεύκα
P1123	Μεσσηνία
P182	Άλιμος/βραχυτίτων
P179	Βοιωτία/ έλατο
P112	Γραμμένη οξιά(1)/οξιά
LGM 22	Γαλλία
443	Τσεχία
KRYOS	Εμπορικό 1
P80	Εμπορικό 2
3096	Εμπορικό 3

2.2 Μελέτη βιοδραστικών συστατικών

2.2.1 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και στερολών με αέρια χρωματογραφία Αρχή της μεθόδου

Αρχικά τα δείγματα σαπωνοποιούνται ώστε να ελευθερωθούν τα λιπαρά οξέα από τα μόρια των γλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων και στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα θα μετατραπούν σε πτητικούς μεθυλεστέρες (FAME) με μεθυλεστεροποίηση και θα αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία(GC), ενώ οι μη σαπωνοποιήσιμες στερόλες θα προσδιοριστούν επίσης με GC αφού πρώτα μετατραπούν σε πτητικούς τριμεθυλσιλυλαιθέρες έπειτα από σιλυλίωση .

Αντιδραστήρια/Διαλύματα

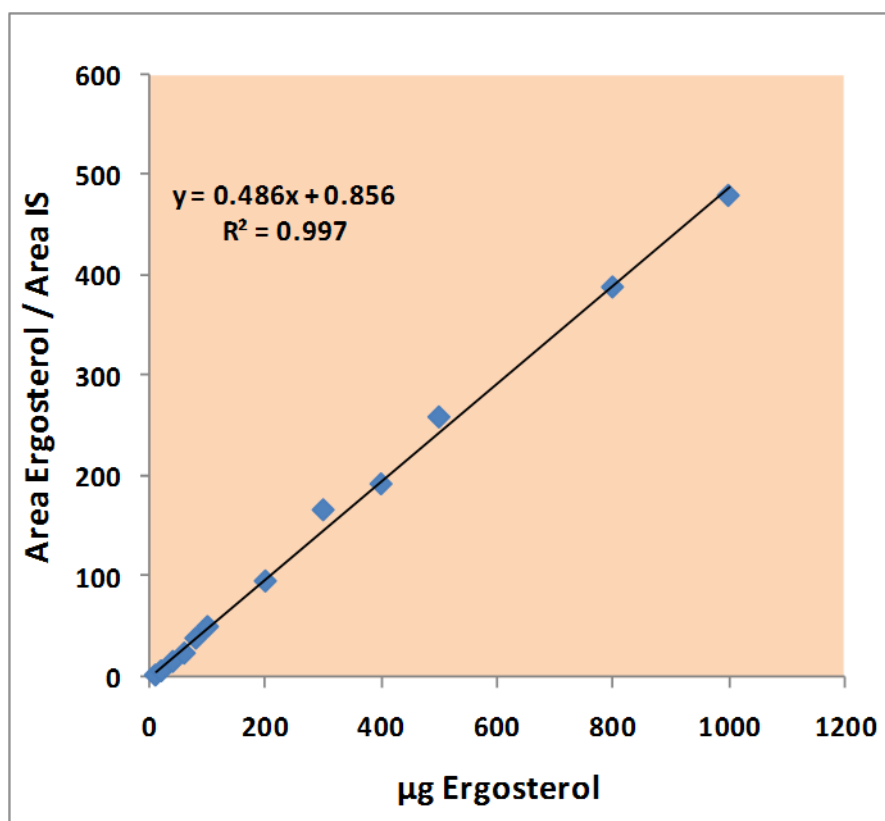
- Μεθανόλη
- Τριφθοριούχο βόριο σε μεθανόλη (BF_3/MeOH 14% solution, διάλυμα εμπορίου),
- Διάλυμα KOH/MeOH 0,5 M: ζυγίζονται επακριβώς 28,055 g KOH και διαλύονται σε 1 L μεθανόλης.
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl : ζυγίζονται, επακριβώς, 360 g NaCl και διαλύονται σε 1 L απιονισμένου νερού.
- Διάλυμα εξανίου που περιέχει αντιοξειδωτικό (BHT) 100 ppm: ζυγίζονται 100 mg BHT και διαλύονται σε 1 L n-εξανίου.
- Διάλυμα χοληστερόλης (εσωτερικό πρότυπο για προσδιορισμό στερολών μανιταριών): ζυγίζονται, επακριβώς 10 mg χοληστερόλης και διαλύονται σε 100 mL n – εξανίου
- BSTFA (αντιδραστήριο σιλυλίωσης)

Πειραματική διαδικασία

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Καθ' όλη τη διαδικασία της ανάλυσης είναι σημαντικό ο φωτισμός να διατηρείται κατά το δυνατόν χαμηλός για την αποτροπή της φωτομετατροπής της εργοστερόλης.

1. Ζυγίζονται 200 mg από κάθε λυοφιλιωμένο δείγμα και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL με βιδωτό πώμα.
2. Στους σωλήνες προστίθενται με σιφώνιο 2 mL διαλύματος KOH/MeOH 3M προκειμένου να σαπωνοποιηθούν τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιποειδή του δείγματος και να απελευθερωθούν τα λιπαρά οξέα και οι στερόλες που είναι συνδεδεμένες με λιπαρά οξέα.
3. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 μL διαλύματος χοληστερόλης 100 mg/L (εσωτερικό πρότυπο) με αυτόματη πιπέτα και πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση με vortex.
4. Τα δείγματα τοποθετούνται για 20 λεπτά σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 60°C.
5. Αφού οι σωλήνες κρυώσουν κάτω από νερό βρύσης προστίθενται με σιφώνιο 1,5mL BF_3/MeOH και έπειτα από ισχυρή ανάδευση με vortex και παραμονή των δειγμάτων για 3 λεπτά σε υδατόλουτρο που έχει ρυθμιστεί στους 95°C, τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλεστέρες τους. Το τριφθοριούχο βόριο με τη μορφή συμπλόκου με μεθανόλη αποτελεί έναν ισχυρά όξινο καταλύτη για την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων.

6. Αφού οι σωλήνες κρυώσουν ξανά κάτω από τρεχούμενο νερό η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 4 mL κορεσμένου NaCl με τη βοήθεια σιφωνίου.
7. Σε αυτό το σημείο τα λιποειδή των δειγμάτων βρίσκονται με τη μορφή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων και ελεύθερων στερολών.
8. Για την παραλαβή των λιποειδών πραγματοποιείται εκχύλιση με n- εξάνιο, διαλύτη χαμηλής πολικότητας, στον οποίο τα λιποειδή των δειγμάτων διαλύονται εύκολα. Στο διάλυμα του εξανίου έχει προστεθεί αντιοξειδωτικό για την αποφυγή της οξειδωσης των λιποειδών. Μετά την προσθήκη 2mL n-εξανίου/BHT ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 2500 rpm για 5 min.
9. Σε αυτό το σημείο, τα λιπαρά οξέα μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα σε μέρος του εξανικού εκχυλίσματος με αέρια χρωματογραφία. Έτσι, παραλαμβάνονται 500 μ L με αυτόματη πιπέτα από την υπερκείμενη στιβάδα κάθε δείγματος και τοποθετούνται σε φιαλίδια GC. Ακολουθεί διαχωρισμός των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή ιονισμού φλόγας ή φασματογράφο μάζας.
10. Για τον προσδιορισμό των στερολών παραλαμβάνεται με αυτόματη πιπέτα 1mL από την υπερκείμενη εξανική στιβάδα κάθε δείγματος και τοποθετούνται σε vials GC.
11. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται σε SpeedVac και τα vials τοποθετούνται σε απαγωγό και προστίθενται 250 μ L BSTFA για τη σιλυλίωση των στερολών προς πτητικούς τριμεθυλοσιλυλαιθέρους.
12. Τα GC vials αφού σφραγιστούν, αναδεύονται ισχυρά σε vortex και τοποθετούνται για 20 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 70°C. Τα σιλυλιωμένα δείγματα που προκύπτουν μπορούν να αναλυθούν στη συνέχεια με αέρια χρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας.
13. Για ποσοτικό προσδιορισμό κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με πρότυπο διάλυμα εργοστερόλης από το οποίο μεταφέρονται σε φιαλίδια GC ποσότητες 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 και 1000 μ g. Στα πρότυπα προστίθεται επίσης εσωτερικό πρότυπο χοληστερόλης, εξατμίζονται μέχρι ξηρού, σιλυλιώνονται όπως τα δείγματα και αναλύονται με αέρια χρωματογραφία με χρήση ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας.



Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς εργοστερόλης

2.2.1.1 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC/MS

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

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

130°C, αύξηση με ρυθμό 3°C/min έως τους 250°C όπου και παρέμεινε σταθερή επί 15 min.

Για την ταυτοποίηση των κορυφών, οι χρόνοι κατακράτησης των λιπαρών οξέων καταγράφηκαν αρχικά με ανάλυση πολυπροτύπου 37 μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Sigma, L9405, St Louis, MO, USA) με χρήση του ανιχνευτή μάζας και με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών NIST και WILEY 2005. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % του συνόλου των λιπαρών οξέων.

2.2.1.2 Προσδιορισμός στερολών με GC/MS

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP series 6890 N εφοδιασμένο με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγέα split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Για την ανάλυση εισαγόταν 1 μ L σιλυλιωμένου δείγματος στον αεριοχρωματογράφο χωρίς διαχωρισμό ροής (splitless mode). Έτσι, τελικά, όλος ο όγκος (1 μ L) εισαγόταν στην στήλη. 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 ήλιο (He) υψηλής καθαρότητας, με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή μάζας ρυθμίστηκαν στους 250°C και 300°C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία φούρνου ήταν αρχικά 210°C, αυξήθηκε στους 300°C με ρυθμό 5,5 °C /min και παρέμεινε στους 300°C επί 15 min. Η ταυτοποίηση των στερολών έγινε (α) βάσει των χρόνων κατακράτησης προτύπων ουσιών, (β) των φασμάτων μάζας προτύπων ουσιών (γ) με χρήση των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας Wiley και NIST 2005, και (δ) βιβλιογραφικών δεδομένων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση χοληστερόλης ως εσωτερικού προτύπου και καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα εργοστερόλης που περιείχαν την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου με τα προς ανάλυση δείγματα. (Σχήμα 1).

2.2.2 Προσδιορισμός Συνολικών και Απλών Πολυφαινολών και Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

2.2.2.1. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Ο προσδιορισμός των ολικών και των απλών πολυφαινολών και οι μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μανιταριών της μελέτης έγιναν σε μεθανολικά εκχυλίσματα των λυοφιλιωμένων δειγμάτων.

Πειραματική Πορεία

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

2.2.2 Προσδιορισμός Απλών Πολυφαινολών με GC/MS

Πειραματική Πορεία

1. Λαμβάνονται 50μL από τα μεθανολικά εκχυλίσματα κάθε δείγματος και μεταφέρονται σε φιαλίδια GC για σιλυλίωση.
2. Σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 50 μL εσωτερικού προτύπου (Internal Standard).
3. Στη συνέχεια τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στον φυγοκεντρικό εξατμιστήρα Speed Vac για εξάτμιση μέχρι ξηρού.
4. Στα ξηρά εκχυλίσματα προστέθηκαν 250 μL σιλυλιωτικού αντιδραστήριου BSTFA, το οποίο μετατρέπει τις πολυφαινόλες και τα τυχόν τερπενικά οξέα στους πτητικούς τριμεθυλοσιλυλιωμένους αιθέρες (TMS) τους.
5. Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο στους 70°C για 20 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση σιλυλίωσης

6. Αφού ψύχθηκαν ήταν έτοιμα να μετρηθούν με GC/ MS.

Ο διαχωρισμός των πολυφαινολικών συστατικών και των τερπενικών οξέων των εκχυλισμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία, ενώ η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με φασματογράφο μάζας.

Για την ανάλυση 1 μL από τα σιλυλιωμένα δείγματα εισαγόταν με σχάση δείγματος 20:1 (split ratio 20:1) στον αέριο χρωματογράφο. Ο αέριος χρωματογράφος ήταν ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HP Series 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονικού ιονισμού 70 eV), εισαγωγέα split–splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683.

Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε 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°C και η γραμμή μεταφοράς του δείγματος από την αεριοχρωματογραφική στήλη στον ανιχνευτή μάζας (MSD transfer line) στους 300 °C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε He με ροή 0.6 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αεριοχρωματογράφου που εφαρμόσθηκε 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 των πολυφαινολικών και τερπενικών συστατικών έγινε με την τεχνική της εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring). Κατ' αυτή την μέθοδο, η ανίχνευση των πολυφαινολών και των τερπενικών οξέων (ποιοτικός προσδιορισμός) βασίζεται στην παρουσία στο δείγμα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων (θραυσμάτων), με ανοχή $\pm 0.05 \times \text{RT}$ όπου RT είναι ο αναμενόμενος χρόνος κατακράτησης των συστατικών από πρότυπα διαλύματα και ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε ένα από τα τρία ιόντα που ορίζεται ως «ιόν στόχος» (target), ενώ επιβεβαιώνεται από τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (qualifiers) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εφαρμόστηκε η μέθοδος εσωτερικού προτύπου. Ως τέτοιο επελέγη η 3-(4-υδρόξυ–φαινυλο)-1-προπανόλη. Κατασκευάσθηκαν καμπύλες αναφοράς για κάθε συστατικό με μια σειρά προτύπων διαλυμάτων σε περιοχή συγκεντρώσεων 80–3500 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές

με καλούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης ($R^2 > 0.996$) για όλες τις ουσίες που προσδιορίσθηκαν. 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. Στον πίνακα 7 που ακολουθεί δίνονται οι τιμές m/z των ιόντων-στόχων και των ιόντων επιβεβαίωσης.

Πίνακας 7. Απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίζονται με GC/MS

Ένωση	Ιόν-στόχος (target ion) (m/z) ^a	Ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) (m/z) ^a
<i>Πολυφαινόλες</i>		
Βανιλίνη	194	209
Κινναμωμικό οξύ	205	220
Τυροσόλη	179	267, 282
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	267	223, 193
p-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	252	296, 281
3-(4-Υδροξυφαινυλ)-1-προπανόλη (εσωτερικό πρότυπο)	206	191, 179
Φλωρετικό οξύ	192	310
Βανιλικό οξύ	297	267, 312
Ομοβανιλικό οξύ	326	267, 311
o-Κουμαρικό οξύ	293	308, 147
Πρωτοκατεχικό οξύ	193	355, 370
3,4-Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ	384	267, 179
Συριγλικό οξύ	327	342, 312
p-Κουμαρικό οξύ	308	293, 219
Γαλλικό οξύ	281	458, 443
Φερουλικό οξύ	338	323, 308
Καφεϊκό οξύ	396	219, 381
Σιναπτικό οξύ	368	353, 338
Ρεσβερατρόλη	444	445, 443
Χρυσίνη	383	384
Επικατεχίνη	368	355, 474
Ναριγκενίνη	473	296
Κατεχίνη	368	355, 474
Γενιστεΐνη	473	
Καμπφερόλη	559	560
Χλωρογενικό οξύ	345	307, 324
Κερκετίνη	647	559, 575
Μυρισετίνη	735	647, 575
Λουτεολίνη	559	471, 399
<i>Τερπενικά οξέα</i>		
Ολεανολικό οξύ	203	320, 482
Ουρσολικό οξύ	203	320
Μασλινικό οξύ	203	320

a: αφορούν τους τριμεθυλσιλυλαιθέρες των συστατικών

2.2.3 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχή της μεθόδου

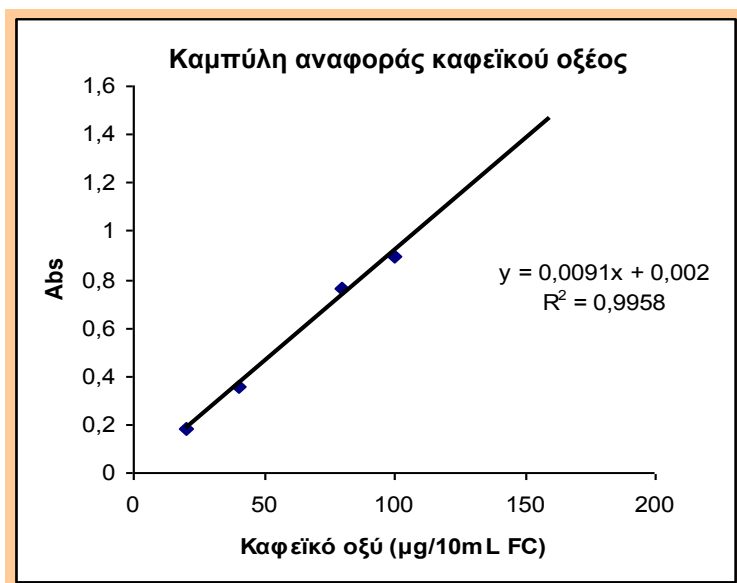
Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν της αντίδρασης είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης, το οποίο απορροφά στο ορατό (750nm).

Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v), το οποίο δεν διαταράσσει την σταθερότητα του αντιδραστήριου και του προϊόντος της αντίδρασης.

Πειραματική διαδικασία

1. Τα δείγματα αραιώνονται 1:1 με μεθανόλη. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL τοποθετούνται 100 μL από τα προαναφερθέντα δείγματα. Ακολούθως προστίθενται απιονισμένο νερό (5 mL) και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,5 mL). Ανακινούμε καλά και αναμένουμε 3 min.
2. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 35% w/v, 1 mL) και το όλο συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου 10 mL με απιονισμένο νερό (3,4 mL απιονισμένο νερό).
3. Τα δείγματα παραμένουν στο σκοτάδι για 1 ώρα.
4. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων, τοποθέτηση σε κυψελίδες και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 725 nm, χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο.
5. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο δείγμα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος και εκφράζεται ως ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Equivalent, CAE).

Σημείωση: Παράλληλα με τη παραπάνω επεξεργασία των δειγμάτων, πραγματοποιείται τυφλός προσδιορισμός, ακολουθώντας τα στάδια 1-5, με τη διαφορά ότι στο στάδιο 1 προστίθεται μεθανόλη (100 μ L) αντί του δείγματος.



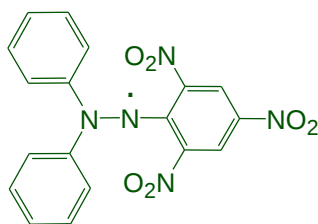
Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος

2.3 Αντιοξειδωτικές δοκιμές

2.3.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)

Αρχή της μεθόδου

Είναι η πιο παλιά έμμεση μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης. Αποτελεί *in vitro* τεχνική η οποία έχει το πλεονέκτημα να μην είναι χρονοβόρα. Το DPPH• είναι μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες ελεύθερες ρίζες αζώτου ($\lambda_{\max}$ 515 nm). Τα αντιοξειδωτικά δεσμεύουν αυτή τη σταθερή ρίζα, το διάλυμα αποχρωματίζεται και μετράται η ελάττωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 515 nm. Μεγαλύτερη ελάττωση της απορρόφησης αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, και κατά συνέπεια σε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 9. Η ελεύθερη ρίζα DPPH

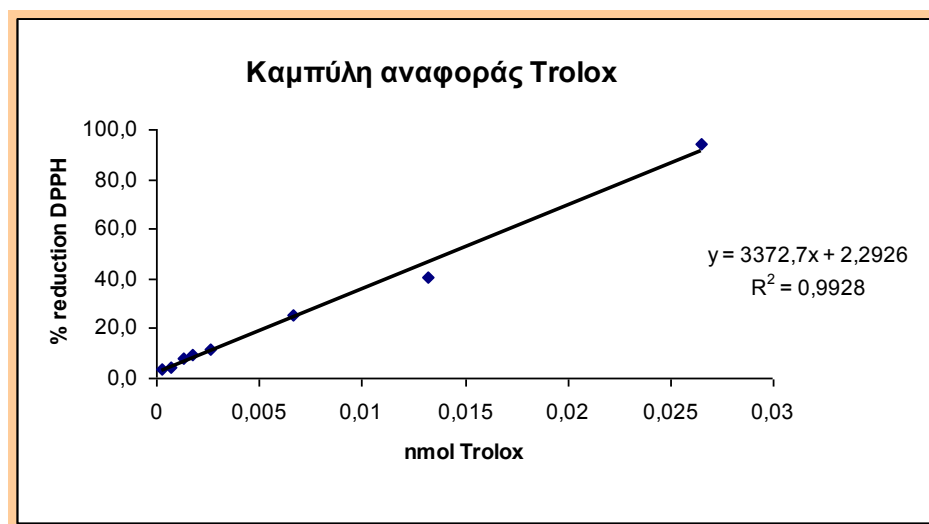
Πειραματική διαδικασία

1. Τα δείγματα αραιώνονται με μεθανόλη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές αραιώσεις, ώστε να καταλήξουμε στις συγκεντρώσεις που έδιναν απορροφήσεις εντός των ορίων γραμμικότητας της καμπύλης αναφοράς.
2. Ακολουθεί ανάδευση σε Vortex.
3. Σε νέο δοχείο Eppendorf τοποθετούνται με πιπέτα, 25 μL από τα αραιωμένα δείγματα. Ακολουθεί προσθήκη 975 μL DPPH 0,06 mM και ανάδευση στο Vortex.
4. Το δείγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30 min στο σκοτάδι.
5. Τοποθετούμε τα δείγματα σε κυψελίδες και φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 515 nm.
6. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της Βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox .

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς ζυγίστηκαν 5 mg Trolox (MW 250,32) και διαλύθηκαν σε 10 mL μεθανόλη για να παρασκευαστεί το μητρικό διάλυμα (2 mM). Με διαδοχικές αραιώσεις του μητρικού διαλύματος Trolox παρασκευάστηκαν διαλύματα με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 1, 0,66, 0,5, 0,25, 0,1, 0,066, 0,05, 0,025 και 0,01 mM. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν τα βήματα

3-5 της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφηκαν νωρίτερα και προέκυψε η καμπύλη που απεικονίζεται στο σχήμα 5.3.2.



Σχήμα 3. Καμπύλη αναφοράς Trolox

2.3.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP)

Αρχή της μεθόδου

Τα αντιοξειδωτικά του δείγματος ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{+3}) προς δισθενή σίδηρο (Fe^{+2}), ο οποίος σχηματίζει έγχρωμο σύμπλοκο με μία τριαζίνη (2,2'-dipyridyl- 5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine) ή με άλλα ανάλογα.

Πειραματική διαδικασία

1. Σε φιαλίδιο Eppendorf αναμιγνύονται 50 μL αραιωμένου δείγματος με 50 μL FeCl_3 (3 mM σε 5 mM κιτρικού οξέος).
2. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
3. Το μίγμα επωάζεται για 30 min σε υδρόλουτρο στους 37°C.
4. Στο επωασμένο δείγμα προστίθενται 900 μL TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, 1mM σε 0.05 M HCl). Ο Fe^{+2} που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ.

5. Το δείγμα παραμένει για 10 min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 620 nm.
6. Παράλληλα, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος (το ασκορβικό οξύ ανάγει τον Fe^{3+} σε Fe^{2+}) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος.

Σημείωση: Παρασκευάζουμε ένα τυφλό για κάθε δείγμα. Συγκεκριμένα, σε ένα νέο Eppendorf αναμιγνύονται 100 μL αραιωμένου δείγματος) και αντί για FeCl_3 προσθέτουμε 100 μL απεσταγμένο νερό. Επίσης, προσθέτουμε 1800 μL TPTZ, αντί των 900 μL (στάδιο 4).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς ασκορβικού οξέος

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς ζυγίστηκαν 5 mg ασκορβικού οξέος (MW 176,13) και διαλύθηκαν σε 10 mL μεθανόλη για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος εργασίας (0,5 mg/mL, 2,8 mM). Με διαδοχικές αραιώσεις του μητρικού διαλύματος ασκορβικού οξέος παρασκευάστηκαν διαλύματα με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, και 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Ακολουθώντας, πραγματοποιήθηκαν τα βήματα 3-5 της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφηκαν παραπάνω και προέκυψε η καμπύλη που απεικονίζεται στο σχήμα 4.



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος

2.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων *P. ostreatus* στις λιποπρωτεΐνες ορού

Αρχή της Μεθόδου

Διάλυμα θειικού χαλκού προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών σε ανθρώπινο ορό. Η ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης (συζυγή διένια) γίνεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 245nm. Καταγράφεται φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (Lag Time) παρουσία ή απουσία των εκχυλισμάτων *P. ostreatus* στον ορό).

Διαλύματα

Μητρικό διάλυμα (Stock) CuSO₄, 20 mM: Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίζονται επακριβώς, 0,0125 g CuSO₄·5 H₂O (MW= 249,68) και διαλύονται σε 2,5 mL H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας (Working) CuSO₄, 200μM: Για την παρασκευή του διαλύματος λαμβάνονται 20 μL μητρικού διαλύματος και αραιώνονται με 1980 μL H₂O (Αραίωση 1:100) την ημέρα της ανάλυσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS): Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονται 9 g NaCl, 0,9076 g NaHPO₄·2H₂O, 0,2408 g NaHPO₄·2H₂O σε 1000 mL απεσταγμένου νερού και ρυθμίζεται το pH στο 7,4.

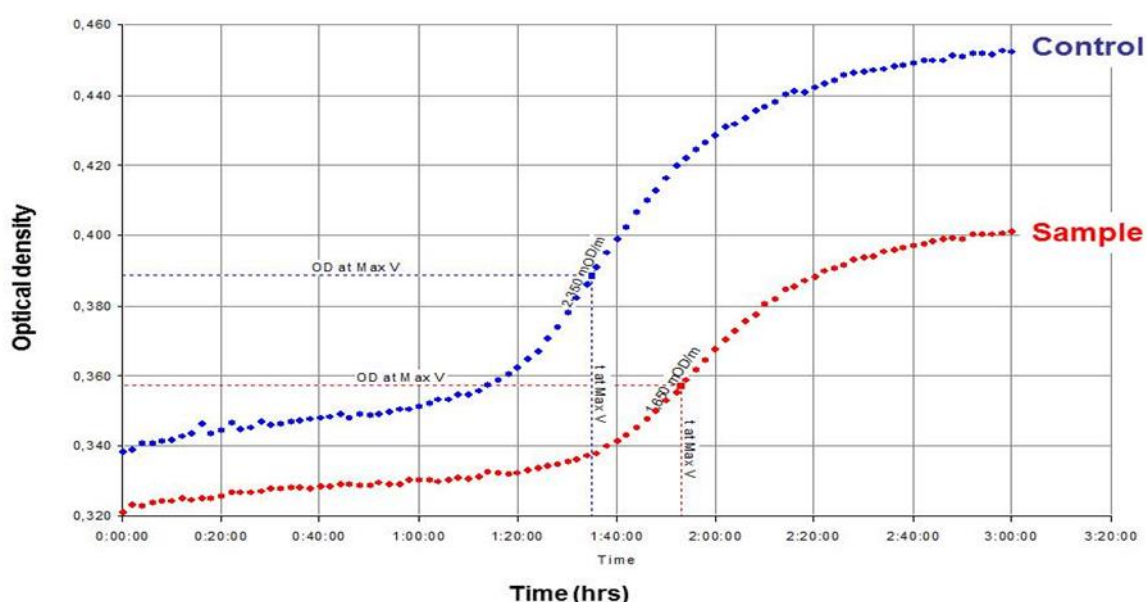
Μίγμα CuSO₄/PBS: Για ένα πολυστυρενικό τρυβλίο 96 βοθρίων λαμβάνονται 21 mL PBS και προστίθενται 2 mL CuSO₄ ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 16μM.

Πειραματική Διαδικασία

1. Παρασκευάζεται το μητρικό διάλυμα CuSO₄ συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας CuSO₄ συγκέντρωσης 200 μM με αρραίωση 1:100 του μητρικού διαλύματος CuSO₄ με απιονισμένο H₂O.
3. Ακολουθώς, παρασκευάζεται το μίγμα από το διάλυμα εργασίας CuSO₄ και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS με τελική συγκέντρωση 10 μM (αραίωση 1:20). Γίνεται αρραίωση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS. Οι δόσεις που

παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν από τα πυκνά διαλύματα των δειγμάτων ήταν: 2,5, 5, 10, 20, 50, 250, 500, 750, 1000 ng.

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



Σχήμα 5. Κινητική μελέτη της παραγωγής συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια της οξείδωσης λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού από Cu^{+2} , χωρίς (μάρτυρας- control) και με την παρουσία μεθανολικού εκχυλίσματος *P. Ostreatus* (sample)

2.4 Στατιστική επεξεργασία

Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του Excel. Για την εύρεση στατιστικώς σημαντικών διαφορών εφαρμόστηκε η ανάλυση

διακύμανσης (One way ANOVA) με το λογισμικό Statgraphics Plus for Windows 4.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA)..

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Καλλιεργητικά δεδομένα

Στο πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται πληροφορίες που αφορούν στην καλλιέργεια κάθε στελέχους. Περιλαμβάνονται πληροφορίες για την πρωιμότητα, δηλαδή στο χρόνο που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό του υποστρώματος μέχρι το σχηματισμό καταβολών καρποφορίας, τις αποδόσεις των κυμάτων παραγωγής σε γραμμάρια (πρώτο, δεύτερο κύμα και άθροισμα αυτών), συνολική απόδοση σε γραμμάρια, μέσο βάρος μανιταριού και αποτελέσματα οπτικής αξιολόγησης της ποιότητας.

Πίνακας 8. Καλλιεργητικά δεδομένα των στελεχών *P. ostreatus* που μελετήθηκαν

Στέλεχος	Πρωιμότητα (ημέρες)	Απόδοση 1 ^{ου} κύματος (g)	Απόδοση 2 ^{ου} κύματος (g)	Απόδοση 1 ^{ου} και 2 ^{ου} κύματος (g)	Διάρκεια καλλιεργητικ ής περιόδου (ημέρες)	Συνολική παραγωγή (g)	Μέσο βάρος μανιταριού (g)	Οπτική αξιολόγηση ποιότητας
KRYOS	26	428,27	212,12	640,39	29,33	721,92	25,01	1
P 80	26	237,04	185,71	422,75	28,50	464,89	32,49	1
3096	50	513,01	72,67	585,67	43,60	648,01	27,74	2
443	78	254,72	69,60	324,32	29,40	322,05	49,13	2
LGM22	20,5	240,76	295,89	536,65	11,83	645,33	7,16	3
P 15	28	230,72	311,15	541,87	29,83	577,85	9,75	1
P 57	43	411,89	121,85	533,74	25,67	598,24	17,76	1
P 59	22	130,47	177,94	308,42	31,17	432,80	12,05	1
P 69	49	385,96	112,20	498,16	40,00	522,83	15,76	1
P 104	27	336,23	283,89	620,12	27,50	707,06	11,43	1
P 112	33	365,71	186,98	552,68	28,17	548,19	5,90	2
P146	46	371,63	136,95	508,58	20,67	608,58	11,40	2
P 149	46	415,05	105,47	520,52	36,17	574,35	17,49	2
P 179	46	401,21	73,91	475,12	23,83	539,79	9,17	1
P 182	72	458,67	91,00	549,67	28,50	536,83	23,92	1
P 1123	43	287,82	151,31	439,13	24,17	519,13	12,89	1

3.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων *P. ostreatus* σε βιοδραστικά συστατικά

3.2.1 Λιπαρά οξέα

Η περιεκτικότητα των λιπιδίων των στελεχών *P. ostreatus* στις κύριες τάξεις λιπαρών οξέων και στα κυριότερα λιπαρά οξέα φαίνονται στους Πίνακες 9 και 10, αντίστοιχα.

Πίνακας 9. Περιεκτικότητα στελεχών *P. ostreatus* σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA), και πολυάκορεστα (PUFA) λιπαρά οξέα (% των λιπαρών οξέων)

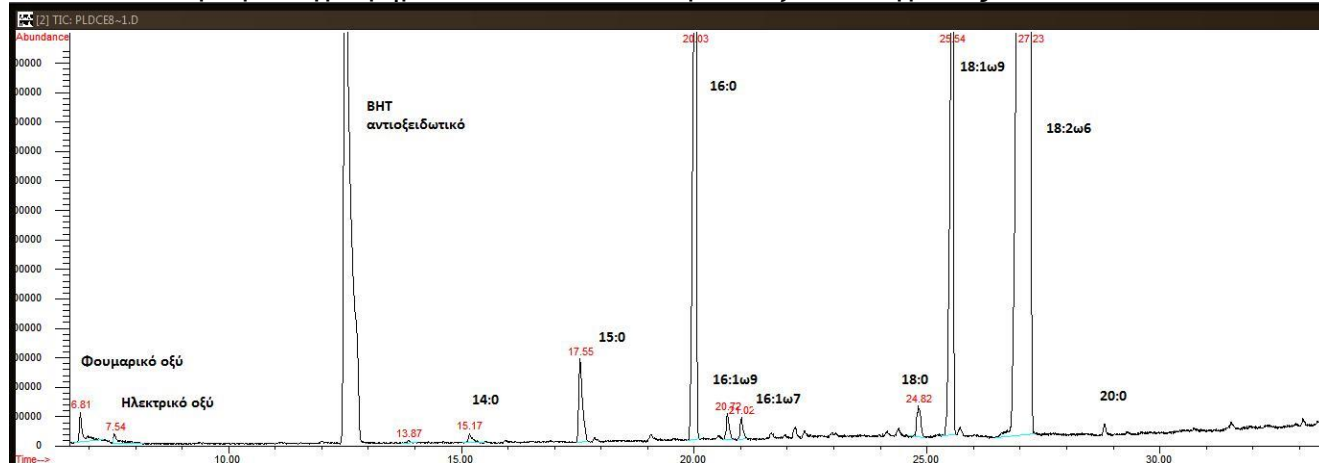
Στέλεχος <i>P. ostreatus</i>	SFA	MUFA	PUFA	ω6 PUFA	ω3 MUFA
LMG 22	8,77	6,76	80,63	80,60	0,03
443	17,07	15,09	58,84	58,13	0,71
KRYOS	13,44	13,07	67,07	66,99	0,08
P80	13,53	9,45	71,21	71,11	0,10
3096	12,84	11,17	71,53	71,53	0
P69	10,78	9,36	77,23	77,10	0,13
P57	11,85	8,93	75,89	75,84	0,05
P59	12,73	7,50	74,85	74,70	0,16
P15	12,85	9,81	74,33	74,22	0,12
P104	12,85	10,5	73,87	73,86	0,01
P149	11,30	10,39	72,29	72,08	0,21
P146	12,02	11,38	71,80	71,58	0,22
P1123	14,12	10,85	68,91	68,75	0,17
P182	13,25	13,22	67,11	67,05	0,07
P179	14,71	14,35	65,66	65,63	0,03
P112	15,25	20,29	60,65	60,54	0,1

Η συμμετοχή των κύριων λιπαρών οξέων παλμιτικού, ελαϊκού και λινελαϊκού επί του συνόλου των λιπαρών οξέων των εξεταζομένων δειγμάτων των στελεχών *P. ostreatus* φαίνεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Συμμετοχή των 3 σημαντικότερων λιπαρών οξέων στα λιπαρά οξέα των δειγμάτων (% ολικών λιπαρών οξέων)

Στέλεχος <i>P. ostreatus</i>	Παλμιτικό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Λινελαϊκό οξύ
LMG 22	7,48	6,29	80,53
443	12,00	13,39	56,82
KRYOS	10,30	11,31	66,58
P80	10,73	8,51	70,80
3096	10,73	10,51	71,26
P69	9,19	8,84	76,90
P146	9,25	10,51	71,02
P149	9,27	9,50	71,77
P57	9,99	8,24	75,66
P59	9,99	6,80	74,42
P15	10,01	19,48	74,06
P104	10,82	10,18	73,72
P182	10,89	12,30	66,30
P1123	11,86	9,63	68,51
P112	12,03	9,23	60,36
P179	12,13	13,13	65,35

Εικόνα 10. Χρωματογράφημα GC-MS των λιπαρών οξέων δείγματος *P. ostreatus*.



3.2.2 Στερόλες

Η επικρατούσα στερόλη σε όλα τα στελέχη *P. Ostreatus* που μελετήθηκαν ήταν η εργοστερόλη.



Σχήμα 6. Περιεκτικότητα των στελεχών *P. ostreatus* σε εργοστερόλη (mg/100 g f.w.)

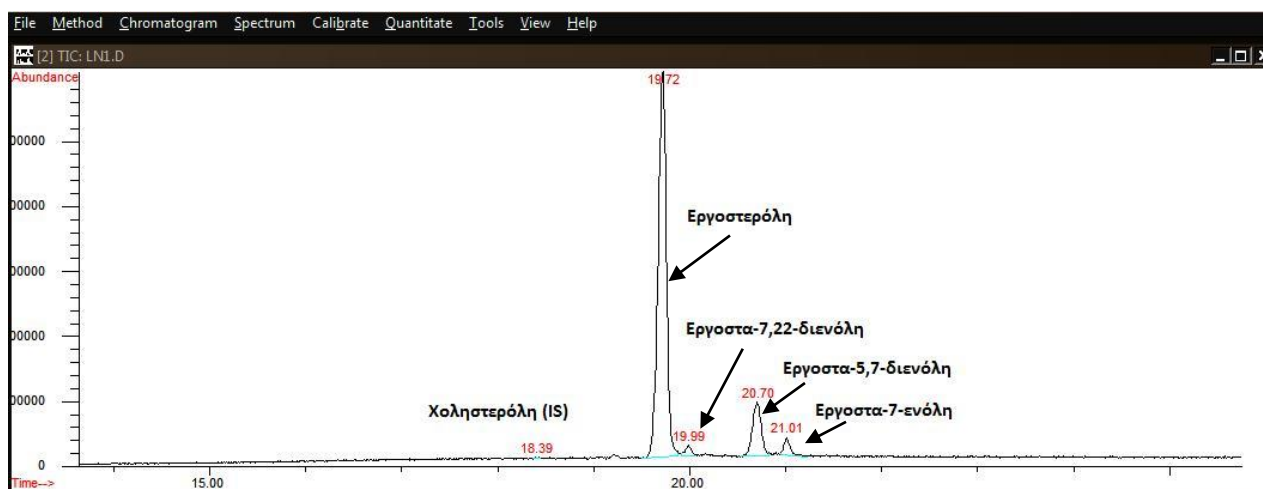
Πίνακας 11. Περιεκτικότητα των στελεχών *P. ostreatus* σε εργοστερόλη κατά μειούμενη τιμή

Στέλεχος <i>P. Ostreatus</i>	Εργοστερόλη (mg/100g fw)
P112	80,81
P80	79,08
P59	64,71
KRYOS	62,53
P104	61,98
3096	51,77
P15	47,58
P57	39,10
LGM22	37,68
P146	34,86
P69	34,25
P179	34,19
P1123	18,75
P149	17,03

443	13,45
P182	10,42

Όπως φαίνεται και στο αεριοχρωματογράφημα GC-MS που ακολουθεί, εκτός από την εργοστερόλη ανιχνεύθηκαν σε μικρότερες ποσότητες οι μεταβολίτες της εργοστα-7,22-διενόλη, εργοστα-5,7-διενόλη και εργοστα-7-ενόλη.

Εικόνα 11. Χρωματογράφημα GC-MS των στερολών δείγματος *P. ostreatus*.



Πίνακας 12. Περιεκτικότητα των στελεχών *Pleurotus ostreatus* σε φαινολικές ενώσεις και τερπενικά οξέα (μg/100g νωπού βάρους)

	P182		P57		P146		P80		P149		P69		P104		KRYOS	
	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.
Βανιλίνη	0.00	0.00	0.11	0.20	0.00	0.00	0.21	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.08	0.00	0.00
Κινναμικό οξύ	1.83	3.17	1.29	1.79	4.21	1.98	0.89	0.62	1.31	0.61	2.53	1.58	0.82	0.83	0.12	0.25
Τυροσόλη	0.17	0.17	0.04	0.08	0.00	0.00	0.23	0.22	0.00	0.01	0.00	0.00	0.24	0.21	0.00	0.00
P-OH Βενζοϊκό οξύ	2.37	0.55	1.43	0.41	3.08	1.35	7.26	2.20	2.08	0.75	4.14	0.85	17.47	16.07	27.66	3.41
P-OH Φαινυλοξικό οξύ	2.42	1.64	1.31	0.75	1.27	0.43	6.92	4.05	1.33	0.46	2.06	0.50	3.94	2.30	11.26	4.23
Βανιλλικό οξύ	0.24	0.16	0.00	0.00	0.20	0.15	0.20	0.18	0.00	0.00	0.06	0.11	0.00	0.00	0.23	0.18
Πρωτοκατεχικό οξύ	0.14	0.24	0.24	0.42	0.42	0.29	0.79	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.57	3.14
3,4 Διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ	0.00	0.00	0.16	0.28	0.00	0.00	2.15	2.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Συριγλικό οξύ	0.00	0.00	0.07	0.12	0.31	0.37	0.19	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.09	0.67	0.45
Γαλλικό οξύ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Φερουλικό οξύ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.13	0.00	0.00	0.04	0.07	0.04	0.07	0.00	0.00
Καφεϊκό οξύ	0.05	0.09	0.35	0.04	0.14	0.16	0.28	0.05	0.18	0.08	0.16	0.03	0.33	0.17	0.24	0.17
Ρεσβερατρόλη	2.25	0.86	2.78	1.68	2.00	0.82	1.36	0.81	3.10	1.22	5.00	2.53	1.05	0.59	1.39	0.34
Ολεανολικό οξύ	0.00	0.00	0.52	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρσολικό οξύ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΑ																
Φαινολικά οξέα	5.17	1.20	3.22	0.75	5.29	1.60	17.5	5.47	3.41	0.86	6.25	1.05	21.49	17.42	41.39	7.97
Κινναμωνικά οξέα	1.89	3.13	1.63	1.83	4.35	1.85	1.24	0.65	1.49	0.60	2.73	1.52	1.19	0.83	0.36	0.30
Απλές φαινόλες	0.17	0.17	0.16	0.27	0.00	0.00	0.44	0.43	0.00	0.01	0.00	0.00	0.30	0.26	0.00	0.00
Stilbene	2.25	0.86	2.78	1.68	2.00	0.82	1.36	0.81	3.10	1.22	5.00	2.53	1.05	0.59	1.39	0.34
Τερπενικά οξέα	0.00	0.00	0.52	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

M.O.= μέσος όρος, T.A.=τυπική απόκλιση

Πίνακας 12 (συνέχεια). Περιεκτικότητα των στελεχών *Pleurotus ostreatus* σε φαινολικές ενώσεις και τερπενικά οξέα (μg/100g νωπού βάρους)

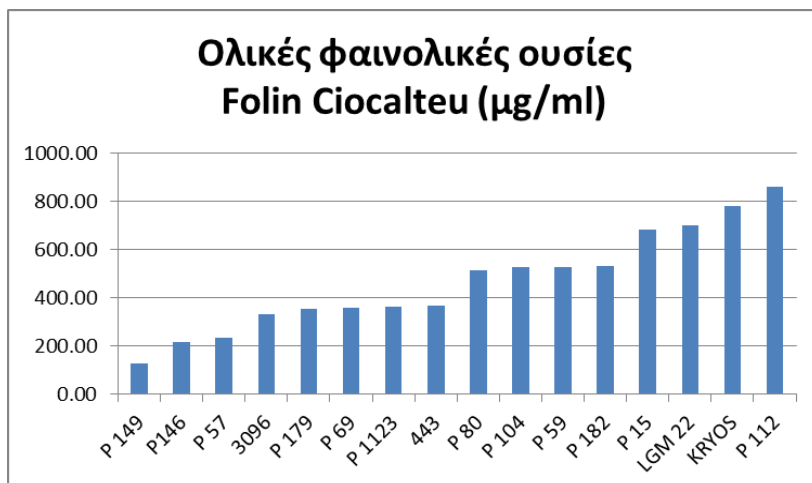
	LGM22		P112		P59		P1123		3096		P15		P179		443	
	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.
Βανιλίνη	1.03	0.62	0.81	0.31	0.07	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.49	0.39	0.03	0.06	0.00	0.00
Κινναμικό οξύ	13.81	4.19	1.41	0.85	0.17	0.33	3.18	1.50	0.00	0.00	4.48	3.84	2.02	3.02	2.86	1.52
Τυροσόλη	0.63	0.30	0.22	0.19	0.13	0.15	0.00	0.00	0.07	0.12	0.07	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
P-OH Βενζοϊκό οξύ	8.76	4.15	7.29	4.80	1.97	1.47	1.14	1.98	0.00	0.00	3.36	1.87	1.03	1.78	2.99	1.27
P-OH Φαινυλοξικό οξύ	12.82	8.27	7.51	1.92	3.73	1.88	1.45	0.65	1.11	0.38	1.53	0.79	1.03	0.94	2.70	0.82
Βανιλλικό οξύ	1.76	1.95	0.64	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.09	0.11	0.18	0.24	0.42	0.15	0.17
Πρωτοκατεχουϊκό οξύ	2.80	0.85	2.16	1.09	1.38	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.12	0.21	0.00	0.00
3,4 Διυδροξυ- Φαινυλοξικό οξύ	0.97	0.39	3.54	1.35	0.98	1.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Συρινγκικό οξύ	1.95	1.84	1.00	0.59	0.01	0.02	0.00	0.00	0.20	0.33	0.06	0.10	0.32	0.52	0.00	0.00
Γαλλικό οξύ	0.00	0.00	0.09	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Φερουλικό οξύ	0.28	0.06	0.08	0.14	0.08	0.08	0.06	0.10	0.13	0.12	0.00	0.00	0.09	0.16	0.00	0.00
Καφεικό οξύ	0.54	0.18	0.54	0.08	0.18	0.12	0.21	0.04	0.08	0.15	0.39	0.11	0.17	0.15	0.12	0.11
Ρεσβερατρόλη	0.96	0.59	2.37	1.15	0.54	0.44	2.04	0.17	2.82	0.84	1.32	0.92	4.61	5.71	2.94	0.54
Ολεανολικό οξύ	20.90	9.64	7.32	2.72	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.58	1.00	0.00	0.00
Ουρσολικό οξύ	20.68	7.64	12.23	13.31	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	1.04	0.00	0.00
ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΑ																
Φαινολικά οξέα	29.07	16.67	22.23	9.65	8.08	2.54	2.60	2.32	1.37	0.37	5.07	2.59	2.74	3.86	5.84	2.17
Κινναμωμικά οξέα	14.63	4.43	2.03	1.06	0.43	0.34	3.45	1.47	0.22	0.21	4.87	3.82	2.28	3.29	2.98	1.60
Απλές φαινόλες	1.66	0.91	1.03	0.26	0.20	0.27	0.00	0.00	0.07	0.12	0.57	0.51	0.03	0.06	0.00	0.00
Στιλβένια	0.96	0.59	2.37	1.15	0.54	0.44	2.04	0.17	2.82	0.84	1.32	0.92	4.61	5.71	2.94	0.54
Τερπενικά οξέα	41.58	2.00	19.54	13.00	0.04	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.18	2.04	0.00	0.00

M.O.= μέσος όρος, T.A.=τυπική απόκλιση

3.2.3. Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά

3.2.4. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων των εξεταζόμενων στελεχών *P. ostreatus*, σε $\mu\text{g GAE / mL}$ όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu φαίνεται σχηματικά στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 7 και σε mg GAE/100 gf.w. δίνεται στον Πίνακα 13.



Σχήμα 7.
Περιεκτικότητα των
στελεχών *P.*
ostreatus σε ολικά
φαινολικά συστατικά

Πίνακας 13. Ολικά φαινολικά συστατικά σε στελέχη *P. ostreatus*

Στέλεχος <i>P. Ostreatus</i>	Ολικά φαινολικά συστατικά (mg GAE*/100g f.w.)
P 112	8,62
KRYOS	7,79
LGM 22	7,01
P 15	6,81
P 182	5,32
P 59	6,69
P 104	5,26
P 80	5,16
443	3,67
P 1123	3,65
P 69	3,58
P 179	3,53
3096	3,32
P 57	3,66
P146	2,54
P 149	1,27

*GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος

3.3 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των εκχυλισμάτων *P. ostreatus*

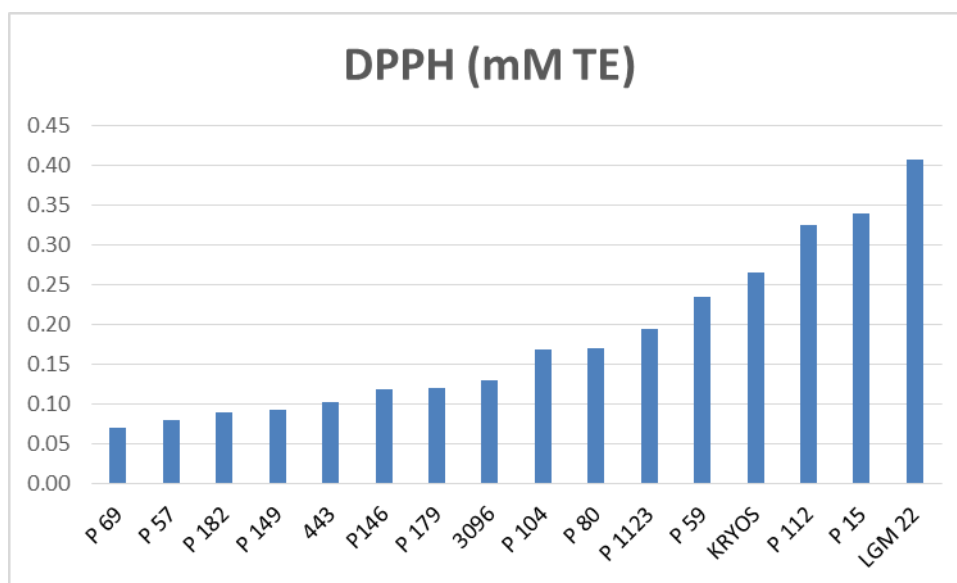
3.3.1 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH•

Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε από τον τύπο:

$$\% \Delta A_{515} = \left(\frac{A_{515}^0 - A_{515}^{30}}{A_{515}^0} \right) \times 100$$

και με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς Trolox υπολογίστηκε η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά του κάθε δείγματος, η οποία εκφράζεται ως ισοδύναμο Trolox.

Η ικανότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων των στελεχών *P. ostreatus* να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH•, φαίνεται σχηματικά στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 8 και δίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 14.



Σχήμα 8. Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• των στελεχών *P. ostreatus*

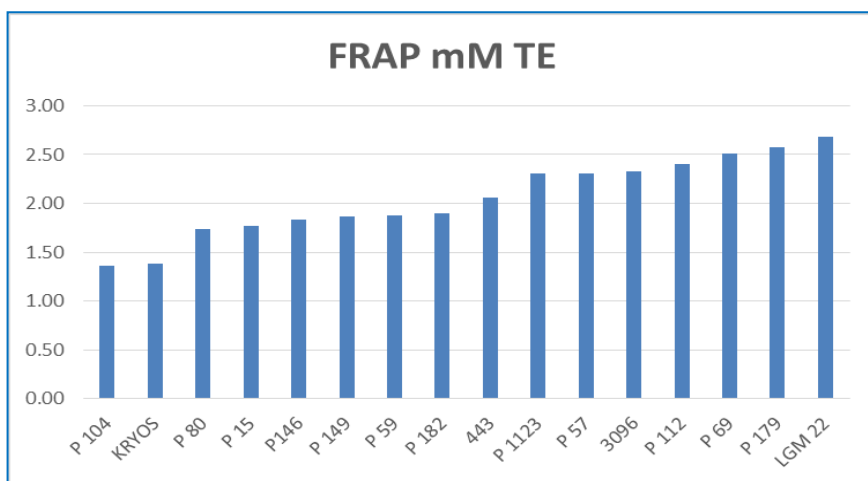
Πίνακας 14. Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH* των στελεχών *P. ostreatus*

Στέλεχος <i>P. ostreatus</i>	Δυνατότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH (mmol TE* / 100 g f.w.)
LGM 22	4,07
P112	3,24
P59	2,30
P1123	1,94
3046	1,31
P15	3,45
P179	1,20
443	1,02
P182	0,91
P57	0,82
P146	1,18
P80	1,73
P149	0,92
P69	1,00
P104	1,69
KRYOS	2,65

*: TE= ισοδύναμο Trolox

3.3.2 Ικανότητα αναγωγής του Fe^{3+} (FRAP, Ferric anion Reducing Antioxidant Power)

Η ικανότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων των στελεχών *P. ostreatus* να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο φαίνεται σχηματικά στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 9 και δίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 15.



Σχήμα 9.
Αναγωγική
δύναμη (FRAP)
στελεχών *P.*
ostreatus για

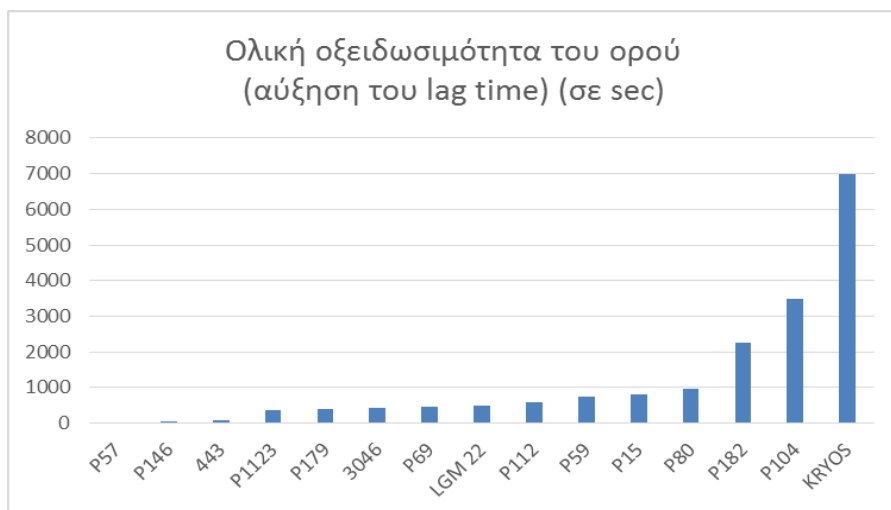
Πίνακας 15. Ικανότητα αναγωγής Fe^{+3} των στελεχών *P. ostreatus*

Στέλεχος <i>P. ostreatus</i>	Ικανότητα αναγωγής Fe^{+3} (mmol TE / 100 g f.w.)
LGM 22	2,69
P112	2,40
P59	1,86
P1123	2,30
3046	2,23
P15	1,85
P179	2,11
443	2,55
P182	1,60
P57	2,32
P146	1,74
P80	1,88
P149	1,82
P69	2,51
P104	1,69
KRYOS	1,38

*: TE= ισοδύναμα Trolox

3.3.3 Προστατευτική επίδραση των εκχυλισμάτων *P. ostreatus* έναντι της οξείδωσης της LDL

Η επίδραση των εκχυλισμάτων των στελεχών *P. ostreatus* στον χρόνο αντίστασης ανθρώπινου ορού στην οξείδωση από χαλκό, ως αύξηση του lag time φαίνεται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 10 και αναλυτικά στον Πίνακα 16.



Σχήμα 10.
Επαγόμενη από
τα εκχυλίσματα *P.*
Ostreatus αύξηση
του χρόνου
αντίστασης του
ορού στην
οξείδωση από
χαλκό (sec)

Πίνακας 16. Επαγόμενη από *P. ostreatus* αύξηση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση, σε σχέση με δείγματα ελέγχου (control) Διαφορετικά γράμματα (a,b) μεταξύ δειγμάτων φανερώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά

Στέλεχος <i>P. Ostreatus</i>	Οξείδωσιμότητα του ορού (αύξηση του lag time) (sec)
LGM 22	492.5±128.0 ^b
P112	603.3±255.5 ^b
P59	749.5±263.4 ^b
P1123	375.0±72.9 ^b
3046	442.0±240.6 ^b
P15	806.4±527.8 ^b
P179	403.3±293.6 ^b
443	76.0±45.1 ^b
P182	2252.5±376.9 ^{ab}
P57	7.0±2.3 ^b
P146	43.3±30.5 ^b
P80	955.3±537.7 ^b
P149	-
P69	462.0±227.8 ^b
P104	3477.2±1512.0 ^{ab}
KRYOS	6975.4±3173.7 ^a

3.4 Συνολική αξιολόγηση των στελεχών *P. ostreatus*

Στο Πίνακα 17 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα επιλεγμένων παραμέτρων και χρωματίζονται με κίτρινο οι καλύτερες τιμές κάθε παραμέτρου. Κάθε δείγμα αξιολογείται εμπειρικά με βάση τον αριθμό των καλύτερων επιδόσεων που έχει συγκεντρώσει.

Πίνακας 17. Συνολική αξιολόγηση των 16 στελεχών που μελετήθηκαν

STRAIN	EARLINESS	Yield 1+2 flush	Cropping	weight 1st flush	Quality (1/x)	TPC	AAR (DPPH)	FRAP	Total serum oxidisability (increase of lag time (sec)	Ergosterol (mg/100g fw)	Number of yellows
LGM 22	20.5	536.65	11.83	7.16	0.3	700.69	0.41	2.69	0	62.53	7
KRYOS	26	640.39	29.33	25.01	1.0	778.82	0.27	1.38	6975	79.08	6
P 15	28	541.87	29.83	9.75	1.0	681.42	0.34	1.77	702	47.58	5
P 69	49	498.16	40.00	15.76	1.0	358.43	0.07	2.51	167	61.98	4
P 112	33	552.68	28.17	5.90	0.5	861.93	0.32	2.40	666	39.10	4
P146	46	508.58	20.67	11.40	0.5	218.11	0.12	1.84	43	80.81	3
P 179	46	475.12	23.83	9.17	1.0	353.19	0.12	2.57	706	51.77	3
P 104	27	620.12	27.50	11.43	1.0	526.18	0.17	1.36	3778	13.45	3
P 80	26	422.75	28.50	32.49	1.0	516.23	0.17	1.73	955	37.68	3
P 182	72	549.67	28.50	23.92	1.0	532.00	0.09	1.90	209	64.71	3
P 59	22	308.42	31.17	12.05	1.0	528.34	0.23	1.88	557	34.25	2
P 1123	43	439.13	24.17	12.89	1.0	365.01	0.19	2.31	375	34.86	2
P 57	43	533.74	25.67	17.76	1.0	236.47	0.08	2.31	0	17.03	2
3096	50	585.67	43.60	27.74	0.5	331.77	0.13	2.33	369	10.42	2
443	78	324.32	29.40	49.13	0.5	366.98	0.10	2.06	60	34.19	1
P 149	46	520.52	36.17	17.49	0.5	126.91	0.09	1.87	0	18.75	0
Με κίτρινο σημειώνονται οι καλύτερες τιμές κάθε στήλης (όχι υποχρεωτικά οι μεγαλύτερες)											

Στον Πίνακα 18 δίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των τριών δοκιμών αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μανιταριών του είδους *P. ostreatus*, καθώς και τα αποτελέσματα προσδιορισμού της εργοστερόλης των δειγμάτων (μέσος όρος 4 μετρήσεων και τυπική απόκλιση). Επιπρόσθετα, φαίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στα δείγματα (Gabriel's t-test, $p < 0,05$).

Πίνακας 18. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιεκτικότητα σε εργοστερόλη των στελεχών *Pleurotus ostreatus*.

Στέλεχος	Δυνατότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας DPPH (mmol TE / 100 g f.w.)	Αναγωγική δύναμη (FRAP) ή δυνατότητα αναγωγής Fe ⁺³ (mmol TE / 100 g f.w.)	Αναστολή οξείδωσης λιποπρωτεϊνών του ορού (lag time elongation, sec)	Εργοστερόλη (mg/100g f.w.)
LGM 22	4.07±0.66 ^a	2.69±0.33 ^a	492.5±128.0 ^b	37.68±18.78 ^{cdef}
P112	3.24±0.38 ^{abc}	2.40±0.68 ^a	603.3±255.5 ^b	80.81±6.76 ^a
P59	2.30±0.47 ^{bcd}	1.86±0.49 ^a	749.5±263.4 ^b	64.71±17.97 ^{ab}
P1123	1.94±0.30 ^{bcd}	2.30±0.39 ^a	375.0±72.9 ^b	18.75±6.65 ^{def}
3046	1.31±0.54 ^{cde}	2.23±0.23 ^a	442.0±240.6 ^b	51.77±9.64 ^{bc}
P15	3.45±0.46 ^{ab}	1.85±0.68 ^a	806.4±527.8 ^b	47.58±4.19 ^{bc}
P179	1.20±0.28 ^{de}	2.11±0.53 ^a	403.3±293.6 ^b	34.19±11.50 ^{cde}
443	1.02±0.17 ^{de}	2.55±0.55 ^a	76.0±45.1 ^b	13.45±3.10 ^{ef}
P182	0.91±0.63 ^{de}	1.60±0.41 ^a	2252.5±376.9 ^{ab}	10.42±5.13 ^f
P57	0.82±0.45 ^e	2.32±0.53 ^a	7.0±2.3 ^b	39.10±12.09 ^{cd}
P146	1.18±0.27 ^{de}	1.74±0.15 ^a	43.3±30.5 ^b	34.86±9.85 ^{cde}
P80	1.73±0.88 ^{bcd}	1.88±0.22 ^a	955.3±537.7 ^b	79.08±6.89 ^a
P149	0.92±0.36 ^{de}	1.82±0.65 ^a	-	17.03±0.84 ^{def}
P69	1.00±0.64 ^{de}	2.51±0.71 ^a	462.0±227.8 ^b	34.25±10.13 ^{cde}
P104	1.69±1.13 ^{cde}	1.69±0.11 ^a	3477.2±1512.0 ^{ab}	61.98±19.22 ^{ab}
KRYOS	2.65±0.45 ^{abcd}	1.38±0.34 ^a	6975.4±3173.7 ^a	62.53±12.32 ^{ab}

a, b: Διαφορετικά γράμματα μεταξύ δύο δειγμάτων φανερώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Πληροφορίες για την καλλιέργεια

Από τα αποτελέσματα που αφορούν την καλλιέργεια κάθε στελέχους, (Πίνακας 8) παρατηρείται ότι υπάρχει διακύμανση στη πρωιμότητα, δηλαδή στο χρόνο που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό του υποστρώματος μέχρι το σχηματισμό καταβολών καρποφορίας. Ταχύτερη καρποφορία εμφανίζει το στέλεχος από την Γαλλία (LGM22), που καρποφόρησε σε 20 μέρες και ακολουθούν το στέλεχος από την Ορεσιτιάδα (P59) (22 μέρες) και τα δύο εμπορικά στελέχη (KRYOS και P80) (26 μέρες). Την βραδύτερη καρποφορία παρουσιάζει το στέλεχος από τον Άλιμο (P182), με εβδομήντα δύο μέρες από τον εμβολιασμό μέχρι την καρποφορία.

Σχετικά με τις αποδόσεις των κυμάτων παραγωγής, στο πρώτο κύμα υπερτερεί το ένα από τα τρία εμπορικά είδη, το 3096 (513,01g) και ακολουθεί το στέλεχος από τον Άλιμο (P182) με 458,67g. Χαμηλότερη απόδοση στο πρώτο κύμα παραγωγής παρουσιάζει το άλλο εμπορικό είδος P80 (231,04g). Όσον αφορά στο συνολική απόδοση των δύο κυμάτων παραγωγής, τη μεγαλύτερη παραγωγή (σε γραμμάρια) αποδίδει το εμπορικό είδος KRYOS (640g) με μικρή διαφορά με το στέλεχος από το Γαρδίκι (P104) (620g), ενώ την μικρότερη ποσότητα παρουσιάζει το ελληνικό εμπορικό δείγμα P80.

Σε σχέση με τη συνολική απόδοση κάθε στελέχους σε γραμμάρια παραγωγής, το εμπορικό στέλεχος KRYOS με 722g παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συνολική ποσότητα παραγωγής συγκριτικά με τα άλλα στελέχη, και ακολουθεί το στέλεχος από το Γαρδίκι P104 (707g). Στις επόμενες θέσεις κατατάσσονται το εμπορικό στέλεχος 3096 (648g), το δεύτερο εμπορικό στέλεχος P80 (646g) και το στέλεχος από τη Γαλλία LMG22 (645g), με παρόμοιες ποσότητες. Τη μικρότερη συνολική απόδοση σε γραμμάρια παρουσιάζει το στέλεχος από την Τσεχία (443) (322g).

Στις δύο τελευταίες στήλες του Πιν. 8 δίνονται στοιχεία που αφορούν κυρίως την αγοραστική αξία των στελεχών και συγκεκριμένα το μέσο βάρος των μανιταριών και τα οπτικά ελκυστικά χαρακτηριστικά που θα ωθήσουν τον

καταναλωτή να τα προτιμήσει. Ως το ελκυστικότερο χαρακτηρίζεται το στέλεχος από την Γαλλία (LGM22).

4.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων *P. ostreatus* σε βιοδραστικά συστατικά

4.2.1 Λιπαρά οξέα

Προσδιορίσθηκαν 29 διαφορετικά λιπαρά οξέα με κύριο λιπαρό οξύ το πολυακόρεστο και απαραίτητο για τον άνθρωπο λινελαϊκό οξύ (18:2ω6) (56,82-80,53%). Το δείγμα με το υψηλότερο περιεχόμενο σε λινελαϊκό οξύ ήταν το στέλεχος από τη Γαλλία (80,53%) ενώ εκείνο με το χαμηλότερο περιεχόμενο ήταν το στέλεχος 443 από το εξωτερικό (56,82%).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 9, σε όλα τα στελέχη το κλάσμα που κυριαρχεί είναι αυτό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (58,84-80,63% του συνόλου των λιπαρών οξέων), ενώ ακολουθούν κατά σειρά τα κορεσμένα (8,77-17,07%) και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (6,76-20,29%). Εξαίρεση αποτέλεσε το στέλεχος που συλλέχθηκε στην περιοχή της Γραμμένης οξιάς Αιτωλοακαρνανίας, στο οποίο τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα υπερισχύουν των κορεσμένων.

Από τα ελληνικά δείγματα το υψηλότερο περιεχόμενο σε λινελαϊκό οξύ εντοπίστηκε στο δείγμα του Χελμού από την Πελοπόννησο (76,90%) ενώ εξίσου υψηλό περιεχόμενο, υψηλότερο και από τα τρία εμπορικά δείγματα (71,26-66,58) φάνηκε να έχουν τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην Τρίπολη (75,66%), την Ορεστιάδα (74,42), τη Γραμμένη οξιά(2) (74,06%), το Γαρδίκι (73,72%) και την Ηλιούπολη (71,77%).

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

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

Επιπλέον ανιχνεύτηκαν σε μικρές ποσότητες τα: στεατικό (18:0), δεκαπεντανικό (15:0), βεχενικό (18:1ω7), αραχιδικό (20:0), παλμιτελαϊκό (16:1), μυριστικό (14:0), α-λινολενικό, αραχιδονικό και ελαιδικό καθώς και πολύ μικρές ποσότητες (0,2-1,3%) κάποιων άλλων λιπαρών οξέων. Τέλος με τη βοήθεια του ανιχνευτή μάζας ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες των δικαρβοξυλικών οξέων φουμαρικό (βουτενεδιικό), ηλεκτρικό (βουτανοδιικό) και σουμπερικό (οκτανοδιικό), τα οποία ταυτοποιήθηκαν από τα θραύσματα των φασμάτων μαζών τους.

Το λινελαϊκό οξύ ήταν το κύριο λιπαρό οξύ σε όλα τα δείγματα και αποτελεί και τον κύριο αντιπρόσωπο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Ωστόσο, επειδή η συνολική περιεκτικότητα των μανιταριών σε λιποειδή είναι χαμηλή η συμβολή τους στην επίτευξη των προτεινόμενων προσλήψεων σε απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολύ μικρή. Έτσι, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που προκύπτουν από το λινελαϊκό οξύ και ευθύνονται για το ιδιαίτερο άρωμα των μανιταριών. Σε σημαντικά ποσοστά βρέθηκαν το παλμιτικό, κύριος εκπρόσωπος των κορεσμένων λιπαρών οξέων, και το ελαϊκό, το οποίο είναι το κύριο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ.

Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία τιμές και συγκεκριμένα με αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* από τη Πορτογαλία [49], την Ινδία, την Κίνα [60] και την Τουρκία [61]. Αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφανίζονται τα αποτελέσματα των Yilmaz et al. [62], σύμφωνα με τα οποία τα μονοακόρεστα υπερτερούν των πολυακόρεστων. Ένα άλλο στοιχείο που δεν συμφωνεί με τη βιβλιογραφία είναι η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε στεατικό

οξύ. Σύμφωνα με τους Yilmaz et al. [62], Ergönül et al. [61] και Reis et al. [50] σε στελέχη του είδους *Pleurotus ostreatus* εντοπίστηκαν ποσότητες στεατικού οξέος σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος όπου η περιεκτικότητα των μανιταριών στο συγκεκριμένο οξύ ήταν αμελητέα (0,58%).

4.2.2 Περιεκτικότητα δειγμάτων *P. ostreatus* σε στερόλες

Η εργοστερόλη ήταν η κύρια στερόλη στα δείγματα των *P. ostreatus*. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε εργοστερόλη παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις (10,42-80,81 mg/100g νωπού βάρους), όπως προκύπτει από το Σχήμα 6 και τον Πίνακα 11. Η μέγιστη τιμή (80,81 mg/100 g fw) παρατηρήθηκε στο δείγμα που συλλέχθηκε από την περιοχή της Γραμμένης Οξιάς (1) ενώ η ελάχιστη (10,42 mg/100g fw) στο δείγμα του Αλίμου. Το δείγμα της Γαλλίας (37,68 mg/100 g fw) εμφάνισε περιεκτικότητα ενδιάμεση σε σχέση με αυτή των ελληνικών δειγμάτων (40,41 mg/100 g fw κατά μέσο όρο), ενώ η τιμή του δείγματος της Τσεχίας ήταν χαμηλή (13,45 mg/100g fw) και πλησίαζε την ελάχιστη τιμή που προσδιορίστηκε. Αν εξαιρεθεί το δείγμα της Γραμμένης Οξιάς, το οποίο και εμφάνισε τη μέγιστη τιμή, μόνο το δείγμα της Ορεστιάδας είχε τιμή οριακά μεγαλύτερη από τα εμπορικά δείγματα, ενώ το δείγμα από το Γαρδίκι ήταν το μοναδικό που η περιεκτικότητά του σε εργοστερόλη βρισκόταν εντός του εύρους των περιεκτικότητων των εμπορικών δειγμάτων. Όλα τα άλλα δείγματα είχαν τιμές μικρότερες των εμπορικών.

4.2.3 Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά

Όπως παρατούμε και στο πίνακα 12 δεν ανιχνεύτηκαν όλες οι φαινόλες και τα τερπενικά οξέα του πίνακα 7. Συγκεκριμένα η βανιλίνη ,ανιχνεύθηκε σε μικρές ποσότητες στο LGM22 το P112, το P59 και στο P104. Το κινναμικό οξύ εντοπίστηκε σε όλα σχεδόν τα στελέχη με ψηλότερη τιμή στο στέλεχος από τη Γαλλία (LGM22). Οι ποσότητες τυροσόλης που ανιχνευθηκαν ήταν πολύ μικρές σε αντίθεση με τις ποσότητες βενζοϊκού οξέος που είναι σε αυξημένο επίπεδο. Τη μεγαλύτερη ποσότητα βενζοϊκού εντοπίσαμε στο KRYOS(εμπορικό) και ακολουθεί το P104 (Γαρδίκι). Όσον αφορά το φαινυλοξικό οξύ ανιχνεύθηκε σε όλα τα στελέχη,

όχι όμως και το βανιλλικό που δεν ανιχνεύθηκε σε σημαντική ποσότητα σε κανένα δείγμα. Τα πρωτοκατεχικό οξύ, 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικό οξύ, συρινγικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, και καφεϊκό οξύ βρέθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες σε κάποια δείγματα. Τα τερπενικά οξέα ολεανικό και ουρσολικό ανιχνεύτηκαν στα στελέχη LGM22 (Γαλλία) και στο εμπορικό P112.

4.2.4. Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των στελεχών που μελετήθηκαν κυμαίνεται από 1,27 έως 8,62 mg GAE/ 100g f.w. (Πίνακας 1).¹ Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει το στέλεχος από τη Γραμμένη Οξιά (8,62 mg GAE/ 100g f.w.) ακολουθεί το ένα εμπορικό ελληνικό στέλεχος (7,79 mg GAE/ 100g f.w.) και έπονται το στέλεχος από τη Γαλλία (7,01 mg GAE/ 100g f.w.) και το δεύτερο στέλεχος από τη Γραμμένη Οξιά (6,81 mg GAE/ 100g f.w.). Τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις έδωσαν τα στελέχη από τη Τρίπολη, τα Σπάτα και την Ηλιούπολη με 3,66, 2,54 και 1,27 mg GAE/ 100g f.w., αντίστοιχα.

4.3 Αντιοξειδωτική Ικανότητα των εκχυλισμάτων των μανιταριών

4.3.1 Ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•]

Μεταξύ των 16 στελεχών, το στέλεχος από τη Γαλλία παρουσιάζει την μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (4,01 mmol TE /100 g f.w.) και ακολουθεί με μικρή διαφορά το στέλεχος από τη Γραμμένη Οξιά 1. Πολύ χαμηλές τιμές, μικρότερες από 0,15 mmol TE /100 g νωπού βάρους, έδωσαν με σειρά από το μεγαλύτερο στο μικρότερο τα δείγματα 3096 (εμπορικό), P179 (Βοιωτία), P146 (Σπάτα), 443 (Τσεχία), P149 (Ηλιούπολη), P182 (Άλιμος), P57 (Τρίπολη/καστανιά), P69 (Χελμός/Ιτιά).

4.3.2 Ικανότητα αναγωγής του Fe³⁺ (FRAP)

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 15, καθώς και από το διάγραμμα του Σχήματος 9, τα δείγματα παρουσιάζουν σημαντική αναγωγική δύναμη. Τις υψηλότερες τιμές έδωσαν τα δύο στελέχη του εξωτερικού (Γαλλία 2,69 mmolTE/100 g f.w. και Τσεχία 2,55 mmol TE/100 g f.w.). Ακολουθούν πέντε

ελληνικά στελέχη με αναγωγική δύναμη μεγαλύτερη από 2 mmolTE/100 g f.w.την εξής σειρά: Γραμμένη> Οξιά >Τρίπολη> Καστανιά > Μεσσηνία και έπεται το ένα εμπορικό στέλεχος από τα τρία που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, όλα τα υπόλοιπα στελέχη παρουσιάζουν αναγωγική δύναμη χαμηλότερη από 2 mmolTE/100 g f.w.

4.3.2 Προστατευτική επίδραση των εκχυλισμάτων *P. ostreatus* έναντι της οξείδωσης της LDL ορού

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων εκφράστηκε ως επιμήκυνση του χρόνου αντίστασης του ορού στην οξείδωση (χρόνος επαγωγής, lag time). Απαραίτητη σε τέτοιου είδους μελέτες κρίνεται η χρήση δειγμάτων ελέγχου (control), διότι ο ορός εμφανίζει από μόνος του μια αντίσταση στην οξείδωση. Η επαγόμενη από τα εκχυλίσματα των μανιταριών αύξηση της αντίστασής στην οξείδωση προέκυψε από την αφαίρεση του χρόνου επαγωγής των control δειγμάτων, από τους χρόνους που καταγράφηκαν στα δείγματα με τα εκχυλίσματα των μανιταριών.

Παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στην αντίσταση του ορού στην οξείδωση. Η μέγιστη τιμή (6975 sec) παρατηρήθηκε σε ένα από τα τρία εμπορικά δείγματα. Όσον αφορά στα Ελληνικά δείγματα μεγαλύτερη επιμήκυνση του χρόνου επαγωγής έδωσε το δείγμα P104 από το Γαρδίκι (3477 sec), ενώ σημαντικά υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν στα δύο δείγματα της Γραμμένης Οξιάς P15 (806sec) και P112 (603 sec), στο δείγμα της Ορεστιάδας P112 (603 sec) στο δείγμα της Βοιωτίας P179 (403 sec) και στο δείγμα του Χελμού P69 (462 sec). Χαμηλές τιμές παρατηρήθηκαν στα δείγματα από τα Σπάτα P146 (43 sec), και τον Άλιμο P182 (209 sec), ενώ τα δείγματα από την Τρίπολη (7 sec) και την Ηλιούπολη (0 sec) δεν προκάλεσαν αύξηση στο χρόνο επαγωγής. Τα υπόλοιπα ελληνικά δείγματα είχαν τιμές παραπλήσιες με αυτές των εμπορικών. Παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές και μεταξύ των εμπορικών δειγμάτων, που κυμάνθηκαν από 442-6975 sec. Το δείγμα της Γαλλίας (LGM22) προκάλεσε αύξηση 492 sec στο χρόνο επαγωγής, ενώ η αύξηση που προκλήθηκε από το δείγμα της Τσεχίας (No 443) ήταν πολύ μικρή (76 sec).

4.4 Συνολική αξιολόγηση των στελεχών *P. ostreatus*

Το στέλεχος με τις περισσότερες καλύτερες επιδόσεις είναι το στέλεχος με κωδική ονομασία LGM22 από την Γαλλία. Το συγκεκριμένο δείγμα έχει την καλύτερη πρωιμότητα και υψηλές τιμές παραγωγής σε όλα τα κύματα παραγωγής. Επίσης έχει υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, ενώ παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα στα δύο από τα τρία τεστ (DPPH, FRAP).

Ακολουθεί το στέλεχος KRYOS, ένα από τα 3 εμπορικά στελέχη. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ουσίες. Επίσης εμφάνισε ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας (πρωιμότητα και απόδοση στο πρώτο κύμα παραγωγής) και διαθέτει ελκυστικά οπτικά χαρακτηριστικά. Τέλος, καθυστέρησε σημαντικά την οξείδωση του ορού στο αντιοξειδωτικό τεστ που πραγματοποιήθηκε.

Τρίτο σε κατάταξη βρίσκεται το P15 που είναι ένα από τα αυτοφυή, από ελληνικά ενδιαιτήματα στέλεχος και προέρχεται από την Γραμμένη Οξιά. Έδωσε κορυφαίες επιδόσεις στα δύο από τα τρία αντιοξειδωτικά τεστ (DPPH & αντίσταση στην οξείδωση του ορού). Επίσης, διαθέτει υψηλές ποσότητες φαινολικών συστατικών και βρίσκεται μεταξύ των κορυφαίων αναφορικά με τα χαρακτηριστικά καλλιέργειας και τα οπτικά χαρακτηριστικά.

Τα αμέσως επόμενα είναι τα ελληνικά αυτοφυή P69 από το Χελμό, P112 από τη Γραμμένη Οξιά και P146 από τα Σπάτα. Έπονται τα P179, P104, P80, P182, με τρεις υψηλές επιδόσεις. Δύο μόνο καλύτερες επιδόσεις έδωσαν στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τα στελέχη P59, P1123, P57, 3096. Το αυτοφυές εισαγόμενο στέλεχος από τη Τσεχία το 443 έχει μία μόνο κορυφαία επίδοση που αφορά το πρώτο κύμα παραγωγής. Τελευταίο με καμία κορυφαία επίδοση βρίσκεται το στέλεχος P149 από την Ηλιούπολη.

Από το παραπάνω πίνακα διαπιστώνουμε ότι ενώ το στέλεχος με τις κορυφαίες επιδόσεις είναι ένα από τα αυτοφυή του εξωτερικού ακολουθούν και μάλιστα με μικρή διαφορά στην κατάταξη, στελέχη από ελληνικά ενδιαιτήματα. Μάλιστα παρατηρούμε ότι το άλλο εισαγόμενο αυτοφυές (443) βρίσκεται στη προτελευταία θέση. Όσον αφορά στα εμπορικά ελληνικά στελέχη, το ένα καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση, με πολλές κορυφαίες επιδόσεις και μικρή

διαφορά από το αμέσως επόμενο στη κατάταξη που είναι αυτοφυές ελληνικό, τα άλλα δύο εμπορικά όμως, βρίσκονται χαμηλά στη κατάταξη. Σημαντικός περιορισμός στην μελέτη μας ήταν ότι το δείγμα των μανιταριών που εξετάστηκαν ήταν ανομοιογενές, διότι τα αυτοφυή στελέχη του εξωτερικού ήταν σε μικρό εύρος δειγμάτων (μόλις δύο στελέχη) σε σχέση με τα αντίστοιχα του εσωτερικού. Με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν καταλήγουμε ότι τα ελληνικά αυτοφυή μανιτάρια είναι τουλάχιστον ανταγωνιστικά με τα αντίστοιχα αυτοφυή του εξωτερικού καθώς και με τα εμπορικά εισαγόμενα. Με δεδομένο και την ποικιλία βιοδραστικών μικροσυστατικών που διαθέτουν, μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο για τη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής, όσο και για την κάλυψη της εγχώριας ζήτησης για εδώδιμα μανιτάρια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ουζούνη, Π. (2009). Προσδιορισμός βασικής σύστασης μεταλλικών στοιχείων και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων με SPME-GC/MS σε καρποσώματα αυτοφυών ελληνικών εδώδιμων μακρομυκήτων. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [2] Feeney, M.J., Miller, A.M., Roupas, P. (2014). Mushrooms - Biologically Distinct and Nutritionally Unique. *Nutrition Today*. 49 (6)h, 301-307.
- [3] Philippoussis, A. Zervakis, G. (2000). Cultivation of edible mushrooms in Greece: presentation of the current status and analysis of future trends. In *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol. 15, pp. 843-848. Edited by L.Van Griensven. Maastricht.
- [4] Yildiz, A., Karakaplan, M., Aydin, F. (1998). Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores. *Food Chemistry*, 61(1), 127-130.
- [5] Μαρινάκης, Ι. (2015). Κύρια καλλιεργούμενα είδη μακρομυκήτων (μανιτάρια) στην Ελλάδα: τεχνικές καλλιέργειας, μονάδες παραγωγής, εμπορία και προοπτικές.
- [6] Κουγιουμτζή, Μ.Ε. (2015). Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες εδώδιμων Ελληνικών μανιταριών του γένους *Pleurotus*. Πτυχιακή εργασία. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.
- [7] <https://www.kullabs.com/class-10/science/biology/reproduction-by-spores/mushroom-morphology> (πρόσβαση 17/5/2016)
- [8] Kalač P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9–16.
- [9] Rajarathnam, S., Bano, Z., Miles, P. G. (1987). *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 26(2), 157-223.
- [10] http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/woller_ryan/classification.htm (πρόσβαση 17/5/2016)
- [11] Κελτεμλίδης, Δ.Θ. (1990). Τα φαρμακευτικά μανιτάρια. Εκδ. Ψύχαλου, Αθήνα.
- [12] Volk, T.J. (2003). Tom Volk's Fungus of the Month for October 1998. University of Wisconsin-La Crosse. http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/oct98.html (πρόσβαση 17/5/2016)

- [13] Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R. (2008). Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3856-3862
- [14] USDA (2016). National Nutrient Database for Standard Reference. <http://ndb.nal.usda.gov/>. (Πρόσβαση 10/5/2016)
- [15] Vatter, D. A., Maitin, V. (Eds.). (2015). *Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications*. DEStech Publications, Inc.
- [16] Lam, Y. S., Okello, E. J. (2015). Determination of lovastatin, β -glucan, total polyphenols, and antioxidant activity in raw and processed oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(2), 117-128.
- [17] Manzi, P., Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 68(3), 315-318.
- [18] Jaworska G., Bernaś E. (2009). Qualitative changes in *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. mushrooms resulting from different methods of preliminary processing and periods of frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* .89(6):1066–75.
- [19] Mattila P, Könkö K, Euroala M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.49 (5):2343–2348.
- [20] Yim HS, Chye FY, Ho SK, He CW. (2009). Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *As J Food Ag-Ind*.2(03):392–401.
- [21] Gil-Ramirez, A., Clavijo, C., Palanisamy, M., Soler-Rivas, C. (2011). Edible mushrooms as potential sources of new hypocholesterolemic compounds. Mushroom biology and mushroom products. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 2011 Oct 4-7; Arcachon, France*. Vol. 2. Poster session; pp. 110–119.
- [22] Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., & Tweddell, R. J. (2006). Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological Research*, 110(10), 1179-1183.
- [23] Bauer-Petrovska, B. (2001). Protein fractions in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212, 469–472.

- [24] Vetter, J., Rimóczi, I. (1993). Crude, digestible and indigestible protein in fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 197, 427–428.
- [25] <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866> (πρόσβαση 27/5/2016)
- [26] Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Horst, R. L., Minor, B., Simon, R. R., Feeney, M. J., & Haytowitz, D. B. (2011). Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7841-7853.
- [27] Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U., Berger, R. G., Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, 3(1), 17-24.
- [28] Jasinghe, V. J., Perera, C. O. (2006). Ultraviolet irradiation: the generator of vitamin D₂ in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 95(4), 638-643.
- [29] Dufourc, E.J. (2008). Sterols and membranes dynamics. *Journal of Chemical Biology* 1(1-4), 63-77.
- [30] Barreira, L. D. A., Baptista, S. D. S. (2014). A (re) configuração do campo da enfermagem durante o Estado Novo (1937-1945).
- [31] Senatore, F., Dini, A., Marino, A., Schettino, O. (1988). Chemical constituents of some basidiomycetes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45(4), 337-345.
- [32] Jasinghe V. J. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation *Food Chemistry*, 92(3), 541–546.
- [33] Keegan Raphael-John H., Lu Z., Bogusz J.M, Williams J.E Holick M.F, 2013. Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. *Dermato-Endocrinology* 5:1, 165–176
- [34] Urbain P., Singler F., Horst G., Biesalski H-K, Bertz H. (2011) . Bioavailability of vitamin D₂ from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65:965-71
- [35] Senatore F., Dini A, Marino A. Chemical Constituents of Some Basidiomycetes (1988). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45, 337-345
- [36] Χίου, Α.Π. (2003). Φυσικοχημεία και Βιοχημεία Τροφίμων. Σημειώσεις Φροντιστηρίου. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Αθήνα.

- [37] Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- [38] Βαφοπούλου – Μαστρογιαννάκη, Α. (2003). Βιοχημεία τροφίμων. Εκδ. Ζήτη. Θεσσαλονίκη.
- [39] Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Reviews of Nutrition*, 22(1), 19-34.
- [40] Dedoussis, G. V., Kaliora, A. C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N. G., Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2), 293-303.
- [41] Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81(7), 715-723.
- [42] Ιωάννου, Μ. (2007). Αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτική δράση ξηρών καρπών και οσπρίων από την ελληνική αγορά. Μεταπτυχιακή διατριβή. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.
- [43] Petroni, A., Blasevich, M., Papini, N., Salami, M., Sala, A., Galli, C. (1997). Inhibition of leukocyte leukotriene B₄ production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thrombosis Research*, 87(3), 315-322.
- [44] Visioli, F., Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4292-4296.
- [45] Andrikopoulos, N. K., Antonopoulou, S., Kaliora, A. C. (2002). Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *LWT-Food Science and Technology*, 35(6), 479-484.
- [46] [40] D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.
- [47] [41] Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Ławrynowicz, M., & Soszyński, M. (2010). The Role of Polyphenols, β -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms. *Journal of Nutrition and Metabolism*,.
- [48] [42] Chirinang P, Intarapichet K-O. (2009). Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *Sci Asia*;35(4), 326.

- [49] [43] Kim JH, Kim SJ, Park HR, Choi JI, Ju YC, Nam KC, (2009). Kim SJ, Lee SC The different antioxidant and anticancer activities depending on the colour of oyster mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (12):1016–20.
- [50] [43] Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira IC.(2012). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5):1201–7.
- [51] [45] Yang JH, Lin HC, Mau JL. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77(2):229–35.
- [52] [46] Synytsya A, Míčková K, Jablonský I, Sluková M, Čopíková J. (2008). Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Science*, 26(6):441–46.
- [53] [48] Μπόσκου, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.
- [54] [49] Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Babu, M. N., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/Freeze Drying-An Review. *International Journal on Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87-98.
- [55] <http://freezedrying.com>, 2015 American Lyophilizer, Inc.) (πρόσβαση 27/5/2016)
- [56] Torres, M.C. Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I., Pérez-Coello M.S (2010). Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*. 660, 177–182
- [57] Fluka chemika, (1995). *Organosilicon Compounds, Analytical Applications, Synthetic Applications*. Second edition.
- [58] Koutrotsios, G., Mountzouris, K. C., Chatzipavlidis, I., & Zervakis, G. I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi–Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chemistry*, 161, 127-135.
- [59] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- [60] Dimou D.M, Georgala Ai.,Komaitis M,Aggelis G. (2002). Myceliac fatty acid composition of *Pleurotus* spp and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, 106(8) : 925-929

- [61] Ergö Yilmaz N. Mehtap Solmaz M., Turkekul I., Elmastas M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99 (2006) 168–174