

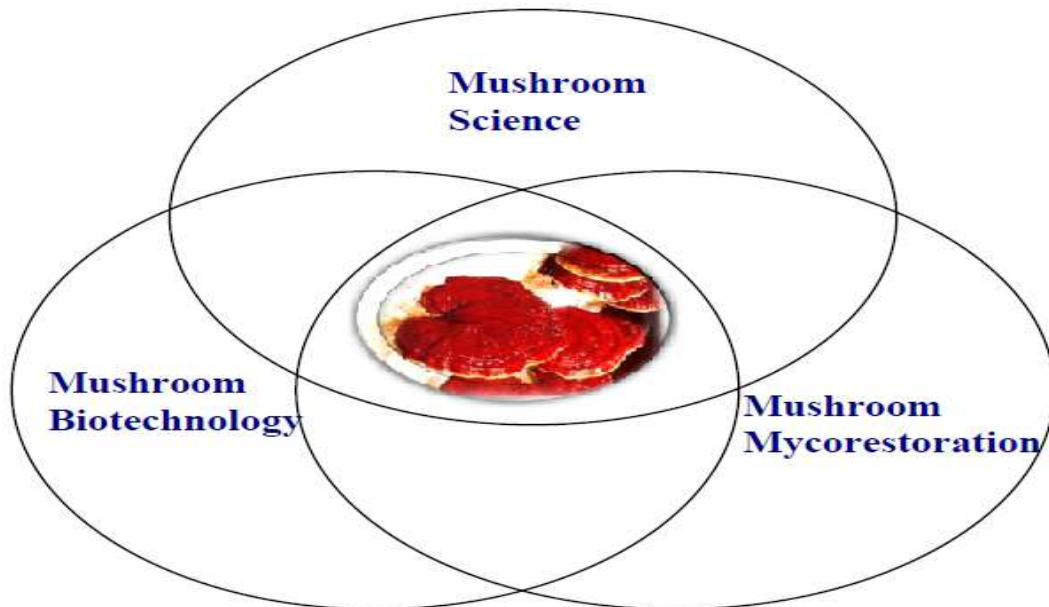


Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

ΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου»  
Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια

Μεταπτυχιακή μελέτη

«Μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσωμάτων  
μυκήτων του γένους *Ganoderma*»



Επιβλέπων:

Παπανικολάου Σεραφείμ

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευσταθιάδου Ευδοξία

Αθήνα, 2016



## **Μεταπτυχιακή μελέτη**

Μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσωμάτων  
μυκήτων του γένους *Ganoderma*

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Διαμαντοπούλου Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Καλιώρα Ανδριάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών

### **Επιβλέπων:**

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**Ευσταθιάδου Ευδοξία**

**Αθήνα, 2016**



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας η οποία πραγματοποιήθηκε υπό την αιγίδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016 συνεργάστηκα με πολλά εργαστήρια, για αυτό και θέλω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό που τα στελεχώνουν.

Αρχικά, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα μου, τον Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ υπό την επίβλεψή του.

Έπειτα, θέλω να ευχαριστήσω την Διαμαντοπούλου Σάντη, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και τον Φιλιππούση Αντώνη, Τακτικό Ερευνητή ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) για τις γνώσεις που μου παρείχαν, την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου πρόσφεραν κατά την τέλεση της πρώτης φάσης των πειραμάτων στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ, αλλά και για την υπομονή που έδειξαν καθώς και για την υποστήριξη κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ακόμα ευχαριστώ την Καλιώρα Ανδριάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια καθώς και τον Καλογερόπουλο Νίκο, Αναπληρωτή Καθηγητή και του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών, καθότι με καθοδήγησαν και με βοήθησαν στην τέλεση των πειραμάτων της δεύτερης φάσης, τα οποία έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας - Φυσικοχημείας τροφίμων του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, τους (υποψήφιους) διδάκτορες αλλά και τους μέτα-διδάκτορες, όπως την Αριστέα Γκιοζάρη για την πολύτιμη βοήθεια που πρόσφεραν καθώς επίσης και τους δικούς μου ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου όταν τους χρειάστηκα.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοδραστηκότητας εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσωμάτων μυκήτων του γένους *Ganoderma* και είδους *adspersum*, *resinaceum*, *applanatum* και *lucidum*, έπειτα από υγρή και στερεή ζύμωσή τους.

Αρχικά έγινε υγρή ζύμωση προκειμένου να ληφθούν μυκήλια. Κατά την συγκριτική τους αξιολόγηση εξετάστηκε η ικανότητά τους να καταναλώνουν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη, η παραγωγή μυκηλιακής μάζας, εξω/ ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων. Ο χρόνος που ολοκληρώθηκε η καλλιέργεια ήταν σημαντικά μικρότερος για τα *G. applanatum*, *G. resinaceum* και *G. adspersum* (~13 ημέρες) από ό,τι για τα *G. lucidum* (27 ημέρες), αν και στο τελευταίο η κατανάλωση γλυκόζης ήταν ολοκληρωτική. Όλοι οι μύκητες παρήγαγαν ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας (μέγιστη τιμή 18,8 g/l στο *G. applanatum* έως 12 g/l σε *G. resinaceum* και *G. adspersum*), ενώ ως ικανοποιητική εκτιμήθηκε και η παραγόμενη ποσότητα των εξωπολυσακχαριτών (~0,5 g/l), ενώ στα αναμενόμενα όρια ήταν η ποσότητα των λιπιδίων (3-7 % κ.β.). Ιδιαίτερα υψηλές ήταν οι τιμές των ενδοπολυσακχαριτών των μυκηλίων των *G. applanatum*, *G. resinaceum* και *G. adspersum* (65-80% κ.β.). Επίσης, έπειτα από μελέτη της σύστασης των ενδοπολυσακχαριτών και των λιπιδίων διαπιστώθηκε ότι η γλυκόζη ήταν το κύριο απλό σάκχαρο των ενδοπολυσακχαριτών, ενώ το  $\Delta^9,12\text{C}18:2$  (λινελαϊκό οξύ) ήταν το λιπαρό οξύ που εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στα μυκήλια των υπό εξέταση μακρομυκήτων.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ζύμωση στερεής κατάστασης και η συγκριτική αξιολόγηση των μακρομυκήτων βασίστηκε στην ικανότητά τους να αξιοποιούν τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα οξιάς και βελανιδιάς. Από τα 4 είδη, μόνο τα *G. adspersum* και *G. resinaceum* έδωσαν ώριμες καρποφορίες και στα δύο υποστρώματα, 128 ημέρες μετά τον εμβολιασμό τους. Σύμφωνα με τις τιμές της % Απόδοσης (A% - g νωπού βάρους μανιταριών/g νωπού βάρους υποστρώματος) και της % Βιολογικής Αποδοτικότητας (BA% - g νωπού βάρους μανιταριών/g ξηρού βάρους υποστρώματος) διαπιστώθηκε ότι η βελανιδιά ήταν το καλύτερο υπόστρωμα καλλιέργειας, καθώς ευνόησε τα ποσοτικά (αριθμός καρποφοριών, A%, BA%) και ποιοτικά (υγρασία, μέσο βάρος καρποφοριών) χαρακτηριστικά της καλλιέργειας, με μέγιστες τιμές 6,32 BA% και 1,23 g μέσο βάρος καρποφορίας στο *G. resinaceum*. Ακόμα υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των ενδοπολυσακχαριτών και των λιπιδίων των καρποσωμάτων από όπου και φάνηκε ότι οι πολυσακχαρίτες σε όλα τα στελέχη και υποστρώματα ήταν ~40% κ.β. και τα λιπίδια 1-1,5 % κ.β.. Έπειτα, έχοντας λάβει βιομάζα μυκηλίων και καρποσωμάτων, έγινε εκχύλισή τους με νερό σε χαμηλή (25 °C - ΨΕ) και υψηλή (100 °C - ΘΕ) θερμοκρασία.

Στην τελευταία φάση, διερευνήθηκε η βιοδραστηκότητα όλων των εκχυλισμάτων προσδιορίζοντας το περιεχόμενό τους σε απλές φαινόλες και τερπενοειδή, αλλά και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Στα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων που εξετάστηκαν προστέθηκε και αυτό του *G. lucidum* στελέχους 332, το οποίο παρασκευάστηκε όπως και τα προηγούμενα. Ο προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων έγινε με βάση τη μέθοδο Folin- Ciocalteu, ενώ η ποσοτικοποίηση των συνολικών τριτερπενοειδών έγινε φωτομετρικά. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε μέσω της δέσμευσης της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•) και της μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability - TSO).

Από τα πειράματα που έλαβαν χώρα διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα μυκηλίων χαμηλότερης θερμοκρασίας ήταν πιο πλούσια σε φαινόλες (415-515 mg/l) και τερπενοειδή (20,5-32,7 mg/g) σε αντίθεση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα υψηλότερης θερμοκρασίας, όπου το περιεχόμενο σε φαινόλες κυμάνθηκε από 155 έως 187 mg/l και σε τερπενοειδή από 7,9 έως 15,3 mg/g. Από όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα μυκηλίων αυτό που ξεχώρισε ήταν του *G. resinaceum* ΨΕ διότι σε αυτό εντοπίστηκε το μεγαλύτερο φορτίο σε απλές φαινόλες και τερπενοειδή. Όσον αφορά στην σύσταση των εκχυλισμάτων μυκηλίων σε φαινόλες φάνηκε ότι το *p*-OH-βενζοϊκό οξύ, το καφεϊκό οξύ και η ρεσβερατρόλη ήταν οι κοινές πολυφαινόλες. Παρόμοια ήταν η τάση που εμφάνισαν τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων με τη διαφορά ότι το περιεχόμενό τους σε φαινόλες (153-223 mg/l για τα ΨΕ και 110-149 mg/l για τα ΘΕ) και τερπενοειδή (7,2-12,1 mg/g για τα ΨΕ και 5,3-7,3 mg/g για τα ΘΕ) ήταν μικρότερο από εκείνο των μυκηλίων. Ακόμα, συγκρίνοντας το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων σε φαινολικά και τερπενοειδή ανά είδος και ως προς το υπόστρωμα καλλιέργειας φάνηκε ότι τα μανιτάρια που η καλλιέργεια έγινε σε

βελανιδιά είχαν περισσότερες φαινόλες και τερπενοειδή από τα αντίστοιχα σε οξιά. Όσον αφορά στην σύσταση των εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων όπως αυτή προέκυψε από τη μέθοδο SIM, τα περισσότερα φαινολικά οξέα που εντοπίστηκαν ήταν η βανιλίνη, το κινναμωμικό οξύ, η τυροσόλη, το *p*-OH-βενζοϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγικό οξύ και λιγότερο το καφφεικό οξύ και η ρεσβερατρόλη. Από την ίδια μέθοδο επιβεβαιώθηκε ότι στα εκχυλίσματα των μυκηλίων η συνολική συγκέντρωση των απλών πολυφαινολών είναι μεγαλύτερη από εκείνη των καρποσωμάτων και πως τα ΨΕ είναι αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα ΘΕ. Ακόμα, συγκρίνοντας τη συνολική συγκέντρωση απλών πολυφαινολών των καρποσωμάτων σε Ο και Β όπως αυτή προέκυψε από τη μέθοδο SIM, δεν μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για το ποιο υπόστρωμα ευνοεί την παραγωγή μεγαλύτερης συγκέντρωσης απλών φαινολών, ενώ παρατηρείται διαφοροποίηση των ουσιών που ανιχνεύθηκαν στις πολυφαινόλες ανάλογα με το υπόστρωμα και το είδος της εκχύλισης.

Επιπλέον, η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (0,5μl) έδειξε ότι τα ΨΕ είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα ΘΕ, λόγω μεγαλύτερης ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• (0,209 -0,563mM για τα ΨΕ και 0,179-0,302mM για τα ΘΕ) και παράτασης του χρόνου οξείδωσης του ορού (84,9-200,9 λεπτά για τα ΨΕ και 61-95 λεπτά για τα ΘΕ, όταν στα ~57 λεπτά αρχίζει η οξείδωση του ορού χωρίς την προσθήκη των εκχυλισμάτων). Αρκετά διαφορετική ήταν η εικόνα των εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων, με τα περισσότερα να αδυνατούν να δεσμεύσουν την ελεύθερη ρίζα DPPH•, με εξαίρεση τα ΨΕ των *G. adspersum*, *G. resinaseum* και *G. lucidum* 332 που καλλιεργήθηκαν σε βελανιδιά. Τέλος, από τα πειράματα της μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα καρποσωμάτων ΨΕ είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα ΘΕ. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε όταν με την προσθήκη 0,5μl εκχυλίσματος παρατηρήθηκε παράταση του χρόνου οξείδωσης του ορού (55,1-63,9 λεπτά για τα ΨΕ και 46-54,7 λεπτά για τα ΘΕ, όταν στα ~39 λεπτά αρχίζει η οξείδωση του ορού χωρίς την προσθήκη των εκχυλισμάτων). Ίδια ήταν και η τάση που προέκυψε μετά την προσθήκη 1μl εκχυλίσματος, με μικρή παράταση του χρόνου οξείδωσης του ορού (60-84,8 λεπτά για τα ΨΕ και 54,7-67,8 λεπτά για τα ΘΕ, όταν στα ~39 λεπτά αρχίζει η οξείδωση του ορού χωρίς την προσθήκη των εκχυλισμάτων). Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τα εκχυλίσματα του μυκηλίου χαμηλότερης θερμοκρασίας ήταν αυτά με τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα και η βελανιδιά το καλύτερο υπόστρωμα καλλιέργειας των μανιταριών *Ganoderma*.

**Λέξεις κλειδιά:** μύκητες, *Ganoderma*, βελανιδιά, οξιά, βιομάζα, εξω-/ενδο-πολυσακχαρίτες, λιπίδια, εκχυλίσματα, απλές φαινόλες, τερπενοειδή, αντιοξειδωτική δράση, δοκιμασία DPPH, οξείδωση ορού



## ABSTRACT

The aim of the present thesis was the study of bioactive potential of mycelium and basidiocarp water extracts of four *Ganoderma* species, *G. adspersum*, *G. resinaceum*, *G. applanatum* and *G. lucidum*, after liquid and solid fermentation.

At first, the above mushrooms were cultured in submerged fermentation in order to obtain mycelium on glucose growth medium which was used as carbon source. The comparative evaluation between the species was based on their ability to utilize the substrate via the consumption of glucose and the production of mycelial mass, exo/ endopolysaccharide and lipids. The fermentation time completion was significantly smaller for *G. applanatum*, *G. resinaceum* and *G. adspersum* (~13 days) than *G. lucidum* (27 days), although in the last species the glucose consumption was total. All fungi produced sufficient amount of biomass (from 18,8 g/l in *G. applanatum* to 12 g/l in *G. resinaceum* and *G. adspersum*). Also, the quantity of exopolysaccharides was estimated as satisfactory (~0.5 g/l) and the amount of lipids was within the expected ranges (3-7% w/w). Particularly high were the values of endopolysaccharides in *G. applanatum*, *G. resinaceum* and *G. adspersum* mycelium (65-80% w/w in dry weight). In addition, after analysing the composition of endopolysaccharides and lipids, glucose was found the main simple sugar of endopolysaccharides, while <sup>D9,12</sup>C18:2 (linoleic acid) was found the fatty acid in the greatest amount.

Next, solid state fermentation took place. The comparative evaluation between the species was based on their ability to utilize the lignocellulosic substrates beech and oak. Of the four species, only *G. adspersum* and *G. resinaceum* gave mature carpocarpes, 128 days after inoculation, in both substrates. Considering the % Efficiency (% E) (g fresh mushroom weight/ g fresh substrate weight) and the % Biological Efficiency (% B.E.) (g fresh mushroom weight/g dry substrate weight), the oak was the best culture medium, which positively affected the quantitative (number of fruiting, E%, BE%) and quality (humidity, average yielder weight) characteristics of the culture, with maximum values 6.32% BE and 1.23 g average mushroom weight in *G. resinaceum*. In addition, in all strains and substrates the polysaccharide content was ~40% w/w and that of lipids was 1-1.5% w/w. After having received the mycelial mass and the basidiocarps, their extraction at low (25 °C - CE) and high (100 °C - HE) temperature followed.

In the last phase, the bioactivity of all extracts was investigated by determining their content in simple phenols, terpenoids, and their antioxidant activity. In tested basidiocarps was added *G. lucidum* strain 332, whose extract was prepared as in previous experiments. The determination of total phenolic content of the extracts was performed using the Folin-Ciocalteu method and the quantification of total terpenoids was done photometrically. The evaluation of antioxidant activity of the extracts was carried out by scavenging of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH •) free radical and measuring total serum oxidizability (TSO).

Results showed that mycelium CE were richer in phenols (415-515 mg/l) and terpenoids (20.5-32.7 mg/g) than those of HE, whereas the content of phenols ranged from 155 to 187 mg/l and terpenoids from 7.9 to 15.3 mg/g. From all tested mycelium extracts, in *G. resinaceum* CE was found the largest content in simple phenols and terpenoids. Regarding the composition of phenols in mycelium extracts, *p*-OH-benzoic acid, caffeic acid and resveratrol were the common polyphenols. Similar was the trend in basidiocarp extracts although their phenol (153-223 mg/l in CE and 110-149 mg/l in HE) and terpenoid content (7.2-12.1 mg/g in CE and 5.3-7.3 mg/g in HE) was lower than these of mycelium. Still, comparing the content of the extracts in phenolic and terpenoids per species and culture medium, mushrooms cultivated on oak contained more phenols and terpenoids than those on beech substrate. Regarding the composition of phenols in basidiocarp extracts, based on SIM method, vanillin, cinnamic acid, tyrosol, the *p*-OH-benzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, syringic acid were the common polyphenols and less the caffeic acid and resveratrol. Considering the previous method, it was confirmed that in mycelium extracts, the total concentration of simple polyphenols were higher than this of basidiocarp extracts. Additionally, CE had the highest concentration of simple phenols compared to HE. However, comparing the total concentration of simple phenols in basidiocarp extracts in B and O, as it was shown by SIM method, it is difficult to draw reliable conclusions on which substrate favours the production of simple polyphenols, as depending on the substrate and the type of extraction, it was observed differentiations on the detected substances.

Furthermore, the antioxidant activity of 0,5ml extracts showed that CE had more antioxidant activity than HE, due to their greater capacity for scavenging of free radical DPPH• (0.209 -0.563mM for the CE and 0.179-0.302mM for the HE) and increased lag-time (84.9-200.9 min for the CE and 61-95 min for the HE when lag-time in control required ~57 min). Quite different was the profile of the basidiocarp extracts. Most of them found to be unable to scavenge free radical DPPH•, except for *G. adspersum*, *G. resinaseum* and *G. lucidum* 332 grown on oak. Finally, from the experiments of total serum oxidizability was found that basidiocarp CE had higher antioxidant activity than those of HE. This conclusion resulted when 0.5ml extract added and an increase in lag time was observed (from 55.1 to 63.9 min for the CE and 46-54.7 min for the HE when lag-time in control required ~39 min). Same was the trend when 1ml of extract was added and slightly higher increase in lag time was observed (60-84.8 min for the CE and 54.7-67.8 min for the HE when lag-time in control required ~39 min). From these results it can be concluded that the mycelium cold extracts were those with the highest bioactivity and that oak was the best substrate for the cultivation of *Ganoderma* species.

**Keywords:** fungus, *Ganoderma*, oak, beech, biomass, exo-/endo-polysaccharides, lipids, extracts simple phenols, terpenes, antioxidant activity, DPPH test, total serum oxidizability

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	5
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	11
I.1 Βιοτεχνολογία και Μικροβιακές Ζυμώσεις .....	12
I.2. Τα μανιτάρια .....	13
I.2.1 Φυσιολογία και Μεταβολισμός Βασιδιομυκήτων .....	17
Πρόσληψη άνθρακα και αζώτου .....	17
Σύνθεση πολυσακχαριτών .....	19
Μεταβολισμός λιπιδίων .....	21
Βιοσύνθεση τερπενοειδών .....	23
Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων .....	25
I.3. Μανιτάρια γένους <i>Ganoderma</i> spp. ....	26
I.3.1. Συστηματική κατάταξη και μορφολογικά χαρακτηριστικά .....	27
I.3.2. Τύποι Μανιταριού <i>Ganoderma</i> .....	27
I.3.2.1. <i>Ganoderma lucidum</i> .....	28
I.3.2.2. <i>Ganoderma resinaceum</i> .....	29
I.3.2.3. <i>Ganoderma applanatum</i> .....	30
I.3.2.4. <i>Ganoderma adspersum</i> .....	30
I.4. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών <i>Ganoderma</i> και η εφαρμογή τους στην ιατρική .....	31
I.4.1. Ιστορική Αναδρομή .....	31
I.4.2. Θεραπευτικές ιδιότητες .....	32
I.4.1.3. Εμπορική αξιοποίηση του <i>G. lucidum</i> .....	33
I.4.1.4. Διασφάλιση ποιότητας προϊόντων <i>G. lucidum</i> .....	34
I.5. Μηχανισμοί δράσης των βιοδραστικών ενώσεων των μανιταριών <i>Ganoderma</i> spp .....	34
I.6. Καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή μανιταριών <i>G. lucidum</i> .....	36
I.6.1. Ζυμώσεις Στερεάς Κατάστασης (Solid State Fermentation - SSF) .....	37
I.6.1.1. Καλλιέργεια καρποσωμάτων σε φυσικούς κορμούς ξύλου .....	38
I.6.1.2. Καλλιέργεια καρποσωμάτων με πριονίδι ως υπόστρωμα .....	39
I.6.1.3. Καλλιέργεια μυκηλίου με βιοαντιδραστήρα σε ζύμωση στερεάς κατάστασης .....	41
I.6.2. Υγρές καλλιέργειες - Ζυμωτήρες .....	41
II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	47
II.1. Γενική παρουσίαση .....	48
II.2. Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων .....	48
II.3. Θρεπτικό μέσο υγρής ζύμωσης .....	49

II.4. Πειράματα υγρής ζύμωσης σε φιάλες.....	50
II.5. Πειράματα ζυμώσεων στερεής κατάστασης σε σάκους.....	50
II.5.1. Παρασκευή υποστρωμάτων – εμβολιασμός - συνθήκες καλλιέργειας.....	50
II.6. Αναλύσεις μυκηλίου και καρποσώματος .....	51
II.6.1. Προσδιορισμός pH.....	51
II.6.2. Συλλογή, λυοφυλίωση και λειοτρίβηση βιομάζας.....	51
II.6.3. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης.....	51
II.6.4. Υδατική εκχύλιση .....	52
II.6.5. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	52
II.6.5.1. Προσδιορισμός σύστασης σακχάρων - Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (HPLC- High Performance Liquid Chromatography) .....	52
II.6.6. Προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών (EPS).....	52
II.6.7. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους .....	53
II.6.7.1. Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων .....	53
II.6.7.2. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας (GC- Gas Chromatography) .....	54
II.6.8. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu.....	54
II.6.9. Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) .....	55
II.6.10. Προσδιορισμός των ολικών τριτερπενοειδών.....	56
II.6.11. Αντιοξειδωτικές δοκιμές.....	56
II.6.11.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH').....	56
II.6.11.2. Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability) .....	57
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
III. 1. Συγκριτική μελέτη φυσιολογικών-βιοχημικών χαρακτηριστικών αύξησης πέντε στελεχών <i>Ganoderma</i> σε υγρό θρεπτικό μέσο.....	60
III.1.1.Προσδιορισμός παραμέτρων αύξησης και παραγωγικότητας σε υγρή καλλιέργεια μακρομυκήτων.....	60
III. 2.Στερεή καλλιέργεια μανιταριών <i>Ganoderma spp</i> .....	62
III.2.1. Παραγωγή καρποσωμάτων των ειδών <i>Ganoderma spp</i> σε σάκους με λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα .....	62
III. 3. Προσδιορισμός ολικών φαινολών και τερπενοειδών στα υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων και καρποσωμάτων .....	64
III.3.1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu .....	65
III.3.2. Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) .....	66
III.3.3. Ποσοτικοποίηση των συνολικών τριτερπενοειδών .....	71

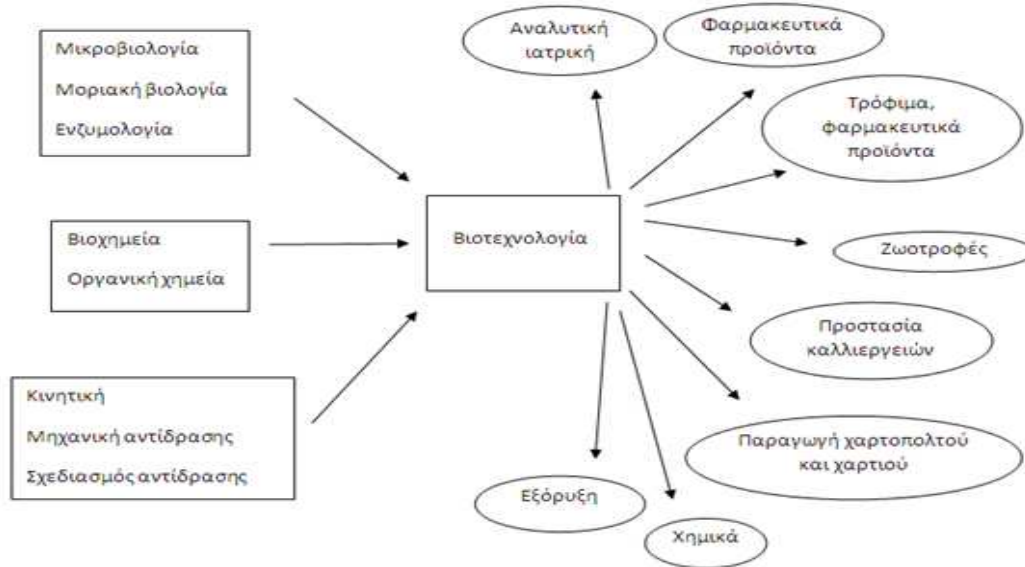
III. 4. Αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων μυκηλίων και καρποσωμάτων .....	72
III.4.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•) .....	73
III.4.2 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability) .....	74
IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ .....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	97



# Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## I.1 Βιοτεχνολογία και Μικροβιακές Ζυμώσεις

Ως Βιοτεχνολογία ορίζεται η ελεγχόμενη χρήση κυττάρων ή κυτταρικών ή/και υποκυτταρικών οργανιδίων (π.χ. ένζυμα, αντισώματα) για την παραγωγή προϊόντων και την παροχή υπηρεσιών. Ο όρος υποδηλώνει ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών σε τομείς που αφορούν: τις επιστήμες υγείας, την προστασία του περιβάλλοντος (π.χ. χρήση της στη διαχείριση αποβλήτων), τη γεωργία, την κτηνοτροφία και τη βιομηχανία (Ratledge και Kristiansen, 2001).



Εικόνα I.1.: Τα πεδία εφαρμογής της βιοτεχνολογίας (Bommarius και Riebel, 2004)

Στις μέρες μας ο όρος Βιοτεχνολογία <<παντρεύει>> τη παλιά γνώση με τις νέες βιολογικές τεχνικές και εφαρμογές, ενώ βασιζόμενοι στο ευρύ φάσμα εφαρμογής, τα πεδία της Βιοτεχνολογία έχουν οργανωθεί και ταξινομηθεί με κωδικές ονομασίες που χαρακτηρίζονται από κάποιο χρώμα. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το λευκό, το πράσινο και το κόκκινο, ως χρώμα για να χαρακτηρίσουν: την λευκή, την πράσινη και την κόκκινη Βιοτεχνολογία, αντίστοιχα. Όμως, η συνεχής εξέλιξη των τεχνολογιών οδήγησε στην προσθήκη νέων χρωμάτων προκειμένου αυτά να χαρακτηρίσουν νέους τομείς της Βιοτεχνολογίας. Έτσι, προστέθηκε το μπλε, το κίτρινο, το γκρι, το μαύρο και το χρυσό για να χαρακτηρίσουν: την μπλε, την κίτρινη, τη γκρι, την μαύρη και τη χρυσή Βιοτεχνολογία, αντίστοιχα (Kück κ.α., 2015).

Πίνακας I.1.: Τα χρώματα της Βιοτεχνολογίας (Kück κ.α., 2015)

Χρωματική ταξινόμηση	Περιγραφή
Λευκή	Χρήση μικροοργανισμών σε βιομηχανικές διεργασίες
Πράσινη	Γεωργικές διεργασίες
Κόκκινη	Ιατρική, υγεία και διάγνωση
Μπλε	Θαλάσσια και υδρόβια συστήματα
Κίτρινη	Βιοτεχνολογία τροφίμων και διατροφή
Γκρι	Περιβαλλοντική βιοτεχνολογία (βιοεξυγίανση)
Μαύρη	Βιοτρομοκρατία
Χρυσή	Βιοπληροφορική



Ως ζύμωση (fermentation) με τη στενή έννοια της λέξης (sensu stricto), ορίζεται η διεργασία μετατροπής ορισμένων πρώτων υλών, με την παρέμβαση πάντοτε μικροοργανισμών, υπό συνθήκες πρακτικώς αναερόβιες, προς προϊόντα περισσότερο χρήσιμα για τον άνθρωπο σε σχέση με το υλικό εκκίνησης (Papanikolaou, 2011).

Οι πρώτες ύλες (ονομαζόμενες και υποστρώματα) είναι αγροτο-χημικά προϊόντα τα οποία κατά κανόνα (με εξαιρέσεις) είναι πλούσια σε απλά ή πιο σύνθετα σάκχαρα. Με τη στενή έννοια του όρου, οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί είναι κατά κανόνα βακτήρια και ζύμες, οι οποίοι δύνανται να αποικοδομήσουν κατά τρόπο αυστηρώς αναερόβιο τα σάκχαρα του υποστρώματος (Papanikolaou, 2011).

Κατά κύριο λόγο, η παραδοσιακή έννοια του όρου ζύμωση στην επιστήμη και την τεχνολογία των τροφίμων αναφέρεται στην αλκοολική και στη γαλακτική (ομο- και ετερο-ζυμωτική) ζύμωση. Προϊόντα ζυμώσεως με την παραδοσιακή έννοια του όρου είναι όλα τα προϊόντα τύπου τροφίμων στα οποία εμπλέκονται αυτές οι δυο ζυμώσεις (άρτος και λοιπά αρτοσκευάσματα ζυμώσεως, αλκοολούχα ποτά, φυτικής προελεύσεως προϊόντα ζυμώσεως, ζωικής προελεύσεως προϊόντα ζυμώσεως) (Papanikolaou, 2011).

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία ο όρος «Ζύμωση» δεν χρησιμοποιείται με τη στενή αρχική έννοια της μικροβιακής διάσπασης σακχάρων (και ενδεχομένως πολυσακχαριδίων) υπό συνθήκες αναεροβίωσης. Στη σύγχρονη πρακτική, οι διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα είναι κατά κύριο λόγο αερόβιες (υπάρχουν βεβαίως και διεργασίες οι οποίες χωρούν υπό αναεροβίωση), ο όρος «Ζύμωση» όμως είναι δόκιμος (Papanikolaou, 2011). Ακόμη και σε παραδοσιακά προϊόντα ζυμώσεως, διεργασίες δύνανται να πραγματοποιηθούν όχι υπό αυστηρή αναεροβίωση (ενίοτε η αεροβίωση είναι απαραίτητη για την επιτυχία της διεργασίας) προκειμένου να παραχθούν τα προϊόντα – τρόφιμα τα οποία μας ενδιαφέρουν (Papanikolaou, 2011):

- ▶ Πρώτα στάδια αλκοολικής ζυμώσεως
- ▶ Δευτερογενής ζύμωση – ωρίμανση σε τυριά, αλλαντικά και λοιπά προϊόντα ζυμώσεως
- ▶ Παραγωγή βιομάζας τύπου «kefir»
- ▶ Παραγωγή εδωδίων μανιταριών

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, επικεντρώνεται στην καλλιέργεια και παραγωγή μανιταριών για φαρμακευτική αξιοποίηση, συνδυάζοντας έτσι την πράσινη, την κόκκινη και την κίτρινη Βιοτεχνολογίας.

## I.2. Τα μανιτάρια

Τα μανιτάρια (μακρομύκητες) είναι τα αναπαραγωγικά όργανα που παράγουν ορισμένοι μύκητες σε συγκεκριμένο στάδιο της ζωής (Kues και Liu., 2000; Zervakis και Polemis, 2013) τους και εμφανίζουν χαρακτηριστικά καρποφόρα σώματα, που είναι αρκετά μεγάλα ώστε να είναι ορατά με γυμνό μάτι και μπορούν να συλλεχθούν με το χέρι (Cheung, 2010).

Αρχικά, οι μύκητες θεωρήθηκαν πρωτόγονα φυτά, αργότερα όμως κατατάχθηκαν σε ξεχωριστό Βασίλειο εξαιτίας της κυτταρικής τους οργάνωσης. Οι μύκητες διαφέρουν τόσο από τα φυτά όσο και από τα ζώα, διότι (Feeney, 2014):

Τα φυτά συνθέτουν χλωροφύλλη και παράγουν τη δική τους τροφή μέσω φωτοσύνθεσης, είναι δηλαδή φωτοαυτότροφα .

Τα Ζώα είναι χημειοετερότροφα και προσλαμβάνουν την τροφή τους μέσω κατάποσης.

Οι Μύκητες, στερούνται χλωροφύλλης, εντοπίζονται στη φύση σε υπό αποσύνθεση υλικά και σε διάφορα άλλα υποστρώματα, κατά την εμπορική αξιοποίηση. Ακόμα, περιέχουν χιτίνη και εργοστερόλη, ενώ απουσιάζει η κυτταρίνη και η χοληστερόλη, ουσίες που υπάρχουν σε φυτά και θηλαστικά ζώα, αντίστοιχα.

Τα μανιτάρια αντιμετωπίζονται άλλοτε ως φίλος και άλλοτε ως εχθρός. Η διαφορετική αυτή αντιμετώπιση απέναντι στα μανιτάρια, δικαιολογείται με βάση την ακόλουθη κατηγοριοποίηση (Cheung, 2010):

**Κατηγορία 1:** εδώδιμα μανιτάρια

Μπορούν να καταναλωθούν είτε ως σάρκα ή ξερά ή διατηρημένα με άλλους τρόπους.

**Κατηγορία 2:** φαρμακευτικά μανιτάρια

Δε προορίζονται για μαγείρεμα, επομένως δεν είναι εδώδιμα μανιτάρια, αλλά περιέχουν βιοενεργά συστατικά που έχουν ιατρική εφαρμογή

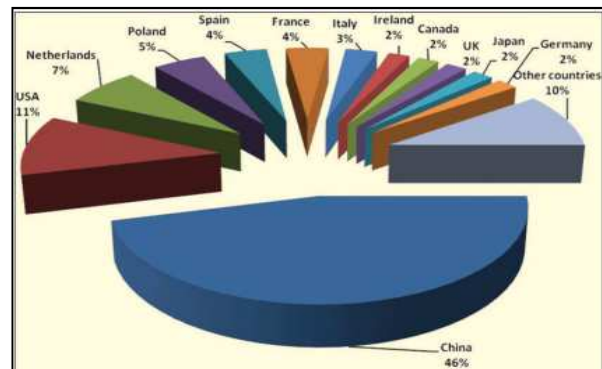
**Κατηγορία 3:** δηλητηριώδη μανιτάρια

Μανιτάρια που έχει αποδειχθεί ότι είναι ή υπάρχει υποψία ότι είναι δηλητηριώδη

Επιπλέον, πολλά από τα φαρμακευτικά μανιτάρια είναι και εδώδιμα, συνδυάζοντας με τον καλύτερο τρόπο τα ευεργετικά τους αποτελέσματα με την γευστική απόλαυση. Τόσο τα άγρια όσο και τα καλλιεργήσιμα μανιτάρια (εδώδιμα ή/και φαρμακευτικά) λόγω των θρεπτικών συστατικών και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών οι οποίοι και έχουν κατατάξει τα μανιτάρια στα λειτουργικά τρόφιμα (Aida κ.α., 2009; Feeney, 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι από το 1997 έως το 2007 η παγκόσμια παραγωγή καλλιεργήσιμων μανιταριών εκτιμήθηκε περίπου σε 2,18 - 3.410.000 τόνους, σημειώνοντας μια αύξηση της τάξεως του 56% (Kues και Liu, 2000; Cheung, 2010; Wakchaure, 2011) γεγονός που αντανακλά το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα μανιτάρια.

**Πίνακας 1.2.:** Παγκόσμια παραγωγή μανιταριών (Aida κ.α., 2009; Wakchaure, 2011)

Χώρα	Παραγωγή (σε τόνους)		Ποσοστό (%)
	1997	2007	
Κίνα	562,194	1,605,000	65.0
Ηνωμένες Πολιτείες	366,810	390,000	5.9
Καναδάς	68,020	81,500	16.5
Ινδία	9000	48,000	81.3
Ινδονησία	19,000	30,000	36.7
Δημοκρατία της Κορέας	13,181	28,500	53.8
Ισλαμική Δημοκρατία του Ιράν	10,000	28,000	64.3
Βιετνάμ	10,000	18,000	44.4
Ταϊλάνδη	9000	10,000	10
Ισραήλ	1260	9500	86.7
Ιορδανία	500	700	28.6
Καζακστάν	500	500	100
Σιγκαπούρη		10	100



Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, επικεντρώνεται στην μελέτη πέντε φαρμακευτικών μανιταριών του γένους *Ganoderma* που κατατάσσονται στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων.

### 1.2.1. Δομικά χαρακτηριστικά και βιολογικός κύκλος βασιδιομυκήτων

Οι μύκητες που σε κάποιο στάδιο της ζωής τους παράγουν μανιτάρια ανήκουν σε δυο μεγάλες ταξινομικές κατηγορίες (φύλα): τους Ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες, με τους τελευταίους να είναι αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Τα χαρακτηριστικά που κάνουν τους βασιδιομύκητες να ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους μύκητες, είναι τα εξής παρακάτω:

Βασιδιοσπόρια

Βασίδια

Πρωτογενές, δευτερογενές και τριτογενές μυκήλιο

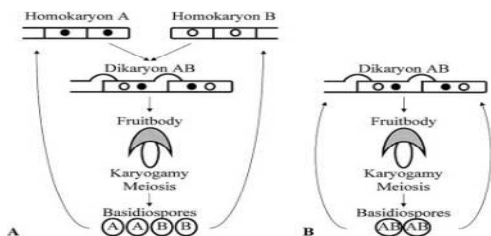
Βασιδιοκάρπια  
Κρίκοι  
Δολιπόρο

Τα **βασιδιοσπόρια** είναι τα χαρακτηριστικά σπόρια των βασιδιομυκήτων και είναι προϊόντα εγγενούς αναπαραγωγής. Είναι μονοκύτταρα, απλοειδή, μονοπύρρηνα ή και διπύρρηνα, συνήθως ωοειδή, άχρα ή ελαφρώς χρωματισμένα. Τα βασιδιοσπόρια παράγονται πάνω σε ειδικές αναπαραγωγικές δομές, που ονομάζονται **βασίδια** (Christias, 1999).



**Εικόνα I.2.:** Βασίδια και βασιδιοσπόρια στην κορυφή των στηριγμάτων (Zervakis και Polemis, 2013)

Τα βασίδια είναι 2 ειδών (μονοκύτταρα και πολυκύτταρα). Τα μονοκύτταρα έχουν ροπαλοειδές σχήμα και στο πάνω μέρος τους παράγουν 4 βασιδιοσπόρια, σε ειδικές προεξοχές, τα **στηρίγματα**. Τα πολυκύτταρα είναι επιμήκη και αποτελούνται από 2, 4, ή περισσότερα κύτταρα. Τα βασίδια διακρίνονται σε προβασίδια και μεταβασίδια, όσο αφορά την ανάπτυξη. Στο αναπτυξιακό στάδιο των βασιδίων κατά το οποίο συναντάμε τα προβασίδια, οι δυο πυρήνες ενώνονται σε ένα διπλοειδή πυρήνα (καρυογαμία). Στο αναπτυξιακό στάδιο των βασιδίων κατά το οποίο συναντάμε τα μεταβασίδια, ο διπλοειδής πυρήνας υφίσταται μείωση και διαιρείται. Στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης των βασιδίων, σχηματίζονται τα στηρίγματα. Ως προς την δομή, τα βασίδια διακρίνονται σε ολοβασίδια (μονοκύτταρα βασίδια) και φραγμοβασίδια (τετρακύτταρα). Επειδή τα τελευταία είναι πολυκύτταρα βασίδια, μπορούν να ονομαστούν και ετεροβασίδια (Christias, 1999).



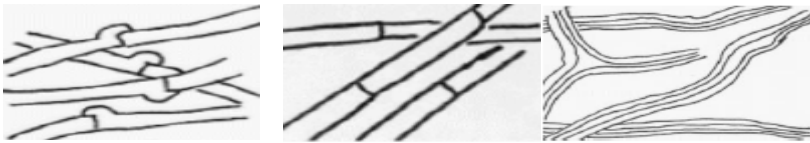
**Εικόνα I.3. A,B:** Τυπικός κύκλος ζωής βασιδιομυκήτων (Kues και Liu, 2000)

Τα βασιδιοσπόρια παράγονται σε ειδικά καρποφόρα στρώματα, τα **υμένια**. Εκτός από τα βασίδια, τα υμένια παράγουν και άλλες δομές, όπως τα κυστίδια και τα βασιδιόλια. Τα πρώτα είναι στείρα κύτταρα, μεγαλύτερου μεγέθους από τα βασίδια. Πιστεύεται ότι είναι αεροπαγίδες, βοηθούν στην εξάτμιση της υγρασίας και την απομάκρυνση πτητικών ουσιών. Τα βασιδιόλια είναι είτε βασίδια χωρίς βασιδιοσπόρια είτε μοιάζουν με βασίδια (Christias, 1999).

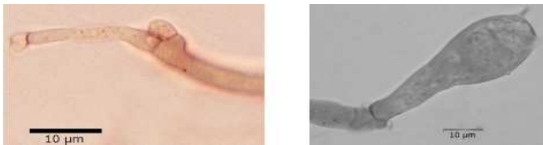
Οι βασιδιομυκήτες εμφανίζουν τρία είδη **μυκήλιου**, το πρωτογενές, το δευτερογενές και το τριτογενές. Το πρωτογενές παράγεται από τη βλάστηση των βασιδιοσπορίων και αρχικά είναι πολυπύρρηνο, αν και σύντομα γίνεται μονοπύρρηνο με τη δημιουργία διαφραγμάτων. Το δευτερογενές προέρχεται από το πρωτογενές με 2 τρόπους (με σπερματίωση και με αναστόμωση). Κατά τη σπερματίωση, μονοπύρρηνο απλοειδές κύτταρο αντίθετου συζευκτικού τύπου έρχεται σε επαφή με συμβατό πρωτογενές μυκήλιο. Κατά την αναστόμωση, υφές από 2 γενετικά συμβατά πρωτογενή μυκήλια έρχονται σε επαφή. Και με τους 2 τρόπους, το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός δικαρυωτικού κυττάρου, αφού στο σημείο επαφής σχηματίζεται οπή και μέσω της οποίας ο πυρήνας περνά στο μυκήλιο. Όσον αφορά στο τριτογενές μυκήλιο είναι διαφοροποιημένο μυκήλιο που σχηματίζει τα βασιδιοκάρπια (Christias, 1999).

Τα **βασιδιοκάρπια** αποτελούνται από τα παρακάτω 3 είδη διαφοροποιημένων υφών: τις καρποφόρες, τις σκελετικές και τις συνεκτικές. Οι πρώτες είναι οι μόνες που παράγουν βασίδια και βασιδιοσπόρια. Έχουν λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, διαφράγματα, κρίκους και διακλαδίζονται έντονα. Αν τα βασιδιοκάρπια αποτελούνται μόνο από καρποφόρες υφές λέγονται μονομιτικά. Οι σκελετικές και συνεκτικές υφές είναι στείρες, με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, χωρίς διαφράγματα και κρίκους. Οι σκελετικές δεν έχουν διακλαδώσεις και προσδίδουν στήριξη. Οι συνεκτικές υφές έχουν εκτεταμένες διακλαδώσεις και συγκρατούν τα άλλα 2 είδη υφών, στη δομή του βασιδιοκάρπου. Αν τα βασιδιοκάρπια αποτελούνται από καρποφόρες και σκελετικές ή συνεκτικές υφές ονομάζονται διμιτικά, ενώ αν παρουσιάζονται και τα 3 είδη υφών, ονομάζονται τριμιτικά (Christias, 1999).

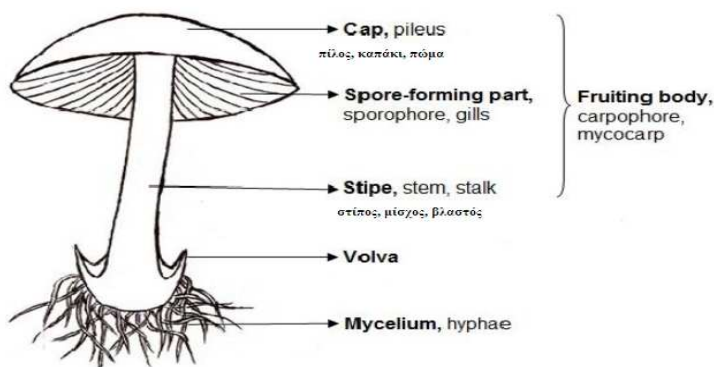
**Εικόνα I.4.:** Καρποφόρες(αριστερά), σκελετικές (μέση) και συνεκτικές (δεξιά) υφές (Zervakis και Polemis, 2013)



Όσο αφορά στους **κρίκους**, αυτοί γεφυρώνουν 2 όμορα κύτταρα. Σκοπός των κρίκων είναι η διατήρηση της δικαρυωτικής κατάστασης του μυκηλίου. Ένας κρίκος αρχίζει ως πλευρική διακλάδωση του ακραίου κυττάρου των υφών. Τέλος, οι **δολιπόροι** είναι τα διαφράγματα. Αυτές οι ειδικές δομές επιτρέπουν την κίνηση των κυτταρικών οργανιδίων από το ένα κύτταρο στο άλλο, με εξαίρεση τους πυρήνες. Έτσι, η κατάσταση που διαμορφώνεται θα μπορούσε να ονομαστεί ως πολυκύτταρη (Christias, 1999).

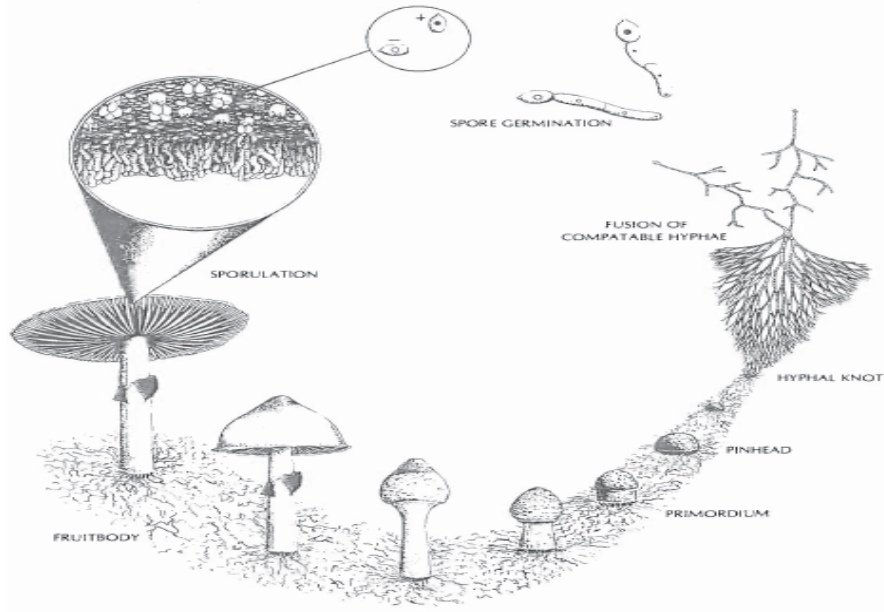


**Εικόνα I.5.:** Μυκηλιακή υφή με κρίκο (αριστερά) και βασίδιο με κρίκο στην βάση και στηρίγματα στην κορυφή (δεξιά) (Zervakis και Polemis, 2013)



**Εικόνα I.6.:** Γενικευμένη απεικόνιση σώματος μανιταριού (Ren, 2014)

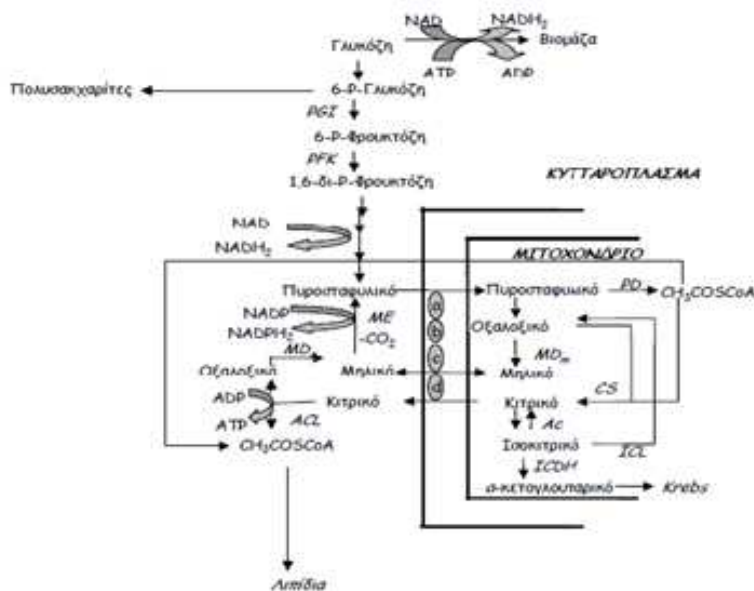
Στην Εικόνα I.7. παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των βασιδιομυκήτων.



Εικόνα 1.7.: Ο βιολογικός κύκλος των βασιδιομυκήτων (Stametes και Chilton, 1983)

### 1.2.1 Φυσιολογία και Μεταβολισμός Βασιδιομυκήτων

Όλοι οι κυτταρικοί οργανισμοί διαθέτουν εξαιρετικά οργανωμένες δομές που εμφανίζουν κάποιας μορφής μεταβολισμό, αποσκοπώντας: την πρόσληψη χημικών ουσιών από το περιβάλλον, το μετασχηματισμό τους εντός του κυττάρου και την απόρριψη άχρηστων υλικών στο περιβάλλον (Madigan κ.α., 2007). Η Εικόνα 1.8. παρουσιάζει ένα γενικευμένο μεταβολικό χάρτη, όπου η γλυκόζη καταβολίζεται προς παραγωγή βιομάζας, πολυσακχαριτών, λιπιδίων και άλλων μεταβολιτών.



Εικόνα 1.8: Υποθετικό σενάριο μεταβολισμού (Zhong και Tang, 2004; Papanikolaou και Aggelis, 2011)

#### Πρόσληψη άνθρακα και αζώτου

Οι βασιδιομυκήτες έχουν χαρακτηριστεί ως μύκητες λευκής σήψης (ξυλοσηπτικοί), που προκαλούν εξαιρετικά επιλεκτική και εκτεταμένη αποξύλωση-απολιγνίνωση (Pointing, 2001). Οι μύκητες αυτής της κατηγορίας έχουν αναπτύξει δύο διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους αποκτούν πρόσβαση στο ξύλο: (i) την ταυτόχρονη αποικοδόμηση της λιγνίνης, της



ημικυτταρίνης, και της κυτταρίνης και (ii) την επιλεκτική αποδόμηση της λιγνίνης και ημικυτταρίνης (Campbell, 1932), με το μανιτάρι *Ganoderma applanatum* να μπορεί να χρησιμοποιεί και τους δυο μηχανισμούς. Οι περιοχές που λαμβάνει χώρα επιλεκτική αποικοδόμηση λιγνίνης βρίσκονται εντός κλειστών θαλάμων (ψευδοσκληρώτια) που παράγονται από τον ίδιο τον μύκητα (Dill και Kraepeling, 1986). Έχει παρατηρηθεί ότι, υπό τη δράση των *Ganoderma* spp., στα πρώτα στάδια της αποσύνθεσης εμφανίζονται λευκασμένες ζώνες στο ξύλο, λόγω επιλεκτικής αποξύλωσης. Το ξύλο γίνεται προοδευτικά πιο μαλακό, η φθορά συνεχίζεται, μέχρι ένα προχωρημένο στάδιο, ενώ παρατηρείται αξιοσημείωτη απώλεια ακαμψίας. Στις εύκρατες ζώνες, η φθορά που προκαλείται από τα *Ganoderma* spp. συχνά περιορίζεται στις ρίζες και στο κατώτερο στέλεχος. Η παρουσία του μύκητα μπορεί συνήθως να ανιχνευθεί πολύ εύκολα λόγω της ανάπτυξης των πολυετών καρποσωμάτων, αν και τα καρποσώματα του *G. resinaceum*, είναι ετήσια (Schwarze και Ferner, 2003).

Το άζωτο στο ξύλο εμφανίζεται υπό μορφή υδροξυπρολίνης (αμινοξύ που εντοπίζεται σε αφθονία στο ξύλο). Έχει προταθεί ότι τα μεσαία ελάσματα, είναι πλούσια σε λιγνίνη και γλυκοπρωτεΐνη και περιέχουν αξιόλογες ποσότητες αζώτου υπό μορφή συμπλοκών λιγνοπρωτεΐνης. Η διέγερση της αποικοδόμησης της λιγνίνης επάγεται υπό συνθήκη έλλειψης αζώτου, καθώς είναι ο μοναδικός τρόπος απόκτησης πρόσβασης σε αυτή τη πηγή αζώτου (Dill και Kraepeling, 1986). Αξίζει να ειπωθεί ότι οι ξυλοσηπτικοί μύκητες αποκτούν πρόσβαση επί του ξύλου στα πρώτα στάδια της <<επίθεσης>>, μέσω οξειδωσης και υδρόλυσης (Dill και Kraepeling, 1986). Τα ένζυμα που κωδικεύονται από τους ξυλοσηπτικούς μύκητες για να καταλύσουν την τροποποίηση της λιγνίνης, ανήκουν σε 3 οικογένειες. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται LMEs (lignin-modifying enzymes) και είναι τα εξής (D'Souza κ.α., 1999; Pointing, 2001):

- Λακκάσες
- Μαγγάνιο-υπεροξειδάσες (MnPs)
- Λιγνίνο-υπεροξειδάσες (LiPs)

Τα LMES οξειδώνουν φαινολικές ενώσεις, δημιουργώντας έτσι φαινοξυ-ρίζες, ενώ οι μη φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται μέσω ρίζες κατιόντων. Οι MnPs και LiPs οξειδώνουν μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με υψηλό δυναμικό οξειδο-αναγωγής, όπως τα κύρια συστατικά του πολυμερούς (Pointing, 2001), λιγνίνη. Όσο αφορά στην λακκάση, αυτή οξειδώνει μη φαινολικές αρωματικές ενώσεις με σχετικά χαμηλό δυναμικό οξειδο-αναγωγής, όμως παρουσία χαμηλού-μοριακού βάρους μεσολαβητών, οξειδώνουν με υψηλό δυναμικό (D'Souza κ.α., 1999). Ο καταλυτικός μηχανισμός της λακάσης και των υπεροξειδασών είναι καλά μελετημένος και παρατίθεται και από τους Wesenberg κ.α., 2003 (οι οποίοι ασχολήθηκαν με τη διαχείριση βιομηχανικών λυμάτων βαφής μέσω των ξυλοσηπτικών μυκήτων). Με αυτόν τον τρόπο προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά οι ξυλοσηπτικοί μύκητες όταν αναπτύσσονται σε ξυλώδη υποστρώματα.

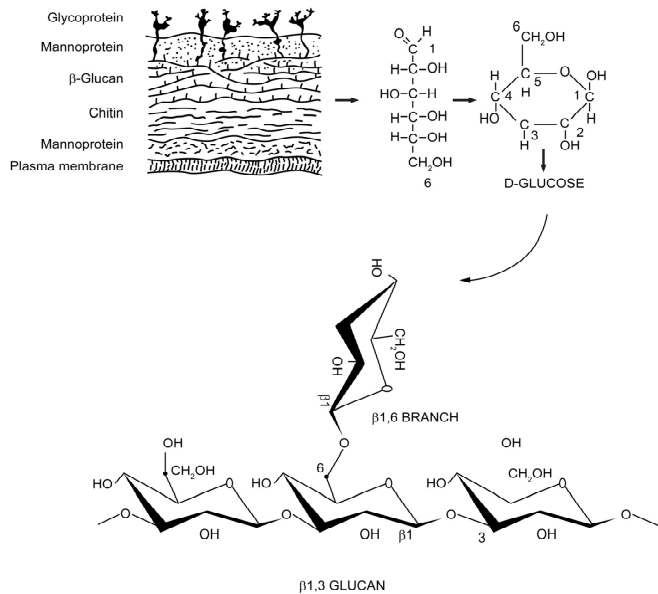
Στην περίπτωση του *G. lucidum* φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης είναι φυλλοβόλα δέντρα όπως: δρυς, σφενδάμι, φτελιά, ιτιά, μανόλια και χαρουπιά (*Quercus*, *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Castanea*, *Corylus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Populus*, *Pyrus*, *Magnolia*, *Tilia*). Το *G. lucidum* εντοπίζονται λιγότερο συχνά σε κωνοφόρα δέντρα (όπως: *Larix*, *Picea*, *Pinus*) στην Ευρώπη, την Ασία, τη Βόρεια και τη Νότια Αμερική (στις εύκρατες και όχι υποτροπικές περιοχές). Στην Ανατολή, αναπτύσσεται κατά κύριο λόγο σε δαμασκηνιές. Έχει βρεθεί επίσης και σε πρέμνα, και γενικά μπορεί να εντοπιστεί κοντά στην επιφάνεια του εδάφους, και περιστασιακά σε εδάφη στα οποία αναδύονται θαμμένες ρίζες (Wasser, 2005).

Ο τρόπος πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, είναι λιγότερο περίπλοκος όταν οι μύκητες αναπτύσσονται υπό μορφή μυκηλίου, σε υγρό περιβάλλον ανάπτυξης, παρουσία απλών σακχάρων. Το σάκχαρο που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η γλυκόζη, αν και ως πηγή άνθρακα έχει χρησιμοποιηθεί: λακτόζη (Tang και Zhong, 2002), σακχαρόζη, μαννόζη, συνδυασμοί αυτών ακόμα και γλυκερόλη και υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Tsiouplas κ.α., 2002; Fountoulakis κ.α. 2002; Aggelis κ.α., 2003; Andre κ.α., 2010; Lakhtar κ.α., 2010; Ntougias κ.α. 2010). Υπό συγκεκριμένες συνθήκες όπου η πηγή άνθρακα είναι βιοπολυμερές τύπου πολυσακχαριτών, διάφοροι μικροοργανισμοί παράγουν εξειδικευμένα ένζυμα, όπως οι λυάσες πολυσακχαριτών, ώστε να υδρολύσουν τα πολυμερή αυτά στα μονομερή σάκχαρα (Giavasis, 2013). Όσο αφορά στην πηγή αζώτου συνήθως χρησιμοποιείται πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης που είναι οργανική μορφή αζώτου ή ανόργανη πηγή αζώτου (Jayasinghe κ.α., 2008; Petre κ.α., 2010).

Ανάλογα με το είδος, την ποικιλία και το στάδιο της ανάπτυξης του μύκητα διαφέρει το % ποσοστό των συστατικών εκφρασμένο σε ξηρό βάρος. Για τις πρωτεΐνες συνήθως κυμαίνεται από 15%-35%, για τους υδατάνθρακες από 35%-70% και για τα λιπίδια είναι <5%. Η % περιεκτικότητα σε τέφρα κυμαίνεται από 6%-11% ξηρού βάρους και περιέχει μια ευρεία ποικιλία στοιχείων. Τέλος, ανάλογα με το μεταβολικό δυναμικό του κάθε μύκητα παράγονται συγκεκριμένες βιταμίνες και βιοενεργά συστατικά (Cheung, 2010). Η χειραγώγηση και ο έλεγχος του περιβάλλοντος ανάπτυξης μπορεί να κατευθύνει την ανάπτυξη του μύκητα προς συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι, πχ παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας βιομάζας, ένδο/εξω-πολυσακχαριτών (IPS/EPS), λιπιδίων και λοιπών βιοενεργών συστατικών. Σε αυτό συμβάλει η σωστή επιλογή πηγής άνθρακα, αζώτου και ιχνοστοιχείων, ο ίδιος ο οργανισμός αλλά και άλλοι παράγοντες όπως ο αερισμός, η ανάδευση (Diamantopoulou κ.α., 2012), η θερμοκρασία και το pH (Jayasinghe κ.α., 2008). Όσο αφορά στους τελευταίους δυο παράγοντες, έρευνες που έλαβαν χώρα με αντικείμενο μελέτης το *G. lucidum*, δείχνουν ότι το βέλτιστο pH για ανάπτυξη μυκηλίου είναι το 5, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία οι 30 °C, αντίστοιχα (Jayasinghe κ.α., 2008).

### Σύνθεση πολυσακχαριτών

Παρατηρώντας την σύσταση των μυκήτων και κυρίως των μανιταριών, προκύπτει ότι το συστατικό που υπάρχει σε αφθονία στο σώμα των μανιταριών είναι οι πολυσακχαρίτες. Η ύπαρξη των πολυσακχαριτών είναι σημαντική, διότι αποτελούν τη βάση για το σχηματισμό του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος, υπό μορφή ενός τρισδιάστατου πλέγματος (Latgé, 2007). Ακόμα, σημειώνεται ότι οι πολυσακχαρίτες μπορούν να εκκρίνονται εκτός κυττάρου (εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες) (Giavasis, 2013). Το κυτταρικό τοίχωμα δεν είναι απλά ένας εξωσκελετός, αλλά μια δυναμική δομή που αλλάζει συνεχώς αναλόγως των συνθηκών καλλιέργειας και των περιβαλλοντικών πιέσεων που δέχεται ο μύκητας (Latgé, 2007). Ένα από τα βασικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, είναι οι β-γλυκάνες. Η βασική υπομονάδα της μυκητιακής β-γλυκάνης είναι η β-D-γλυκόζη, συνδεδεμένη η μια με την άλλη μέσω 1→3 γλυκοσιδικού δεσμού στην κύρια αλυσίδα και με 1→6 γλυκοζιτικό δεσμό στο σημείο διακλάδωσης. Το μήκος και τα συστατικά σύνθεσης της β-γλυκάνης από διάφορους μυκήτων είναι πολύ διαφορετικά (Chan κ.α., 2009). Ωστόσο, εκτός από πολυσακχαρίτες, το κυτταρικό τοίχωμα, αποτελείται και από χιτίνη, που συντίθεται από UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μέσω της μεσολάβησης του ενζύμου, συνθάση της χιτίνης (Latgé, 2007).



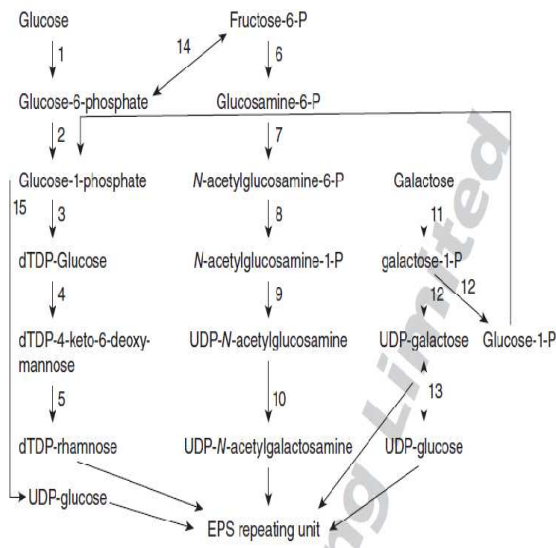
**Εικόνα 1.9.:** Απεικόνιση του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος και της β-γλυκάνης, ενός από τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Chan κ.α., 2009).

Γενικά ισχύει, ότι τα βιοσυνθετικά στάδια της παραγωγής πολυσακχαριτών, περιλαμβάνουν: 1) την εισαγωγή και αφομοίωση των μονομερών γλυκόζης εντός κυττάρου με παθητική ή ενεργό μεταφορά, 2) η μετατροπή τους σε ενεργά γλυκο-φωσφο-νουκλεοτίδια, έπειτα από ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση (π.χ. διφωσφορική ουριδίνη, UDP και διφωσφορική θυμίνη, TDP) (δότες σακχάρου), 3) η μεταφορά των σακχάρων μέσω λιπιδιακών μεταφορέων (που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη) με ειδικές γλυκοζυλοτρανσφεράσες και 4) πολυμερισμός από πολυμεράσες. Κομβικό ένζυμο στη διαδικασία αυτή είναι η μετατροπή της 6-φωσφορικής-γλυκόζης σε 1-φωσφορική-γλυκόζη μέσω της φωσφογλύκομουτάσης (PGM). Ωστόσο, το ένζυμο PGM δεν είναι το μοναδικό που παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και στην βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Giavasis, 2013).

Το ένζυμο UDP-γλυκόζη πυροφωσφορυλάση (UGP ή UGPάση, EC 2.7.7.9), θεωρείται επίσης ένζυμο κλειδί. Το ένζυμο αυτό, είναι μέλος της οικογένειας των Pfam γλυκοζυλο-τρανσφερασών και καταλύει με αμφίδρομο τρόπο, τη μετατροπή της 1-φωσφορικής- γλυκόζης (Glc-1-P) σε UDP-γλυκόζη (UDP-Glc). Με αντικείμενο μελέτης το μανιτάρι *G. lucidum*, έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα του ενδιάμεσου μεταβολίτη Glc-1-P επηρεάζουν και αλλάζουν την κυτοσολική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , ρυθμίζοντας την διακλάδωση των υφών του μανιταριού (Li κ.α., 2015).

Για την σύνθεση των EPS, εκτός από τα βιοσυνθετικά ένζυμα, σημαντικό ρόλο παίζουν και μεταφορείς λιπιδίων που είναι μακράς αλυσίδας εστέρες φωσφορικού και ισοπρενοειδείς αλκοόλες (παρόμοιες με εκείνες που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση λιποπολυσακχαριτών, Ο-αντιγόνου και πεπτιδογλυκανών). Κατά την σύνθεση των EPS, οι λιπιδιακοί-φορείς συνδέονται με την εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και ως μόρια <<άγκυρα>> συμβάλουν στην ομαλή συναρμολόγηση της υδατανθρακικής αλυσίδας. Η αλυσίδα στη συνέχεια, μεταφέρεται στην εξωτερική μεμβράνη όπου πολυμερίζεται από μία πολυμεράση, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και η ολόκληρη η αλυσίδα μεταφέρεται έξω από το κύτταρο από τις πρωτεΐνες εξαγωγέας που συνδέονται με το μεταφορέα λιπιδίων (Giavasis, 2013). Οι EPS παράγονται από μια πληθώρα μικροοργανισμών, μυκήτων και βακτηρίων, όπως γαλακτικά βακτήρια (LAB).

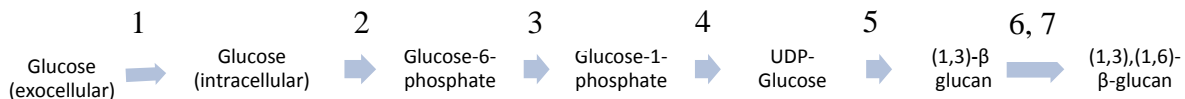




**Εικόνα 1.10.:** Σχηματική αναπαράσταση του συνθετικού μονοπατιού των γλυκο-νουκλεοτιδίων και των ετερογλυκανών LAB (Giavasis, 2013):

- (1) γλυκοκινάση
- (2) φωσφογλυκοουτάση
- (3) dTDP-πυροφωσφορυλάση γλυκόζης
- (4) αφυδρατάση
- (5) επιμεράση αναγωγής
- (6) γλουταμίνω-φρουκτόζω-6-φωσφορική τρανσαμινάση
- (7) γλουκοσαμίνω-φωσφορική ακέτυλτρανσφεράση
- (8) ακετυλγλυκοζαμίνω-φωσφορική μούτάση
- (9) UDP-γλυκοζαμίνω πυροφωσφορυλάση
- (10) UDP-N-ακετυλγλυκοσαμίνω-4-επιμεράση
- (11) γαλακτοκινάση
- (12) γαλακτόζω-1-φωσφορική ουριδυλ τρανσφεράση
- (13) UDP-γαλακτόζω-4-επιμεράση
- (14) ισομεράση της φωσφογλυκόζης
- (15) UDP-πυροφωσφορυλάση γλυκόζης

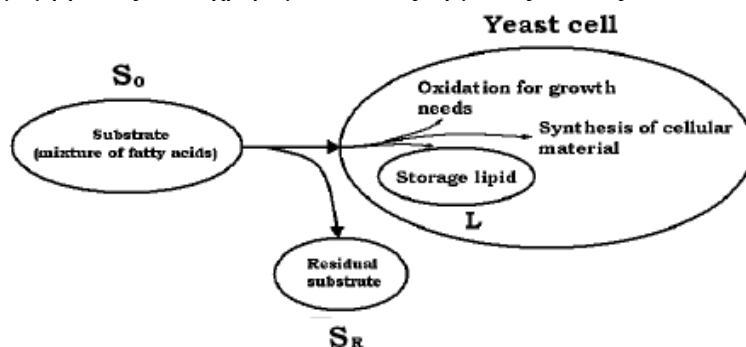
Όσο αφορά στο βιοχημικό, ενζυμικό και γενετικό υπόβαθρο της σύνθεσης των μυκητιακών γλυκανών αυτό δεν είναι καλά μελετημένο. Παρ' όλ' αυτά έχουν περιγραφεί συγκεκριμένες πορείες. Ο σχηματισμός των γλυκανών ξεκινά με την αφομοίωση της γλυκόζης από το/ους μεταφορέα (είς) γλυκόζης, τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική μέσω της εξοκινάσης. Μετά τον ισομερισμό σε 1-φωσφορική-γλυκόζη μέσω της δράσης της φωσφογλυκομουτάσης, σχηματίζεται η UDP-γλυκόζη από τη UDP γλυκόζω-1-φωσφορική ουριδυλ τρανσφεράση. Η συνθάση της (1,3) -β-γλυκάνης χρησιμοποιεί UDP-γλυκόζη για τη σύνθεση της κύριας αλυσίδας, ενώ μια (1-3),(1-6) -β-γλυκοζυλοτρανσφεράση συμβάλλει στη προσθήκη (1,6) -β γλυκοσιτικής πλευρικής αλυσίδας στην κύρια (1,3) αλυσίδα της -β-γλυκάνης (Giavasis, 2013).



**Εικόνα 1.11.:** Βιοσυνθετική οδός γλυκάνης του μύκητα *S. rolfii*. (1) μεταφορέας γλυκόζης (2) εξοκινάση (3) φωσφογλυκομουτάση (4) UTP-γλυκο-1-φωσφορική-ουριδυλτρανσφεράση (5) (1,3)-β-γλυκανοσυνθάση (6) γλυκόζυλ-τρανσφεράση (7) γλυκοσιδάση (Giavasis, 2013).

### Μεταβολισμός λιπιδίων

Τα λιπαρά οξέα περιέχουν μια μακριά υδρογονανθρακική αλυσίδα και μια τελική καρβοξυλική ομάδα και εμφανίζουν τέσσερις φυσιολογικούς ρόλους: 1<sup>ος</sup>) είναι δομικοί λίθοι των φωσφολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων 2<sup>ος</sup>) τροποποιούν πρωτεΐνες και τις καθοδηγούν στις μεμβράνες 3<sup>ος</sup>) χρησιμεύουν ως ορμόνες και ως ενδοκυτταρικοί σηματοδότες 4<sup>ος</sup>) είναι καύσιμα



μόρια και αποθηκεύονται ως τριακυλογλυκερόλες. Οι τριακυλογλυκερόλες, που ονομάζονται επίσης ουδέτερα λίπη ή τριγλυκερίδια, είναι μη φορτισμένοι εστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα (Berg κ.α., 2007).



γλυκερολών και φωσφολιπιδίων(δεξιά).Τα φωσφολιπίδια είναι τα κατεξοχήν δομικά λιπίδια των βιολογικών μεμβρανών (Berg κ.α., 2007).

### Βιοσύνθεση τερπενοειδών

Τα τερπενοειδή (ή αλλιώς ισοπρενοειδή ή ισοπεντενοειδή (Nes και Zhou, 2001) είναι λιπίδια ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός βιολογικού συστήματος. Απαντώνται ευρέως στα φύλλα και τους καρπούς των ανώτερων φυτών. Είναι πτητικές ενώσεις που δίνουν στα φυτά και στα λουλούδια το άρωμά τους. Είναι ευρέως διαδεδομένη οικογένεια φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνει πάνω από 30.000 ενώσεις σε όλα τα βασίλεια (Davis και Croteau, 2000). Παλιότερα στα τερπενοειδή αποδίδονταν ο μοριακός τύπος  $C_{10}H_{16}$  ενώ πλέον ο όρος που χρησιμοποιείται για τα τερπενοειδή είναι, ότι είναι υδρογονάνθρακες φυτικής προέλευσης του γενικού τύπου  $(C_5H_8)_n$ , και περιλαμβάνει και τα οξυγονωμένα, υδρογονωμένα και αφυδρογονωμένα παράγωγα τους (Bano, 2007).

Αν και στα φυτά τα τερπενοειδή είναι πρωτογενείς μεταβολίτες (Davis και Croteau, 2000) στους μύκητες είναι δευτερογενείς παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα τριτερπένια που είναι μικρού μοριακού βάρους εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική ρύθμιση και η αγγειογένεση (Bishop κ.α., 2015). Οι Βασιδιομύκητες παράγουν πολλά βιοδραστικά τερπενοειδή με πιθανή φαρμακευτική δράση (Wawrzyn, 2012).

Μια πιο λεπτομερής ταξινόμηση των τερπενοειδών είναι η εξής:

**Πίνακας Ι. 3.:** Χαρακτηρισμός τερπενοειδών (Davis και Croteau, 2000; Nes και Zhou, 2001)

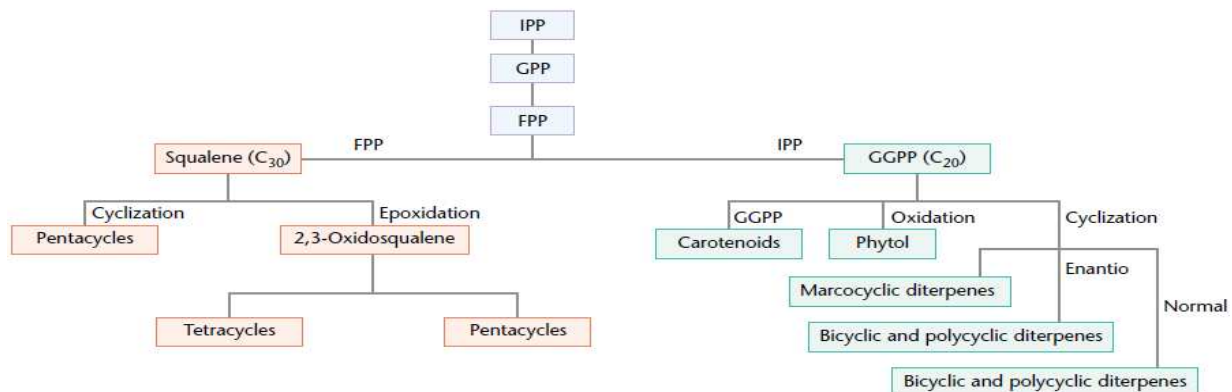
Ταξινόμηση	Χημικός τύπος	Παράδειγμα
Μονοτερπενοειδή	$C_{10}H_{16}$	Τερπινολένιο
Σεσκιτερπενοειδή	$C_{15}H_{24}$	Φαρνεσόλη
Διτερπενοειδή	$C_{20}H_{32}$	Ταξόλη
Σεσ τερπενοειδή	$C_{25}H_{40}$	β-σιτοστερόλη
Τριτερπενοειδή	$C_{30}H_{48}$	Σκουαλένιο
Τετρατερπενοειδή	$C_{40}H_{64}$	β-καροτένιο
Πολυτερπενοειδή	$(C_5H_8)_n$	Καουτσούκ

Γενικές ιδιότητες των τερπενοειδών (Yadav κ.α., 2014):

Τα περισσότερα από τα τερπενοειδή είναι άχρωμα, αρωματικά υγρά τα οποία είναι ελαφρύτερα από το νερό. Μερικά από αυτά είναι στερεά, π.χ. κάμφορα. Όλα είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και συνήθως αδιάλυτα στο νερό. Τα περισσότερα από αυτά είναι οπτικά ενεργές ενώσεις.

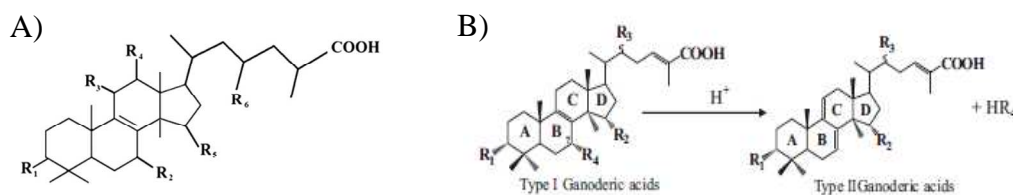
Είναι ενώσεις άκυκλες ή ακόρεστες κυκλικές που έχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς. Ως εκ τούτου μπορούν να συμμετάσχουν σε αντιδράσεις προσθήκης με υδρογόνο, αλογόνα, οξέα, κλπ. Ορισμένα από τα προϊόντα που προκύπτουν έχουν αντισηπτικές ιδιότητες. Μπορούν να υποβληθούν σε πολυμερισμό και αφυδρογόνωση. Εύκολα οξειδώνονται σχεδόν από όλους τους οξειδωτικούς παράγοντες. Με θερμική αποσύνθεση, τα περισσότερα από τα τερπενοειδή αποδίδουν ισοπρένια ως ένα από τα προϊόντα. Τα ισοπρενοειδή βιοχημικά λειτουργούν ως κινόνες συμμετέχοντας στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ως συστατικά των μεμβρανών, στην στόχευση και ρύθμιση (πρενυλίωση πρωτεϊνών), ως φωτοσυνθετικές χρωστικές

(καροτενοειδή), ως ορμόνες (γιββερελλίνες, μπρασσινοστεροειδή, αμπσικικό οξύ), και ως συστατικά της άμυνας των φυτών (μονοτερπένια, sesquiterpenes, διτερπένια) (Lange κ.α., 2000). Τα άγλυκα των τερπενοειδών ονομάζονται σαπογενίνες, ενώ οι σαπωνίνες είναι μια μεγάλη οικογένεια δομικά σχετική με τις σαπογενίνες, οι οποίες συνδέονται με ένα ή περισσότερους ολιγοσακχαρίτες μέσω γλυκοζιτικού δεσμού. Το υδατανθρακικό τμήμα αποτελείται από πεντόζες, εξόζες ή ουρονικά οξέα. Η παρουσία τόσο πολικών (σακχάρων) όσο και μη πολικών (στεροειδές ή τριτερπενικών) ομάδων προσδίδει στις σαπωνίνες ισχυρές επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Η δομική ποικιλομορφία τους είναι ο λόγος για τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες που εμφανίζουν και χάρη σε αυτές βρίσκουν εφαρμογές στη βιομηχανία και στη παρασκευή προϊόντων (σαμπουάν, υγρά απορρυπαντικά, οδοντόκρεμες, ως γαλακτωματοποιητές σε ποτά και παράγοντες αφρισμού μακράς διάρκειας) (Chen, 2010; Madland, 2013).



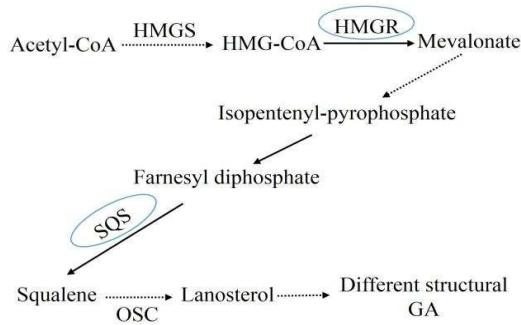
**Εικόνα I.17.:** Διαγραμματική απεικόνιση των παραγόμενων τερπενοειδών από το γεράνυλ- γεράνυλ διφωσφορικό ( $C_{20}$ ) και από το σκουαλένιο ( $C_{30}$ ), αντίστοιχα (Nes και Zhou, 2001).

Τα βιοδραστικά τερπενοειδή του γένους *Ganoderma* ονομάζονται γανοδερικά οξέα (GAs) και έχουν σπουδαίες φαρμακολογικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι το *G. lucidum* περιέχει πάνω από 140 GAs. Αν και οι ιδιότητές τους είναι σημαντικές, το γεγονός ότι παράγονται σε μικρές ποσότητες σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος ανάκτησης δεν έχουν οδηγήσει σε ευρεία χρήση τους. Ο ανθρακικός σκελετός των GAs εμφανίζει δυο τύπους. Τον τύπο 2, που διαθέτει δύο συζυγικούς διπλούς δεσμούς στον τετρακυκλικό δακτύλιο και τον τύπο 1, που δεν διαθέτει. Η αντικαρκινική και αντιμεταστατική δράση του τύπου 2 είναι πολλά υποσχόμενη ενώ του τύπου 1 η δράση είναι ασθενής (Li κ.α., 2013; Bishop κ.α., 2015).



**Εικόνα I.18.:** Α) Ο δομικός σκελετός των GAs μυκηλίου από *G. lucidum* που είναι υποτύπος των τριτερπενοειδών με τέσσερα κυκλικά και δυο γραμμικά ισοπρένια (Bishop κ.α., 2015) Β) GAs τύπου 1 και 2, όπου  $R_1R_2R_3R_4$  υποκατεστημένες ομάδες: a-OH ή a-OAc ή a-ethyl (Li κ.α., 2013)

Στην Εικόνα I.19 παρουσιάζεται ένα γενικευμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής GAs, στο οποίο περιλαμβάνονται και βιοσυνθετικά στάδια παραγωγής τριτερπενοειδών.



**Εικόνα I.19.:** Βιοσύνθεση γανοδερικών οξέων μέσω του μεβαλονικού μονοπατιού στο *G. lucidum*. Όπου: HMG-CoA: υδρόξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-συνένζυμο Α, HMGs: συνθάση του HMG-CoA, HMGR: αναγωγή του HMG-CoA, MVD: μεβαλονι-5-πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, IPP: ισοπεντενυλ-πυροφωσφορικό; FPP: φαρνεσυλπυροφωσφορική συνθάση, FPP: διφωσφορικό φαρνεσύλιο, SQS: συνθάση σκουαλενίου; OSC: κυκλάση οξειδοσκουαλενίου (Heydariian κ.α., 2015)

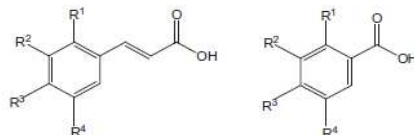
Ενδεικτικά, στον Πίνακα I.4 παρουσιάζονται κάποια από τα τερπενοειδή που έχουν ανιχνευτεί σε μανιτάρια γένους *Ganoderma* spp. και η βιολογική τους δράση.

**Πίνακας I.4.:** Τερπενοειδή μανιταριών *Ganoderma* spp (Lindequist κ.α., 2005; Trigou και Medellín, 2011)

Όνοματολογία	Βιολογική δράση
Γανομυκίνη	Αντιβακτηριακή δράση
Γανοδεριόλη F	Αντι-ική δράση
Γανοδερμано-δι/τρι-όλη	Αντι-ική δράση και δράση κατά του συμπληρωματικού συστήματος
Γανοδερικό οξύ B	Αντι-ική δράση
Γανοδερικό οξύ C	Αναστολέας βιοσύνθεσης χοληστερόλης
Γανοδερικό οξύ F,S	Προστατευτική δράση κατά της αθηροσκλήρωσης
Γανοδερικό οξύ Z, Y, X, W, V, T	Κυττοστατική δράση
Λουσιαλδεΰδη A, B, C	Κυττοστατική δράση
Αουστραλικό οξύ	Κυττοστατική δράση
Απλανοξικό οξύ A-H	Αντιβακτηριακή και κυττοστατική δράση
5a-lanosta-7,9(11),24-triene-15a-26-dihydroxy-3-one	Απόπτωση κυττάρων HL-60

### Βιοσύνθεση φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα είναι μόρια που συγκαταλέγονται στην ομάδα των βιοδραστικών ενώσεων που φέρουν τα μανιτάρια και μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες: των υδροξυβενζοϊκών οξέων και των υδροξυκινναμωμικών οξέων, που προέρχονται από τα μη-φαινολικά μόρια, του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος, αντίστοιχα. Τα παράγωγα του πρώτου περιλαμβάνουν το γαλλικό, βανιλικό, συριγγικό και πρωτοκατεχικό οξύ, ενώ τα παράγωγα του δεύτερου περιλαμβάνουν τοφερουλικό, καφεϊκό, π-κουμαρικό και σιναπικό οξύ. Χημικά, αυτές



Substitution	Cinamic acid derivatives	Benzoic acid derivatives
R <sup>1</sup> =OH	<i>o</i> -Coumaric acid	-
R <sup>2</sup> =OH	<i>p</i> - Coumaric acid	<i>p</i> - Hydroxybenzoic acid
R <sup>3</sup> =R <sup>4</sup> =OH	Caffeic acid	Protocatechuic acid
R <sup>2</sup> =OCH <sub>3</sub> , R <sup>3</sup> =OH	Ferulic acid	Vanillic acid
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =OCH <sub>3</sub>	-	Veratric acid
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =R <sup>4</sup> =OH	-	Gallic acid
R <sup>1</sup> =R <sup>4</sup> =OH	-	Gentisic acid
R <sup>2</sup> =R <sup>4</sup> =OCH <sub>3</sub> , R <sup>3</sup> =OH	Sinapic acid	Syringic acid
R <sup>1</sup> =OH, R <sup>4</sup> =HSO <sub>3</sub>	-	5- Sulphosalicylic acid
R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =OH	3,4 or 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid *	-

\* The carboxylic group is esterified with quinic acid.

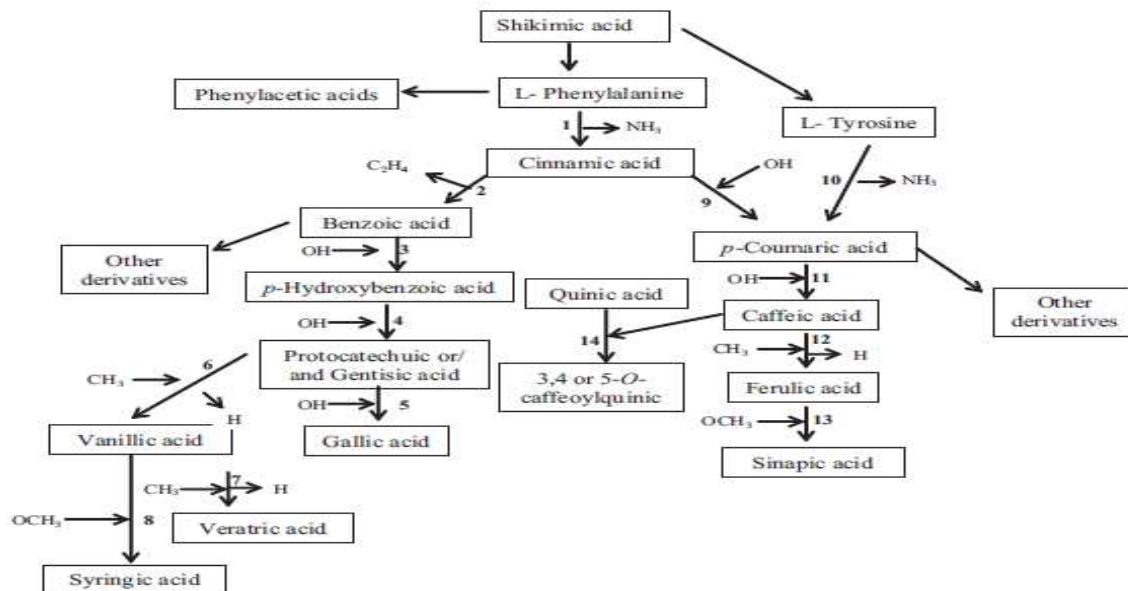
**Εικόνα I.20.:** Οι χημικές δομές των παραγώγων του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος που εντοπίζονται συνήθως σε μανιτάρια (Heleno κ.α., 2015).



οι ενώσεις έχουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο στον οποίο τουλάχιστον ένα υδρογόνο είναι υποκατεστημένο από μία υδροξυλομάδα (Khoddami κ.α., 2013; Heleno κ.α., 2015).

Τα φαινολικά οξέα συντίθενται μέσω του σικιμικού μονοπατιού, από την L-φαινυλαλανίνη ή την L-τυροσίνη, τα οποία έχουν κοινή πρόδρομη ένωση το χορισμικό (Hsu Ching-yu, 2013). Η φαινυλαλανίνη και τυροσίνη είναι πολύ σημαντικά αμινοξέα σε αυτό το μονοπάτι επειδή αποτελούν κοινές πρόδρομες ουσίες για την πλειοψηφία των φυσικών φαινολικών προϊόντων (Heleno κ.α., 2015).

Εν συντομία, αρχικά η φαινυλαλανίνη και/ή η τυροσίνη απαμινώνονται αποδίδοντας κινναμικό ή/και π-κουμαρικό οξύ, αντίστοιχα. Οι αρωματικοί δακτύλιοι του κινναμωμικού και π-κουμαρικού οξέως υδροξυλιώνονται και μεθυλιώνονται προκειμένου να σχηματίσουν τα παράγωγά τους, π.χ., φερουλικό και καφεϊκό οξύ. Η απαμίνωση, η υδροξυλίωση και η μεθυλίωση είναι οι κύριες τρεις αντιδράσεις που εμπλέκονται στο σχηματισμό των φαινολικών οξέων (Heleno κ.α., 2015).



**Εικόνα I.21.:** Απεικόνιση της βιοσύνθεσης των φαινολικών οξέων προερχόμενων από την οδό του σικιμικού οξέος (Heleno κ.α., 2015).

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντικές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Ακόμα η βιοδραστικότητα των φαινολικών σχετίζεται με την ικανότητα τους να δρουν ως χηλικοί υποκαταστάτες μετάλλων, αναστολείς της λιποξυγενάσης και σαρωτές ελευθέρων ριζών (Kim κ.α., 2008).

### I.3. Μανιτάρια γένους *Ganoderma* spp.

Τα μανιτάρια γένους *Ganoderma* είναι βασιδιομύκητες λευκής σήψης και έχουν χρησιμοποιηθεί για ιατρικούς σκοπούς εδώ και αιώνες κυρίως στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα (Russell και Paterson, 2006)

### 1.3.1. Συστηματική κατάταξη και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Εμπνευστής του ονόματος *Ganoderma* ήταν ο μυκητολόγος Karsten το 1881 (Zhou κ.α.,2015). Το όνομα *Ganoderma* έχει ελληνική ρίζα αφού το πρώτο συνθετικό της σύνθετης αυτής λέξης είναι το γάνος, που σημαίνει φωτεινός, λαμπερός και η δεύτερη το δέρμα. Πολλές φορές αντί της ονομασίας *Ganoderma* χρησιμοποιείται το όνομα Reishi, αν και η ονομασία αυτή έχει περισσότερο ταυτιστεί με το *Ganoderma lucidum* (Babu και Subhasree, 2008). Στον Πίνακα 1.5. παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη του.

Πίνακας 1.5.: Συστηματική κατάταξη μανιταριού *Ganoderma* (Sanodiya κ.α., 2009)

Βασίλειο	Μύκητες (Fungi)
Διαίρεση	Βασιδιομύκητες ( <i>Basidiomycota</i> )
Κλάση	Αγαρικομύκητες ( <i>Agaricomycetes</i> )
Τάξη	Πολυπορώδη ( <i>Polyporales</i> )
Οικογένεια	Γανοδερματοειδή ( <i>Ganodermataceae</i> )
Γένος	<i>Ganoderma</i>

Τα μανιτάρια του γένους *Ganoderma* χαρακτηρίζονται από βασιδιόκαρπα, που είναι μεγάλα, πολυετή, ξυλώδη αγκυλωτά και είναι δερματώδη, είτε με ή χωρίς μίσχο. Τα καρποσώματα τους συνήθως μεγαλώνουν στους κορμούς των ζωντανών ή νεκρών δέντρων. Έχουν διπλά τοιχώματα, εντός των οποίων βρίσκονται σπόρια με κίτρινο έως καφέ χρώμα. Όσον αφορά στις υφές τους είναι τριμιτικές και (όπως έχει ήδη αναφερθεί) ως μύκητες λευκής σήψης, μπορούν να αποδομούν ξυλώδη κυτταρικά τοιχώματα με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της επιλεκτικής αποξύλωση και ταυτόχρονη σήψης, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι *G. adpersum* είναι σε θέση να προκαλέσει μια μαλακή σήψη (Schwarze και Ferner, 2003).



Εικόνα 1.22.: Σώμα μανιταριού Reishi (Babu και Subhasree, 2008)

Μέχρι πρόσφατα το γένος χωριζόταν σε δύο τμήματα: σε αυτό του *Ganoderma* με γυαλιστερή επιφάνεια καλύμματος (π.χ. *G. lucidum*) και σε εκείνο του *Elfvig*, με μια θαμπή επιφάνεια πύλου (π.χ. *Ganoderma applanatum*). Αυτό πλέον δεν ισχύει διότι το γένος αυτό έχει χωριστεί στις εξής έξι μονοφυλετικές ομάδες: *G. colossus*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. lucidum*, *G. meredithiae*, *G. resinaceum*. Σημειώνεται ότι ο διαχωρισμός και η ταξινόμηση των ειδών των μυκήτων του γένους *Ganoderma* είναι δύσκολος, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφία των μακροσκοπικών χαρακτηριστικών. Ίσως οι μύκητες *Ganoderma* είναι το πιο δύσκολο γένος των *Polypores* όσον αφορά στο διαχωρισμό τους (Niemelä και Miettinen, 2008; Zhou κ.α.,2015).

### 1.3.2. Τύποι Μανιταριού *Ganoderma*

Αν και υπάρχουν περισσότερα από 2000 γνωστά είδη *Ganoderma*, μόνο έξι έχουν μελετηθεί εκτενώς, και αυτά είναι το: κόκκινο, μαύρο, μπλε, λευκό, κίτρινο και πορφυρό. Από αυτά τα έξι έχει αποδειχθεί ότι τα μανιτάρια μαύρου και κόκκινου χρώματος είναι πιο σημαντικά λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων (Babu και Subhasree, 2008). Στον Πίνακα 1.6 παρουσιάζεται το χρώμα, η γεύση και η χρήση των διαφόρων ειδών *Ganoderma*.

Πίνακας Ι.6.: Τύποι Μανιταριού *Ganoderma* (Babu και Subhasree, 2008)

Χρώμα	Γεύση	Χρήση
Μπλε	Ξινή	Βελτιώνει την όραση και τη λειτουργία του ήπατος
Κόκκινο	Πικρή	Βοηθά τα εσωτερικά όργανα και τη μνήμη
Κίτρινο	Γλυκιά	Ενισχύει τη λειτουργία της σπλήνας
Λευκή	Καυτό	Προστατεύει τα νεφρά
Μαύρο	Αλμυρή	Βελτιώνει τη λειτουργία των πνευμόνων
Μωβ	Γλυκιά	Ενισχύει τη λειτουργία των ματιών και επιδρά στην απόχρωση

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στα μανιτάρια: *G. adspersum*, *G. resinaceum*, *G. applanatum* και *G. lucidum*, όπως ενδεικτικά απεικονίζονται στην Εικόνα Ι.23.



Εικόνα Ι.23: Τα μελετώμενα μανιτάρια της παρούσας εργασίας

### Ι.3.2.1. *Ganoderma lucidum*

Το *Ganoderma lucidum* θεωρείται κοσμοπολίτικο, και συναντάται σε: δάση, πάρκα, κήπους, κάτω από θάμνους, κοντά σε μονοπάτια και σε κομποστοποιημένα υποστρώματα. Συνήθως η περίοδος καρποφορίας του ξεκινά τέλη καλοκαιριού με αρχές φθινοπώρου, ενώ σπάνια καρποφορεί την άνοιξη, ενώ όταν αρχίζει να απελευθερώνει νέφος καφέ σποριών, αυτά προσκολλώνται στην άνω επιφάνεια του πύλου (και στο φλοιό του δέντρου στο οποίο επισυνάπτεται) παρουσιάζοντας έτσι μια λακαρισμένη όψη. Στο συγκεκριμένο μανιτάρι, υπό συνθήκες μερικές φορές σχηματίζει ροζέτα και όχι βραχίονα.



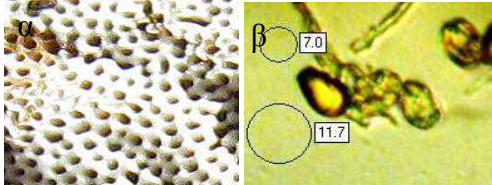
Ο πύλος του εκτίνεται έως 25 εκατοστά κατά μήκος και έχει 4 εκατοστά πάχος. Τις περισσότερες φορές εμφανίζεται στίπος, αν και έχουν υπάρξει μερικές φορές που είναι άμισχα. Η όψη του παραπέμπει σε σχήμα βεντάλιας ή σχήμα νεφρού. Επίσης μπορεί να συνδέεται πλευρικά ή κεντρικά όταν δεν έχει μίσχο-στίπο. Τότε σχηματίζει ομόκεντρα αυλάκια με ζώνες σκίασης κίτρινες, πορτοκαλί, κόκκινες και μωβ. Τα χρώματα γίνονται ώχρα προς το περιθώριο με την άκρη να είναι υπόλευκη. Όσο μεγαλώνει ηλικιακά το *Ganoderma lucidum*, όλη η άνω επιφάνεια του μετατρέπεται σε μωβ-καφέ, μέχρι τελικά να μαυρίσει.



Εικόνα Ι.24.: Απεικόνιση τμημάτων του *Ganoderma lucidum*: α) πύλος σχήματος βεντάλιας β) οι στίπος-μίσχος γ) πλευρική όψη καρποσώματος από την μεριά των πόρων δ) από κάτω όψη



Ο στίπος αν υπάρχει συνδέεται έκκεντρα με τον πύλο και μπορεί να εκτείνεται μέχρι 20 εκατοστά σε μήκος, αν και συνήθως το μήκος κυμαίνεται από 5 έως 15 εκατοστά. Ο κόκκινο-καφέ μίσχος και η άνω επιφάνεια του έχουν μια λουστραρισμένη γυαλάδα, που γίνεται θαμπή και ματ, όταν καλύπτεται από σπόρια. Οι σωλήνες της κάτω επιφάνειας αρχικά είναι λευκοί 5 έως 20 χιλιοστά βάθους και τυπικά απέχουν κατά 4 έως 6 πόρους ανά χιλιοστό. Οι μικροί σφαιροειδείς πόροι είναι μετά βίας αντιληπτοί με γυμνό μάτι, λευκού χρώματος όταν το καρπόσωμα είναι ηλικιακά νέο, ενώ όσο μεγαλώνει μαυρίζει ή μελανιάζει. Τα σπόρια του είναι ελλειψοειδή, με δύο μονά τοιχώματα, μεγέθους 7-12 x 6-8 μm, διακοσμημένα με μερικά ωραία κονδυλώματα. Όσο αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά η οσμή του δεν είναι σημαντική ενώ η γεύση του είναι πικρή.



**Εικόνα I.25.:** Απεικόνιση α) των πόρων β) των σπορίων του *G. lucidum*

Ακόμα αξίζει να αναφερθεί ότι η λέξη *lucidum* στα λατινικά σημαίνει γυαλιστερό ή λαμπρό. Ο χαρακτηρισμός αυτός περιγράφει εύστοχα το καρπόσωμα του μανιταριού το οποίο έχει πρότυπη, ανάγλυφη και λουστραρισμένη εμφάνιση. Στο *Ganoderma lucidum* έχουν δοθεί αρκετά ονόματα. Στη γαλλική βιβλιογραφία μπορεί να συναντηθεί ως: *Ganoderme luisant*, *polyporeluisant* και *polyporelaque*. Στην κινεζική βιβλιογραφία συναντάται συνήθως ως *lingzhi* που σημαίνει “spirit plant”, δηλαδή <<πνευματικό φυτό>>, στη ιαπωνική ως *reishi*, ενώ στην αγγλική ως *Ling-Zhi*, *Reishi*.

### 1.3.2.2. *Ganoderma resinaceum*

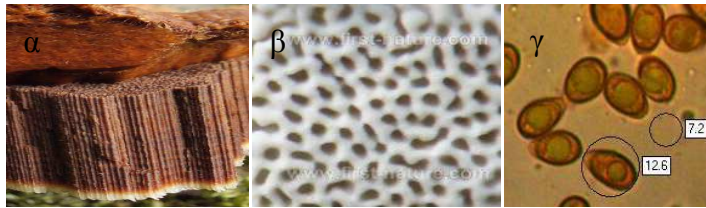
Είναι ένας σπάνιος πορώδης μύκητας που παραμένει όλο το χρόνο σε βελανιδιά (*Quercus*) και οξιά (*Fagus*) σε διάσπαρτα δένδρα δάσους ή σε μεγάλοι ύψους ξύλα στην Ευρώπη. Η κίτρινη



ρητίνη από τα άκρα αυτού του μεγάλου βραχίονα σκληραίνει γρήγορα, ενώ καθώς το καρπόσωμα μεγαλώνει ηλικιακά, αλλάζει το χρώμα του σε μαύρο, γεγονός αρκετά παραπλανητικό, αφού τότε εύκολα μπορεί να το μπερδέψει με το μύκητα *Hoof*, *Fomes fomentarius*. Όταν ο σκληρός βραχίονας σπάει ή κοπεί, μια παχιά κίτρινη ρητίνη ξεχειλίζει από το μύκητα και ταχέως σχηματίζεται μια σκληρή γυαλιστερή επιφάνεια. Το μανιτάρι αυτό συναντάται πιο συχνά σε ορισμένες βόρειες και κεντρικές περιοχές της ηπειρωτικής Ευρώπης, αν και έχει αναφερθεί ότι υπάρχει στη βόρεια Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία και στην

Αμερικανική ήπειρο. Σε σύγκριση με άλλα είδη αυτού του γένους, το *Ganoderma resinaceum* είναι αρκετά φωτεινό και λαμπερό, όταν η άνω επιφάνειά του ξεπλυθεί από τη σκόνη των σπορίων. Ακόμα αξίζει να αναφερθεί ότι η λέξη *resinaceum* παραπέμπει σε κάτι «ρητινώδες» και είναι μια αναφορά στο σκληρό κολλώδες υγρό που εμφανίζουν τα καρποσώματα όταν αυτά υποστούν ζημιά. Η κοκκινο-καφέ σκόνη των σπορίων του είναι αρκετά εντυπωσιακή όταν σε νεαρή ηλικία δεν καλύπτεται από στίπο. Ο μύκητας αυτός σχηματίζει μερικές φορές στον βραχίονα του επίπεδα που κατά καιρούς συγχωνεύονται. Η διαστασιολόγηση του βραχίονα 15 έως 35 cm κατά μήκος και 4 έως 8 cm πάχος, όταν αναπτυχθεί πλήρως. Ο πύλος του καρποσώματος έχει μια ελαφριά κίτρινη άκρη και μια πορτοκαλο-ερυθροκίτρινο-καφέ κορυφή. Η κάτω επιφάνεια φέρει καφέ σωλήνες από 8 έως 20mm βάθους, που καταλήγουν σε σφαιροειδείς πόρους. Οι πόροι απέχουν μεταξύ τους κατά 3-4 ανά χιλιοστό, είναι αρχικά λευκοί

ή περισσότερο συχνά χλωμό-κίτρινοι όταν το καρπόσωμα είναι νεαρής ηλικίας, ενώ όσο μεγαλώνει ηλικιακά γίνεται καφέ ή μελανιάζει. Όσον αφορά τα σπόρια ελλειψοειδή διάστασης 9-11x5-7 μm. Όσον αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, το *Ganoderma resinaceum* έχει πικάντικη οσμή και μια πικρή γεύση.



**Εικόνα 1.26.:** Απεικόνιση τμημάτων του *Ganoderma resinaceum*: α) οι σωλήνες της κάτω επιφάνειας β) οι πόροι γ) τα σπόρια

### 1.3.2.3. *Ganoderma applanatum*

Το *G. applanatum* είναι ένας πολύ κοινός πολυετής μύκητας, που καθώς αναπτύσσεται εμφανίζει γραμμώσεις στην άνω επιφάνεια, η οποία έχει χρώμα καφέ. Το κάτω μέρος του είναι υπόλευκο και μπορεί να γρατσουνιστεί με κάτι αιχμηρό και να αφήσει καφέ σημάδια. Εάν κοπεί ο βραχίονας διακρίνονται στρώματα πόρων σωλήνα, με τον αριθμό των στρωμάτων να δίνει μια ένδειξη για την ηλικία του καρποσώματος.



Συνήθως αναπτύσσεται σε κορμούς πλατύφυλλων δέντρων και σε κορμούς-κούτσουρα, σε κλαδιά, κυρίως σε δρυ και οξιά, αλλά και σε κωνοφόρα. Η διαστασιολόγηση του είναι από 15 έως 50 εκατοστών σε μήκος και από 5 έως 10 εκατοστών σε πάχος.

Οι σωλήνες του εκτείνονται μέχρι 12 χιλιοστά σε βάθος και οι πόροι του είναι μικροί στρογγυλοί, συνήθως πέντε ανά χιλιοστό,



λευκού χρώματος όταν το καρπόσωμα είναι ηλικιακά νέο, ενώ όσο μεγαλώνει μαυρίζει ή μελανιάζει. Τα σπόρια του είναι ελλειψοειδή, μεγέθους 6,5-8,5x4,5-6μm., ενώ όσο αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά έχει την τυπική μανιταρώδη οσμή και μια πικρή γεύση. Ακόμα αξίζει να αναφερθεί ότι η λέξη *applanatum* παραπέμπει σε πεπλατυσμένη (επίπεδη) μορφή. Εκτός από την επιστημονική του ονομασία στο *Ganoderma applanatum* έχουν δοθεί και άλλα ονόματα. Στη γαλλική βιβλιογραφία μπορεί να συναντηθεί ως *Ganoderme plan*, ενώ στην αγγλική ως: *red mother*, *ancient lingzhi* και *artist's conk*. Στην Κίνα έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον για την αντιμετώπιση της ρευματικής φυματίωσης και του οισοφαγικού καρκίνου.

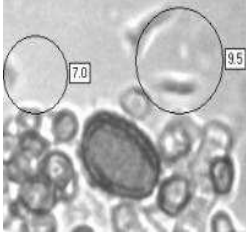
### 1.3.2.4. *Ganoderma adspersum*

Το συγκεκριμένο μανιτάρι συναντάται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, κυρίως όμως στην κεντρική και στη βόρεια. Είναι πολυετής μύκητας λευκής σήψης που προσβάλλει δέντρα γένους: *Tilia* (λάιμ), *Quercus* (βελανιδιές), *Fagus* (οξιά, σημύδα), *Platanus* (Sycamore) και *Aesculus* (Horse Chestnut). Στα πρώτα στάδια του αποικισμού, πιστεύεται πως λειτουργεί ως παρασιτικός μύκητας, αλλά καθώς το δέντρο πεθαίνει γίνεται σαπροφυτικός, τακτική πολύ συνηθισμένο στους περισσότερους παρασιτικούς μύκητες. Τα πολυετή καρποσώματα εμφανίζονται κυρίως στο κάτω κορμό, συνήθως κοντά στη βάση.



Ο βραχίονας είναι πολυετής, σκληρός, μη βρώσιμος και κατά την ανάπτυξη του εμφανίζει αυξανόμενες <<κορυφογραμμές>> στην επάνω επιφάνεια. Η κατά μήκος επιφάνεια φτάνει τα 25 εκατοστά σε όλη και σπάνια τα 50, ενώ το πάχος του κυμαίνεται από 5 έως 25 εκατοστά. Η άνω επιφάνεια έχει χρώμα σκούρο καφέ ή σκούρο γκρι. Το στρώμα όπου εντοπίζονται οι σωλήνες είναι λευκό όταν αυτό είναι έτοιμο να απελευθερώσει τα σπόρια του, τα οποία έχουν χρώμα καφέ όπως συμβαίνει και με άλλους μύκητες *Ganoderma*, καλύπτοντας την γύρω περιοχή με πυκνή καφέ σκόνη.

Οι κόκκινο-καφέ σωλήνες του είναι κλιμακωτοί, καθώς κάθε χρόνο παράγεται και προστίθεται ένα νέο στρώμα, στην κάτω επιφάνεια. Οι μικροί στρόγγυλοι πόροι, συνήθως είναι τρεις ή τέσσερις ανά mm, είναι λευκοί όταν το καρπόσωμα αυξάνεται και πλησιάζει την στιγμή που θα απελευθερώσει σπόρια, ενώ όσο μεγαλώνει ηλικιακά γίνεται καφέ ή μαυρίζει. Τα σπόρια του είναι καστανά, ωειδή, με δύο μονά τοιχώματα, διάστασης 8-13x5.5-9 μm. Όσο αφορά στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά μυρίζει λίγο και φέρει μια πικρή γεύση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στο *G. adspersum* έχουν δοθεί αρκετά ονόματα. Παλιότερα ονομάζονταν *Ganoderma australle* και πολλές φορές συναντάται στη βιβλιογραφία και με αυτό το όνομα.



Οι φαρμακευτικές και ανοσολογικές ιδιότητες των μανιταριών γανόδερμα αναλύονται σε μετέπειτα εδάφιο, ενώ για το μανιτάρι *G. lucidum* θα γίνει εκτενή αναφορά. Η επιλογή του τελευταίου για περαιτέρω μελέτη δεν είναι τυχαία, διότι είναι το πιο καλά μελετημένο *Ganoderma*, γεγονός που οφείλεται στις ιδιαίτερες θεραπευτικές του ιδιότητες.

## I.4. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών *Ganoderma* και η εφαρμογή τους στην ιατρική

### I.4.1. Ιστορική Αναδρομή

Οι μακρομύκητες όπως το μανιτάρι *G. lucidum*, είναι πολύ σπάνιοι στη φύση, για αυτό και στην αρχαίο Κίνα όποιος κατάφερνε, έβρισκε και πρόσφερε *G. lucidum* στην Κινεζική Αρχή πληρώνονταν αδρά, δεδομένου της φαρμακευτικής του αξίας αλλά και της σπανιότητας του. Η εξέχουσα θέση την οποία κατείχε το *G. lucidum* γίνεται αντιληπτή μέσα από την Ιστορία. Η παλαιότερη αναφορά του Ling Zhi χρονολογείται την εποχή του πρώτου αυτοκράτορα της Κίνας, του Shing Χουάνγκ, της δυναστείας Ch'in (221-207 π.Χ.). Ενώ την περίοδο της δυναστείας Γιουάν (1280-1368 μ.Χ.), το *G. lucidum* απεικονίζονταν συνέχεια στα έργα τέχνης (σε πίνακες ζωγραφικής, σε γλυπτά από νεφρίτη και κέρατα ελαφιού, σε έπιπλα και σε σχέδια χαλιών, σε κιγκλιδώματα, σε κοσμήματα, σε γυναικείες χτένες μαλλιών και σε μυροδοχεία). Εν ολίγοις το *G. lucidum* αποτέλεσε καλλιτεχνικό <<μοτίβο>> σε όλων των ειδών τις τέχνες ακόμα και στη λογοτεχνία (Wasser, 2005; Sanodiya κ.α., 2009).

Στο συγκεκριμένο μανιτάρι έχουν δοθεί πολλά ονόματα όπως αυτό του Ling Zhi, του Reishi, του Mannentake, του Youngzhi και θεωρήθηκε <<μανιτάρι της αθανασίας>> στην Κίνα, στην Ιαπωνία, στην Κορέα και σε άλλες ασιατικές χώρες. Η απόδοση αυτού του χαρακτηρισμού προέκυψε λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων, με την σημαντικότητα της χρήσης του να περνά από γενιά σε γενιά στον αρχαίο ασιατικό κόσμο (Wasser, 2005; Babu και Subhasree, 2008; Sanodiya κ.α., 2009).

#### Ι.4.2. Θεραπευτικές ιδιότητες

Για τους ανωτέρω λόγους, το *G. lucidum* έγινε αντικείμενο παγκόσμιας εκτενής έρευνας, αποτέλεσμα της οποίας ήταν η εύρεση περίπου 400 διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων στα καρποσώματα, στα μυκήλια και στα σπόρια του. Τα κύρια συστατικά στοιχεία του είναι (Boh κ.α., 2007; Sanodiya κ.α., 2009; Adejumo κ.α., 2015):

- Πολυσακχαρίτες
- Σύμπλοκα πολυσακχαριτών-πεπτιδίων
- β-γλυκάνες
- Λεκτίνες
- Οργανικό γερμάνιο(Ge)
- Αδενοσίνη
- Τριτερπενοειδή  
(κυρίως λουσιδενικά και γανοδερικάοξέα)
- Λακτόνες
- Νουκλεοζίτες
- Στερόλες
- Στεροειδή
- Αλκαλοειδή
- Λιπαρά οξέα
- Πρωτεΐνες/πεπτίδια
- Ένζυμα
- Ιχνοστοιχεία

Η ύπαρξη περισσότερων από 200 ενεργών στοιχείων τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε διαλυτά στο νερό, σε οργανικό διαλύτη και σε πτητικές ενώσεις, μπορούν να υποστηρίξουν και ενισχύσουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού, μέσω της ισχυρής ανοσο-τροποποιητικής δράση τους (Sanodiya κ.α., 2009).

Το *G. lucidum* με τις ιδιότητες που έχει βοηθά πολλαπλώς τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως φαίνεται και παρακάτω:

- είναι αντι-αλλεργιογόνο
- είναι αντιοξειδωτικό
- είναι αντιμυκητιασικό
- είναι αντιφλεγμονώδες
- είναι αντικαρκινικό
- είναι αντι-ικό
- είναι αντιπαρασιτικό
- αντι-βακτηριακό
- είναι αντιδιαβητικό
- είναι αντι-ανδρογόνο με οιστρογονική δράση
- είναι αντι-αγγειογενετικό
- είναι αντι-ερπητικό
- είναι ανοσορρυθμιστικό
- είναι ηπατοπροστατευτικό
- είναι αναλγητικό
- τονώνει τα νεφρά, τους νευρώνες και τη σεξουαλικότητα
- προλαμβάνει τη βρογχίτιδα
- αναστέλλει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων
- χαμηλώνει: την αρτηριακή πίεση, την χοληστερόλη και τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα
- χημειο/ράδιο-προστατευτικό



χημειοπροληπτικό  
βοηθά στον ύπνο  
δρα κατά του έλκους  
αντιμετωπίζει καρδιαγγειακά προβλήματα (αντι-αθηροσκληρωτικό)  
αντιμετωπίζει υποτασικά και υπερτασικά περιστατικά

Οι ιδιότητες του *G. lucidum* ερμηνεύονται χάρη στην αντι-αγγειογενετική, αντιυπερτασική, υποχοληστερολαιμική και στηναντισταμινική του δράση. Ακόμα, μπορεί να επηρεάσει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και να αναστείλει το σύστημα συμπληρωματικότητας, ενώ τέλος εμφανίζει και αντι-HIV δράση (Boh κ.α., 2007). Τα ευεργετικά αποτελέσματα που φέρνει στον ανθρώπινο οργανισμό σε συνδυασμό με την απουσία παρενεργειών ήταν η αιτία, για να αποκτήσει φήμη στην Ανατολή και να προστεθεί στο American Herbal Pharmacopoeia και στο Therapeutic Compendium (Sanodiya κ.α., 2009). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η σπανιότητα και η ανεπάρκειά του, αποτέλεσαν εμπόδιο για την εμπορική του εκμετάλλευση, για αυτό και έχουν αναπτυχθεί τεχνικές καλλιέργειας, ώστε να καλυφθούν οι αυξανόμενες απαιτήσεις της διεθνούς αγοράς. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 2008, η παγκόσμια παραγωγή του *G. lucidum* κυμαίνονταν περίπου στους 9500 τόνους, εκ των οποίων οι 6000 παρήχθησαν στην Κίνα (Sanodiya κ.α., 2009).

#### 1.4.1.3. Εμπορική αξιοποίηση του *G. lucidum*

Στις μέρες μας πολλοί είναι εκείνοι που ψάχνουν εναλλακτικούς τρόπους επίλυσης διαφόρων παθήσεων και βελτίωσης της ποιότητας ζωής τους, δεδομένου ότι ο σύγχρονος τρόπος ζωής, το άγχος και η πίεση της σύγχρονης κοινωνίας επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος, κάτι που είναι σημαντικό, κυρίως σε άρρωστα άτομα και στις ευπαθείς ομάδες, καθότι τα άτομα αυτά είναι πιο επιρρεπή σε λοιμώξεις και ασθένειες, λόγω του εξασθενημένου ανοσοποιητικού συστήματος τους. Αν και η τεχνολογία έφερε πολλά οφέλη και διευκόλυνε τους ανθρώπους, η επιθυμία για εύρεση φυσικών και οργανικών συστατικών επανάφερε την χρήση φυσικών προϊόντων, όπως βοτάνων και φαρμακευτικών μανιταριών. Το *G. lucidum* είναι ισχυρός φαρμακευτικός μύκητας και του έχουν αποδώσει ιδιότητες που συχνά σχετίζονται με την υγεία, την επούλωση, την αύξηση του προσδόκιμου ζωής (μακροζωία), τη γνώση και την ευτυχία (Sanodiya κ.α., 2009), καλύπτοντας κάθε φαρμακευτική πτυχή που έχει ανάγκη ο άνθρωπος (Deeralakshmi και Mirunalini, 2011). Παρόλο που είναι μανιτάρι, αρκετοί είναι εκείνοι που συγχέουν τη φύση του θεωρώντας το βότανο (Russell και Paterson, 2006).

Στο εμπόριο διατίθεται ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων υπό το όνομα Ling Zhi ή Reishi. Τα προϊόντα αυτά μπορεί να είναι: ποτά υγείας, σούπες, σιρόπια, τσάι, δισκία, κάψουλες, βάμμα, σκόνες (φαρμακευτικές σκόνες με μέλι), συμπληρώματα διατροφής, εκχυλίσματα μυκηλίου ή καρποσωμάτων, καθώς και σκευάσματα σχετικά με ενδο/εξω-κυτταρικούς πολυσακχαρίτες, αλλά και σπόροι (Sanodiya κ.α., 2009; Deeralakshmi και Mirunalini, 2011). Η εμπορική αξία

Χώρα	U.S.\$ million
Ταϊβάν	215
Κίνα	350
Κορέα	600
Ιαπωνία	300
Μαλαισία	91,2
Χονγκ Κόνγκ	60
Σιγκαπούρη	2,2
Άλλες	10

**Πίνακας I.7** Εκτίμηση εμπορικής αξίας των προϊόντων του *G. lucidum* ανά χώρα (Chang και Miles, 2004)

των φυσικών προϊόντων παρασκευασμένων με *Ganoderma* είναι μεγάλη. Η φαρμακευτική, διατροφική χρήση των προϊόντων *G. lucidum* αλλά και η χρήση τους ως συμπλήρωμα διατροφής ήδη από το 1995 έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της τιμής των προϊόντων *G. lucidum* που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ο οποίος απεικονίζει την αξία τους ανά χώρα. Η παγκόσμια συνολική αξία των προϊόντων αυτών υπολογίζεται στα 1628,4 εκατομμύρια δολάρια (U.S.) (Chang και Miles, 2004).

#### I.4.1.4 Διασφάλιση ποιότητας προϊόντων *G. lucidum*

Όπως για κάθε εμπορικό προϊόν που προορίζεται για κατανάλωση, η διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας είναι υψίστης σημασίας. Το πρόβλημα με τα προϊόντα *G. lucidum* είναι η μεγάλη ποικιλία και η έλλειψη συγκεκριμένου πρωτοκόλλου που να εγγυάται την επαναπαραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας, με αποτέλεσμα η δημόσια εικόνα τους να μην είναι πολύ αξιόπιστη. Ως εκ τούτου προέκυψε η ανάγκη για βελτίωση του ποιοτικού ελέγχου, ώστε να ανακτηθεί η αξιοπιστία των προϊόντων από τους καταναλωτές και να διαμορφωθούν πρότυπα παρασκευής και ελέγχου από τις αρμόδιες αρχές. Παρακάτω παρατίθενται πέντε οδηγίες που αποτελούν πρωτόκολλο παρασκευής ποιοτικών προϊόντων (Chang και Miles, 2004).

GLP (Good Laboratory Practice): χρήση γνωστού στελέχους μανιταριού.

GAP (Good Agriculture Practice): οι καλλιεργητικές συνθήκες να είναι γνωστές. Το υπόστρωμα να μη περιέχει βαρέα μέταλλα και τα επίπεδα των συστατικών να είναι σταθερά. Το νερό να μη αποτελεί μολυσματικό μέσο. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες θα πρέπει να περιλαμβάνουν μη ρυπογόνο αέρα, χώρο ανάπτυξης στον οποίο τηρούνται οι υγειονομικοί κανόνες οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας για την ανάπτυξη και ανζαπαραγωγής του στελέχους. Η λήψη καρποσώματος γίνεται στο στάδιο ωριμότητας και όταν το καρπόσωμα δε φέρει μούχλα και έντομα.

GMP (Good Manufacturing Practice): γνώση και τήρηση των παραμέτρων της διαδικασίας. Διαρκής έλεγχος της θερμοκρασίας, του χρόνου και του ποσοστού των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση.

GPP (Good Production Practice): πραγματοποίηση δοκιμασιών που αφορούν, την δοσολογία και την απόδοση της σε συγκριμένα προβλήματα υγείας, την χημική ανάλυση του προϊόντος για τον καθορισμό των οργανικών συστατικών του και το περιεχόμενό του σε βαρέα μέταλλα, τον καθορισμό μικροβιακού φορτίου προκειμένου να αναλυθεί αν ο τύπος και τα επίπεδα είναι εντός ορίων ασφαλείας, την δημιουργία φόρμουλας παρασκευής.

GCP (Good Clinical Practice): διεξαγωγή υψηλής ποιότητας κλινικών δοκιμών από εξειδικευμένο προσωπικό που να περιλαμβάνουν και <<τυφλά>> εις διπλούν.

## I.5. Μηχανισμοί δράσης των βιοδραστικών ενώσεων των μανιταριών *Ganoderma spp*

Πολλές είναι οι ουσίες που περιέχονται στα μανιτάρια *Ganoderma spp.* και κυρίως στο *Ganoderma lucidum*, οι οποίες έχουν ανοσοτροποποιητική δράση. Οι πολυσακχαρίτες, η β-D-γλυκάνη, τα τριτερπενοειδή και οι πρωτεΐνες, όπως η Ling Zhi-8 είναι μερικές από τις δραστικές ενώσεις που παρατίθενται στην Παράγραφο I.4.1.2.

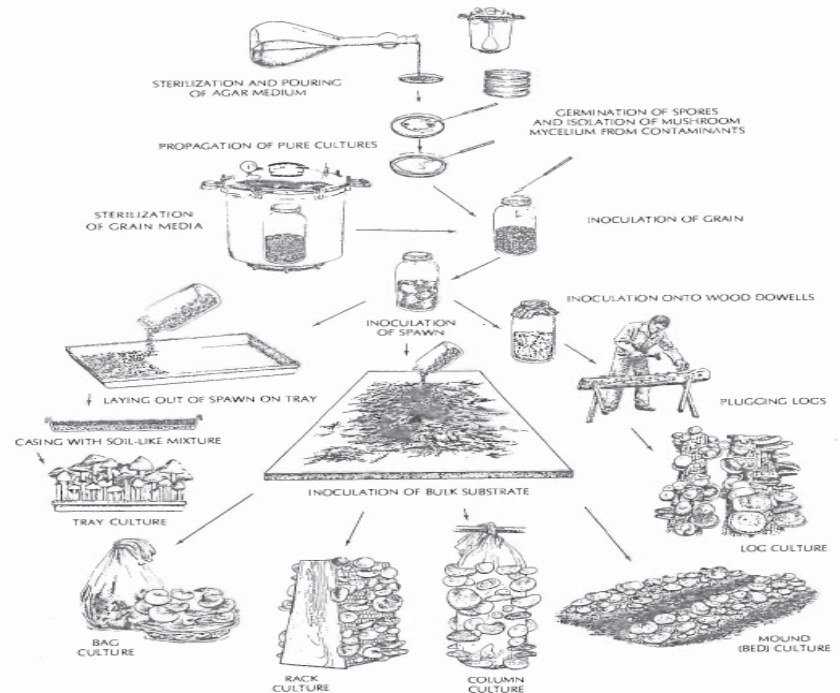
Στον Πίνακα I.8 καταγράφονται οι ιδιότητες, οι μηχανισμοί βιοδραστικών ενώσεων και τα εκχυλίσματα *G. lucidum*, καθώς επίσης και η εκτίμηση της επίδρασής τους σε ανθρώπινο πληθυσμό ή σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

**Πίνακας 1.8.:** Οι ιδιότητες, οι μηχανισμοί βιοδραστικών ενώσεων και τα εκχυλίσματα *G. lucidum* και η εκτίμηση της επίδρασής τους σε ανθρώπινο πληθυσμό ή σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Roupas κ.α., 2012)

Επίδραση/ κατάσταση ασθένειας	Βιοενεργά ή εκχυλίσματα	Μηχανισμός (in vitro / in vivo)
Αντι-καρκινική (μαστού)	Πολυσακχαροπεπτίδια	1)Απόπτωση (ανθρώπινες κυτταρικές σειρές) 2)Καταστολή οξειδωτικού στρες που διεγείρεται από φωσφορυλίωση των ERK1 /2, συμβάλλοντας στην ρύθμιση της έκφρασης των cfos και στην αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF-κB
Αντι-καρκινική (παχέος εντέρου)	Απροσδιόριστα βιοενεργά / Εκχύλισμα	1)Απόπτωση (που προκαλείται από την αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης-3) 2)Αντιφλεγμονώδη λειτουργίας σε HT-29 κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος (όχι τοξικότητα σε κύτταρα HT-29 σε δόσεις <10 mg / ml) (In vivo)
Αντι-καρκινική (τραχήλου της μήτρας, ωοθηκών, ενδομητρίου)	Lingzi	Αντι-πολλαπλασιαστική δράση μέσω επαγωγής της απόπτωσης
Αντι-καρκινική (προστάτη)	Εκχύλισμα αιθανόλης ολόκληρων μανιταριών	Δόση 6 mg εκχυλίσματος/ημέρα βελτιώνει το IPSS των ανδρών που αυτοί εμφανίζουν στο κατώτερο ουροποιητικό σύστημα μέσω ισχυρής ανασταλτική δραστηριότητας της 5-άλφα-αναγωγάσης (in vivo)
	Απροσδιόριστα βιοενεργά , Εκχύλισμα	1)Αναστολή πολλαπλασιασμού και επαγωγή απόπτωση σε ανθρώπινα PC-3 καρκινικά κύτταρα προστάτη 2)Αναστολή καρκίνου προστάτη αγγειογενετικά εξαρτώμενου διαφοροποίησης της MAPK και AKT σηματοδότησης
Ηπατίτιδα Β	Ganopoly	1)Υπογλυκαιμική δράση 2)Αντι-ική 3)Πιθανόν ηπατο-προστατευτική επίδραση σε χρόνια ηπατίτιδα Β (in vivo). Για να είναι σημείωσε: συγγραφείς αναφέρεται παρά φαρμακολογικές δράσεις, κλινική απόδειξη λείπει.
Αντι-καρκινική (συκώτι)	Τριτερπενοειδή	Αναστολή πολλαπλασιασμού των HepG2 ανθρώπινων ηπατο-καρκινικών κυττάρων
Αντι-καρκινική (πνεύμονα)	Lucialdehydes A-C	Κυτταροτοξικότητα κατά ποντικίσιων και ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (in vivo)
Βλάβη στο DNA	Κρύα και θερμά υδατικά εκχυλίσματα, 20 °C και 100 °C αντίστοιχα	Προστασία από H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του κυτταρικού DNA (in vitro)
	1)Υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες 2) Θερμό υδατικό εκχύλισμα	Προστασίας κατά του επαγόμενου από την υδροξυλική ρίζα σπασίματος του κλώνου DNA
	Εκχύλισμα πρωτεϊνικό και πολυσακχαριτών	Ισχυρή προστατευτική επίδραση έναντι του οξειδωτικού στρες ενδεχομένως λόγω Se ρόλου στην αύξηση της αντιοξειδωτικό δραστηριότητας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Προστασία του DNA από υδροξυλική ρίζα και οξειδωτική βλάβη
Υγεία οστών	Εκχυλίσματα αιθανόλης	Βελτίωση της οστικής πυκνότητας σε αρουραίους
Επούλωση των πληγών	Κλάσμα πολυσακχαριτών	Ενεργό συστατικό με επουλωτική ιδιότητα σε επαγόμενα από οξικό οξύ έλκη σε αρουραίους (In vivo)

## I.6. Καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή μανιταριών *G. lucidum*

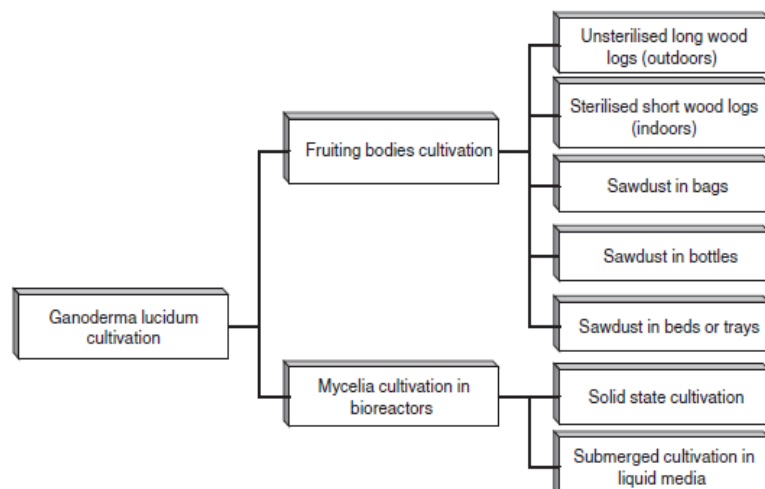
Ο πιο παραδοσιακός τρόπος απόκτησης μανιταριών, είναι η συλλογή τους από τη φύση, από γνώστες των ποικιλιών (Chang και Miles, 2004). Αυτό όμως δεν είναι πάντοτε εφικτό. Η δυσκολία συλλογής τους από τη φύση και η ανάγκη για αυξημένη παραγωγή λόγω της αυξημένης ζήτησης των μανιταριών οδήγησαν στην ανάπτυξη μεθόδων παραγωγής. Οι καλλιεργητικές τεχνικές που μπορούν να εφαρμοστούν είναι πολλές. Κάποιες από αυτές είναι απλές και ανέξοδες ενώ άλλες είναι περίπλοκες και ακριβές (Chang και Miles, 2004). Στην Εικόνα I.27 παρατίθεται διάγραμμα επισκόπησης όπου παρουσιάζονται διάφοροι κλασικοί τρόποι καλλιέργειας μανιταριών σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας.



**Εικόνα I.27.:** Διάγραμμα επισκόπησης των γενικών τεχνικών καλλιέργειας των μανιταριών (Stametes και Chilton, 1983)

Στην Εικόνα I.28 απεικονίζονται σύγχρονες καλλιεργητικές τεχνικές για την παραγωγή μανιταριών *Ganoderma* (συγκεκριμένα του *G. lucidum*), σε στερεή και υγρή ζύμωση.

**Εικόνα I.28.:** Οι κύριες παλαιές και σύγχρονες μέθοδοι καλλιέργειας για την παραγωγή καρποσωμάτων και μυκηλίων του μανιταριού *G. lucidum* (Boh κ.α., 2007)





Εδώ και πολλές δεκαετίες γίνεται με επιτυχία η καλλιέργεια του *G. lucidum*, κυρίως στην Κίνα, σε κορμούς ξύλου και σε σακούλες γεμάτες με πριονίδι και ροκανίδι ξύλου ή άλλα γεωργικά υπολείμματα (τέτοιου είδους καλλιέργειες παρέχουν τα σύγχρονα καρποσώματα). Πλέον όμως έχουν αναπτυχθεί, σε μικρές και πιλοτικές μονάδες παραγωγής, και βιοτεχνολογικές καλλιεργητικές τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούν στερεά υποστρώματα ή βυθισμένα υγρά καλλιεργητικά υποστρώματα σε βιοαντιδραστήρες. Με την βιοτεχνολογική αυτή τεχνική δίνεται η δυνατότητα για παραγωγή καρποσωμάτων και μυκηλίων αντίστοιχα, αλλά και πολλών χρήσιμων μεταβολικών προϊόντων. Η καλλιεργητική τεχνική που ακολουθείται εξαρτάται κάθε φορά από το προς απομόνωση συστατικό, διότι διαφορετικές ομάδες χημικών ενώσεων με φαρμακευτική δράση απομονώνονται από το μυκήλιο και διαφορετικές από το καρπόσωμα των διαφόρων ειδών *Ganoderma*. Τέτοια συστατική μπορεί να είναι: τριτερπένια, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, νουκλεοζίδια, αλκαλοειδή, στεροειδή, λακτόνες, λιπαρά οξέα και ένζυμα, με τα πιο σημαντικά ενεργά συστατικά να είναι τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες. Η ποιότητα και η σύσταση των φυσιολογικά δραστικών ουσιών ποικίλουν από στέλεχος σε στέλεχος και εξαρτάται από την τοποθεσία, τις συνθήκες καλλιέργειας, το αναπτυξιακό στάδιο του μύκητα, την διαδικασία επεξεργασίας κλπ. (Boh κ.α., 2007).

Γενικά, ισχύει ότι ανάλογα με το σκοπό της καλλιέργειας μεταβάλλεται και η μεθοδολογία της καλλιεργητικής τεχνικής, αφού οι συνθήκες που ευνοούν την μεγιστοποίηση παραγωγής βιομάζας μπορεί να μη βελτιστοποιούν τη παραγωγή των διαφόρων μεταβολιτών (πολυσακχαρίτες και γανοδερικά οξέα κ.α.).

### 1.6.1. Ζυμώσεις Στερεάς Κατάστασης (Solid State Fermentation-SSF)

Για παραγωγή καρποσώματος *G. lucidum* χρησιμοποιείται πριονίδι σε σακούλες ή μπουκάλια ή η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε φυσικούς κορμούς. Και οι δύο καλλιεργητικές τεχνικές εξαρτώνται από τους ίδιους βασικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία, την υγρασία και το οξυγόνο, με την μυκηλιακή ανάπτυξη να μην χρειάζεται κατ' ανάγκη φως (Boh κ.α., 2007):

Οι θερμοκρασίες στις οποίες αναπτύσσονται τα μυκήλια κυμαίνονται από 10 °C έως 38 °C, με τη βέλτιστη θερμοκρασία επώασης μυκηλίου να είναι οι 25-32 °C.

Η βέλτιστη περιεκτικότητα σε υγρασία του υποστρώματος των σάκων είναι 65-70% ενώ στην περίπτωση των κορμών περίπου 40%.

Βέλτιστο pH θεωρείται αυτό που κυμαίνεται μεταξύ 4,2-5,3.

Η παρουσία του οξυγόνου είναι απαραίτητη για την μυκηλιακή ανάπτυξη, η οποία τελείται υπό αυστηρή αεροβίωση.

Στο επόμενο στάδιο της καλλιέργειας των σχηματιζόμενων καταβολών, τα καρποσώματα του *G. lucidum* αναπτύσσονται σε 20-34 °C, με την βέλτιστη θερμοκρασία να είναι μεταξύ 27-30 °C. Η υγρασία του χώρου όπου λαμβάνει χώρα κυμαίνεται αναλόγως του αναπτυξιακού σταδίου (Boh κ.α., 2007), αφού:

κατά τη διάρκεια της επαγωγής των καταβολών θα πρέπει περίπου στο 90%.

κατά τον σχηματισμό του καπακιού να διατηρείται στο 70-80%.

και στο τελικό στάδιο της ανάπτυξης του καρποσώματος στο 30-40%.

Επιπλέον, κατά το σχηματισμό καταβολών και την ανάπτυξη καρποσώματος απαιτείται φως 50-450 lux και από τη στιγμή που σχηματιστεί το καπάκι, ο χώρος καλλιέργειας πρέπει να αερίζεται καλά. Όμως εκτός από τους παραπάνω παράγοντες εξίσου σημαντική είναι η διαμόρφωση του υποστρώματος. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία: 1) σκληρά ξύλα, ξυλώδη ιστοί, όπως το πριονίδι, αποτελούν φυσικό υπόστρωμα 2) η θειαμίνη που περιέχεται στο φρέσκο, μη επεξεργασμένο χοντρό πίτουρο απαιτείται για το σχηματισμό μανιταριού 3) η μικρή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (1% σακχαρόζη) εκκινεί το σχηματισμό λιγνίνο-αποσυνθετικών ενζύμων 4) το ασβέστιο

φαίνεται να βοηθά τη διαφοροποίηση του μανιταριού 5) το νερό σε κορμούς, όταν αυτοί είναι υπόστρωμα, αποτρέπει την εναλλαγή του αέρα, διακόπτοντας την παροχή οξυγόνου 6) πριονίδια πάρα πολύ λεπτά, παρεμποδίζουν τη σωστή ανταλλαγή αέρα, ενώ αν τα πριονίδια είναι τραχιά υπάρχει πιθανότητα αυτά να τρυπήσουν την σακούλα και να υπάρξει μόλυνση (Boh κ.α., 2007).

#### 1.6.1.1. Καλλιέργεια καρποσωμάτων σε φυσικούς κορμούς ξύλου

Καλλιέργεια *Ganoderma* spp σε μεγάλους μη αποστειρωμένους κορμούς: Παλιότερα στην Κίνα, χρησιμοποιούνταν κορμοί δέντρου 1 μέτρου χωρίς αποστείρωση κατά την καλλιέργεια *Ganoderma* spp. Η καλλιέργεια ήταν πολύ κοπιαστική και απαιτούνταν μεγάλη περίοδος επώασης (2-3 ετών), προκειμένου να ληφθούν ώριμα καρποσώματα (Boh κ.α., 2007; Chen, 2002).

Καλλιέργεια *Ganoderma* spp σε μικρούς μήκους αποστειρωμένους κορμούς: Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, στην Κίνα, στην Ιαπωνία, στις Ηνωμένες Πολιτείες και οπουδήποτε αλλού. Τότε ως καινοτομία θεωρήθηκε η υψηλή απόδοση σε συντομότερο χρόνο καλλιέργειας, αφού με την τεχνική αυτή χρειάζεται μόνο 4-5 μήνες για να επωαστεί το μυκήλιο και καρπόσωμα μπορεί να είναι ληφθεί εντός του ίδιου έτους. Τα βασικά στάδια της καλλιεργητικής αυτής τεχνικής είναι τα εξής (Boh κ.α., 2007; Chen, 2002):

- Προετοιμασία των κορμών ξύλου. Τα περισσότερα σκληρά ξύλα που προέρχονται από πλατύφυλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, η διαστάσεις των οποίων είναι διάμετρος 15cm και 15-24 cm μήκος, ενώ η κοπή τους γίνεται την εποχή που βρίσκονται σε λήθαργο, δηλαδή την εποχή πριν από το σχηματισμό των νέων μπουμπουκιών, όσο ακόμα οι κορμοί δέντρων είναι γεμάτοι σφρίγος και τα θρεπτικά συστατικά δεν έχουν καταναλωθεί για τη βλάστηση των οφθαλμών και 15-20 μέρες πριν τη σπορά. Στο διάστημα που μεσολαβεί μέχρι τη σπορά οι κορμοί στεγνώνουν σε ένα καθαρό και καλά αεριζόμενο χώρο.
- Κλείσιμο κορμών σε θερμοανθεκτικούς σάκους πολυπροπυλενίου ή πολυαιθυλενίου που φέρουν <<παράθυρα>> μικροφιλτραρίσματος και αποστείρωση υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (1,5 kg/cm<sup>2</sup>) για 1,5 ώρα ή σε κανονική πίεση του αέρα στους 100 °C για 10 ώρες. Η ανταλλαγή του αέρα σε αυτές τις σακούλες ρυθμίζεται από το μέγεθος, το σχήμα, τον αριθμό, τη τοποθεσία και τη φύση του μικροφίλτρου σε κάθε σάκο, αλλά και από τον αέρα που καταλαμβάνεται στο χώρο πάνω από το προς αποικισμό υπόστρωμα του κλειστού σάκου.
- Σπορά. Σπόροι όπως αυτοί της καθαρής καλλιέργειας υγρού μυκηλίου, σιταριού και πριονιδίου-πίτουρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ενώ συνίσταται εμβολιασμός να γίνεται με 5-10g σπόρου/κορμό.
- Επαγωγή σπόρου σε σκοτάδι και λιγότερο οξυγόνο. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται ώστε διασφαλισθεί ο σωστός αποικισμός του μυκηλίου εντός του κορμού. Έλλειψη οξυγόνου ή κακός αερισμός, λόγω νοτισμένου κορμού επιφέρει κακή ανάπτυξη του μυκηλίου και αργό ρυθμό ανάπτυξης.
- Αφύπνιση καταβολών. Οι καταβολές των *Ganoderma* spp. συνήθως σχηματίζονται 50-60 ημέρες μετά την σπορά. Η σύντομη διάρκειας έκθεση τους σε πολύ λίγο φως ενεργοποιεί τις καταβολές. Επιπρόσθετα ο σχηματισμός καταβολών ευνοείται από το οξυγόνο.
- Ενσωμάτωση στο έδαφος. Οι αποικισμένοι κορμοί ενσωματώνονται αμέσως, κάθετα στο έδαφος, μετά τον σχηματισμό των καταβολών, όντας οι καταβολές πάνω από το επίπεδο του εδάφους. Για να διατηρηθεί η υγρασία, το χώμα καλύπτεται με ψιλοκομμένο άχυρο.
- Διατήρηση κατάλληλων παραμέτρων ανάπτυξης. Για την αφύπνιση των καταβολών απαιτείται υψηλή υγρασία, κατά προτίμηση 90-95%, ενώ κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του πύλου στην καρποφορία, απαιτείται αύξηση του αερισμού για να μειωθεί το επίπεδο του εκπεμπόμενου CO<sub>2</sub> ,το οποίο συσσωρεύτηκε λόγω της απότομης αύξησης της αναπνοής κατά την καρποφορία των *Ganoderma* spp. Η διαφοροποίηση των

*Ganoderma* spp. κατά την καρποφορία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη συγκέντρωση του CO<sub>2</sub>: 1) με [CO<sub>2</sub>] > 0,1% διαμορφώνεται καρπόσωμα σχήματος ελαφόκερων 2) με [CO<sub>2</sub>] < 0,1% διαμορφώνεται καρπόσωμα καλοσχηματισμένου πύλου 3) με 0,04 < [CO<sub>2</sub>] < 0,05%, προσεγγίζεται η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> του φρέσκου αέρα (0,03%), διαμορφώνεται καρπόσωμα σχήματος πρέπει να διατηρηθεί για την παραγωγή πιλοειδής μανιτάρια (μανιταριών με καπάκια).

- Συγκομιδή μανιταριών. Εικοσιπέντε ημέρες περίπου διαρκεί το πέρασμα από το σχηματισμό των καταβολών, στη συγκομιδή των καρποσωμάτων. Η εξαφάνιση του αδιαφοροποίητου λευκού στην άκρη του καρποσώματος υποδεικνύεται την ωριμότητά του. Η καλλιέργεια συνεχίζεται με μειωμένη ατμοσφαιρική υγρασία (60-85%) για επιπλέον 7-10 ημέρες, κάτι που βοηθάει την περαιτέρω ανάπτυξη του ελάσματος σε πάχος και της σταθερότητας του. Συγκομιδή γίνεται με κοπή του στίπου (κοτσάνι) με τρόπο που μόνο 2 εκατοστά του στίπου να παραμένουν με τον πύλο.
- Μετασυλλεκτικός χειρισμός, ο οποίος περιλαμβάνει άμεση ξήρανση κάτω από τον ήλιο ή με θερμότητα (60 °C) για 2-3 ημέρες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στον τρόπο ξήρανσης, δεδομένου ότι αν είναι ακατάλληλος, θα μειωθεί η ποιότητα του προϊόντος είτε λόγω επιμόλυνσης με μούχλα είτε λόγω αλλαγής του χρώματος της κάτω επιφάνειας των πόρων σε σκούρο-καφέ.

#### 1.6.1.2. Καλλιέργεια καρποσωμάτων με πριονίδι ως υπόστρωμα

Με πριονίδι ως υπόστρωμα σε αποστειρωμένους σάκους (Boh κ.α., 2007):

Αρκετά συχνά κατά την καλλιέργεια *G. lucidum* σε θερμοανθεκτικές φιάλες ή σάκους από πολυπροπυλένιο γίνεται συμπλήρωση με πριονίδι. Στα πριονίδια σκληρού ξύλου συνήθως προστίθεται πίτουρο ρυζιού (10%) και CaCO<sub>3</sub> (3%), το μίγμα υγραίνεται με νερό και με αυτό (700 g) πληρώνονται πλαστικές σακούλες. Επάνω σε κάθε σάκο τοποθετείται πλαστικό κολάρο και κλείνεται με ένα βύσμα από βαμβάκι. Το υπόστρωμα αφού πρώτα υποστεί θερμική επεξεργασία 5 ωρών στους 95-100 °C, αφήνεται να ψυχθεί όλη τη νύχτα και μετά εμβολιάζεται. Το εμβολιασμένο υπόστρωμα επωάζεται για 3-4 εβδομάδες ή μέχρι ο σπόρος να αποικίσει πλήρως το υπόστρωμα. Η παραγωγή μανιταριών ξεκινά με τη διατήρηση της θερμοκρασίας του αέρα στους 28 °C περίπου και τη σχετική υγρασία στο 85-90% περίπου. Τα βασιδιόκαρπια αρχίζουν να εμφανίζονται σε περίπου 1-2 εβδομάδες μετά την έναρξη της διαδικασίας. Περίπου 2-3 μήνες μετά την εμφάνιση των καταβολών, τα μανιτάρια είναι έτοιμα για συγκομιδή. Ένα μανιτάρι θεωρείται ώριμο όταν το λευκό χρώμα γύρω από την άκρη του βασιδιοκάρπου μετατραπεί σε κόκκινο. Το υπόστρωμα μπορεί να δώσει και άλλο κύκλο συγκομιδής μανιταριών, μετά την απομάκρυνση της πρώτης.

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο μπορεί να διαμορφωθεί υπόστρωμα καλλιέργειας *G. lucidum* περιλαμβάνει την ακόλουθη σύσταση: 80% πριονίδι από δρυ, 18% νωπό μη επεξεργασμένο χοντρό πίτουρο σιταριού, προσθήκη 1% σακχαρόζης, 1%, ανθρακικό ασβέστιο (ή θειικό ασβέστιο) και περίπου 67-70% νερό. Ο συγκεκριμένος τρόπος διαμόρφωσης υποστρώματος έχει χρησιμοποιηθεί για μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες, στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά με επιτυχία.

Ακόμα, έχουν χρησιμοποιηθεί φλοιοί σπόρων ηλίανθου ως κύριο θρεπτικό συστατικό κατά την καλλιέργεια του *G. lucidum* σε σάκους. Η χρήση του συγκεκριμένου μέσου αποτέλεσε κύρια πηγή ενέργειας και θρέψης, ενώ η προσθήκη 5% βύνης στο υπόστρωμα βελτίωσε τον ρυθμό ανάπτυξης του μανιταριού.

Για τη καλλιέργεια μανιταριού *G. lucidum* με SSF, έχουν δοκιμαστεί και άλλα υποστρώματα, εκτός από τα παραπάνω. Μερικά από αυτά είναι τα εξής (Boh κ.α., 2007; Sanodiya κ.α., 2009):



- πριονίδι οξιάς, ελαιόλαδο,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- υπολείμματα σιτηρών, κόκκους ρυζιού και συμπλήρωσαν με πίτουρο σιταριού, πριονίδι (σε διαφορετικές αναλογίες) και  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  και  $\text{CaCO}_3$ .
- κατάλοιπα σόγιας από τα απόβλητα διαδικασίας παραγωγής τόφου με πλαστικές σακούλες πολυπροπυλενίου, με αναλογίες C/N 70 και 80, προκειμένου να αναπτυχθούν πλήρως τα καρποσώματα.
- γεωργικά και δασοκομικά απόβλητα όπως πριονίδι και ξύλο μεμονωμένα και σε συνδυασμό με πίτουρο ρυζιού, πίτουρο σιταριού κτλ, ακόμα και κατάλοιπα τσαγιού.

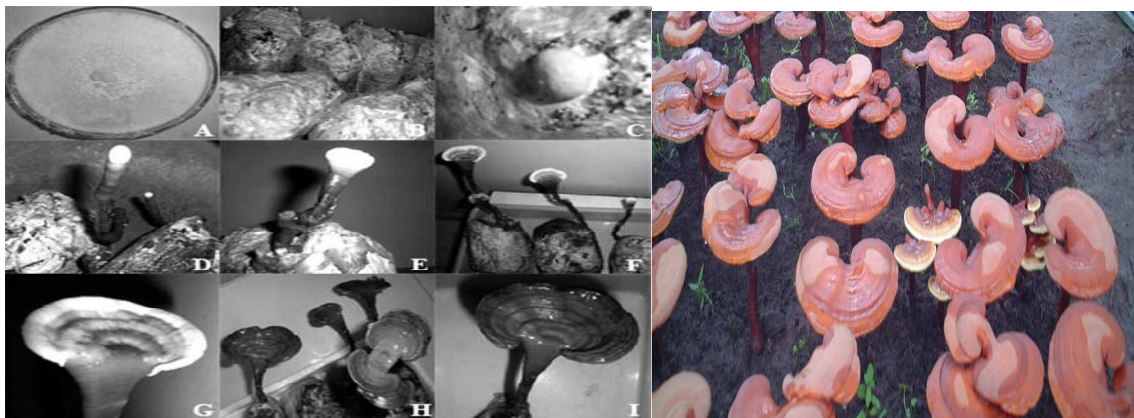
Πριονίδι ως υπόστρωμα σε φιάλες και δοχεία (Boh κ.α., 2007): με αυτόν τον τρόπο καλλιέργειας έχει παρασκευαστεί υπόστρωμα με ανάμιξη πριονιδιού δρυός και πίτουρο σιταριού (8:2, ο/ο), ενώ το νερό που προστέθηκε ήταν το 65% του συνολικού όγκου. Η θερμοκρασία του χώρου καλλιέργειας διατηρήθηκε στους 28-31 °C και η σχετική υγρασία στο 85% μέχρι το σχηματισμό των καταβολών. Ο αερισμός πραγματοποιούνταν μία ή δύο φορές για 10-20 λεπτά, ενώ μετά



**Εικόνα I.29.:** Μυκηλιακή ανάπτυξη του *G. lucidum* για τα διάφορα υλικά όπως (Α) σκόνη καλαμποκιού (Β) κόκκοι ρυζιού, (Γ) σπόροι σόργου και (Δ) ροκανίδια μετά από 5 ημέρες επώασης (Magday, 2014)

τον σχηματισμό του πύλου 5-6 φορές /ημέρα. Η σχετική υγρασία ελέγχονταν προκειμένου να διατηρείται στο 80-85%. Ακόμα, αξίζει να ειπωθεί ότι στην Ιαπωνία κατά καιρούς έχουν γίνει προσπάθειες για ανάπτυξη καινοτόμων καλλιεργητικών μία εκ των οποίων περιλάμβανε καλλιέργεια σε μπουκάλι, υπό αρνητική τάση προς το σώμα του δοχείου για την ενεργοποίηση και την παραγωγή μανιταριών άριστης ποιότητας σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Πριονίδι ως υπόστρωμα σε ράφια (Boh κ.α., 2007): η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στη Βόρεια Αμερική. Το υπόστρωμα που φτιάχνεται έχει 12 εκατοστά βάθος, αποτελείται από ροκανίδια στα οποία συμπληρώνεται πριονίδι. Το μίγμα απλώνεται ομοιόμορφα πάνω στους δίσκους ή κρεβάτια, όπου και θα γίνει η καλλιέργεια. Μετά ακολουθεί σπορά πάχους 0,5 cm ή περισσότερο, υπό συνθήκες άπνοιας ενώ όλη η επιφάνεια καλύπτεται με πλαστικό. Μετά από 3-5



**Εικόνα I.30.:** (αριστερά) Διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του *Ganoderma lucidum* κατά την τεχνητή καλλιέργεια (Sanodiya κ.α., 2009) Α) Πλάκα Καλλιέργειας (PDA) Β) Αποικισμός μυκηλίου σε στερεό υπόστρωμα Γ) Σχηματισμός καταβολών Δ) Επιμήκυνση καταβολών Ε) Σχηματισμός πύλου F) Ανάπτυξη πύλου G) Πάχυνση πύλου Η, Ι) Ωρίμανση του καρποσώματος. (δεξιά) Καλλιέργεια σε επιδαπέδια ράφια (Chang, 2004)

ημέρες, γίνεται ορατό στρώμα μυκηλίων λευκού χρώματος το οποίο αρχίζει να διεισδύει στο υπόστρωμα. Μετά Όταν μετά από 1-2 μήνες σχηματίζονται καταβολές, το πλαστικό φύλλο κάλυψης αφαιρείται. Στο χώρο καλλιέργειας η σχετική υγρασία στο 85-95% και η θερμοκρασία στους 25 °C. Όσο αφορά στον εξαερισμό, η κυκλοφορία του αέρα γίνεται 3-5 φορές/ημέρα για 5-10 λεπτά κάθε φορά.

### 1.6.1.3. Καλλιέργεια μυκηλίου με βιοαντιδραστήρα σε ζύμωση στερεάς κατάστασης

Η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε στη Σλοβενία κατά την οποία η ανάπτυξη του *G. lucidum* έλαβε χώρα σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης σε οριζόντιο αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα. Με στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας, πριονίδια οξιάς, η ανάπτυξη των μυκήτων έγινε σε στείρες συνθήκες υπό συνεχή παρακολούθηση. Με τον τρόπο αυτό είναι εφικτή η παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας από την οποία θα προκύψουν φαρμακευτικά προϊόντα, ενώ η ίδια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα στερεό εμβόλιο για επόμενο καλλιεργητικό κύκλο *G. lucidum* (Boh κ.α., 2007).

### 1.6.2. Υγρές καλλιέργειες - Ζυμοτήρες

Στην περίπτωση του *G. lucidum* είθισται οι πολυσακχαρίτες και τα γανοδερικά οξέα να είναι οι κατεξοχήν προς απομόνωση μεταβολίτες των καρποσωμάτων σε καλλιέργειες στερεάς κατάστασης. Όμως καλλιέργειες τέτοιου τύπου είναι χρονοβόρες και οι διαδικασίες ποιοτικά μεταβαλλόμενες. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν καλλιεργητικές τεχνικές όπως αυτή της βυθισμένης καλλιέργειας, ως μια εναλλακτική και αποτελεσματική προσέγγιση για τη παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικών οξέων. Η τεχνική αυτή δε περιορίζεται μόνο στη καλλιέργεια του μανιταριού *G. lucidum*, αλλά έχει βρει εφαρμογή και σε άλλα είδη μακρομυκήτων (Sanodiya κ.α., 2009). Οι λόγοι που κάνουν την βυθισμένη καλλιέργεια να υπερτερεί έναντι της στερεάς, είναι: η μεγάλη παραγωγικότητα, το χαμηλό κόστος, η ευκολία ελέγχου της ζύμωσης και η εύκολη διαδικασία χειρισμού. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για την παραγωγή καρποσώματος απαιτούνται τουλάχιστον 3-5 μήνες, ενώ για τη λήψη μια αξιοσημείωτης ποσότητας μυκηλίου απαιτούνται μόλις 2-3 εβδομάδες (Kim κ.α., 2002; Sanodiya κ.α., 2009).

Οι υγρές καλλιέργειες βυθισμένου τύπου έχουν βρει εφαρμογή συνήθως σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, όπου ο όγκος καλλιέργειας είναι περιορισμένος και συγκριτικά μικρότερος σε σχέση με αυτή /που κατέχουν οι βιοαντιδραστήρες. Στην περίπτωση καλλιέργειας *G. lucidum* έχει χρησιμοποιηθεί όγκος  $\leq 10$  l, ενώ έχει πραγματοποιηθεί καλλιέργεια *G. tsugae* σε δεξαμενές με όγκο 20 m<sup>3</sup>. Το πλεονέκτημα της χρήσης βιοαντιδραστήρα είναι η μεγαλύτερη ευκολία ελέγχου των περιβαλλοντικών συνθηκών ανάπτυξης όπως η θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο και pH (Sanodiya κ.α., 2009). Ο σκοπός για τον οποίο θα λάβει χώρα μια υγρή καλλιέργεια βυθισμένου τύπου ποικίλει. Μια τέτοια διαδικασία άλλοτε μπορεί να αποσκοπεί για λήψη βιομάζας, άλλοτε στη λήψη εξωπολυσακχαριτών (EPS)/ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και άλλοτε για λήψη γανοδερικών οξέων. Σε κάθε περίπτωση οι συνθήκες καλλιέργειας προσαρμόζονται, διότι διαφορετικές είναι οι συνθήκες βελτιστοποίησης της βιομάζας, των EPS/IPS και των γανοδερικών οξέων.

Η υγρή καλλιέργεια του *G. lucidum* αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας για τους Tang και Zhong (2002) οι οποίοι ανέφεραν παραγωγή μέγιστης βιομάζας ~22 g/l σε υπό ανάδευση φιάλες και σε καλλιέργειες που έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρα, ενώ όταν το ίδιο μανιτάρι, καλλιεργήθηκε σε ανακινούμενη φιάλη και σε αναδευόμενους βιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας τύπου stirred-tank η μέγιστη τιμή βιομάζας ήταν μεταξύ 17 και 22 g/l (Tang, κ.α., 2011). Ωστόσο εκτός από τους Tang και Zhong αλλά και οι Stajić κ.α. (2011) ασχολήθηκαν με καλλιέργεια *G. lucidum*, αν και τα στελέχη ήταν διαφορετικά. Σύμφωνα με τους τελευταίους, η συγκέντρωση

βιομάζας έφτασε τα 3-28 g/l σε υπό ανάδευση καλλιέργεια. Μπορεί η καλλιέργεια του *G. lucidum* να είναι η πιο καλά μελετημένη, ωστόσο η έρευνα δεν περιορίζεται μόνο σε αυτό το είδος *Ganoderma*. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι σε υπό ανάδευση καλλιέργειες με γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης, η τιμή της βιομάζας του μανιταριού *Ganoderma applanatum* ήταν 7 g/l (Diamantopoulou κ.α., 2012). Αξίζει να σημειωθεί ότι επίτευξη υψηλής βιομάζας δε σημαίνει κατ'ανάγκη και επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης μεταβολιτών. Σε αρκετές περιπτώσεις, η συγκέντρωση των EPS ήταν μεγάλη (~1,62 g/l) ενώ η παραγωγή βιομάζας *G. lucidum* είναι μικρή (0,8 g/l), όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε σουκρόζη (Diamantopoulou κ.α., 2012). Σε πειράματα που έχουν γίνει κατά τα οποία η καλλιέργεια του *G. lucidum* έγινε με ασυνεχή τρόπο η συγκέντρωση των EPS έφτασε περίπου το 1,5 g/l (Yang κ.α., 1998). Η παραγωγή EPS απασχόλησε και τους Fang και Zhong (2002), οι οποίοι συνδύασαν εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης προκειμένου να βελτιώσουν την παραγωγή των EPS του *G. lucidum*. Αποτέλεσμα του συνδυασμού αυτού ήταν η λήψη EPS μέχρι και 0,81g/g. Έπειτα από έρευνα οι Tang και Zhong (2002) βελτιστοποίησε τις παραμέτρους διεξαγωγής της καλλιέργειας καταγράφοντας λήψη βιομάζας 22,1 g/l, EPS 1,71 g/l, IPS 2,49 g/l και GA 582 mg/l (Sanodiya κ.α., 2009).

Έπειτα από ενδελεχή μελέτη της συμπεριφοράς του *G. lucidum* κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες αναπτύχθηκαν πέντε βασικές στρατηγικές βυθισμένης υγρής καλλιέργειας. Οι τεχνικές αυτές είναι οι εξής παρακάτω (Wagner κ.α., 2003; Sanodiya κ.α., 2009):

- Ασυνεχής ζύμωση. Βρίσκει εφαρμογή σε φιάλες Erlenmeyer και σπανιότερα σε βιοαντιδραστήρες.
- Ημισυνεχής ζύμωση. Προσθήκη ενός ή περισσότερων θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την επίτευξη μεγάλης ανάπτυξης και υψηλής απόδοσης σε προϊόν κατά το τέλος της διεργασίας, μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη εάν προστίθενται εξ αρχής. Με την τεχνική αυτή πιθανόν να επεκτείνεται η περίοδος ανάπτυξης και παραγωγής προϊόντων σε σχέση με την ασυνεχή ζύμωση.
- Έλεγχος μιας παραμέτρου, όπως είναι το pH. Έχει παρατηρηθεί ότι pH, σταθερό στο 3, βελτιώνει τη ανάπτυξη, ενώ αν το pH είναι στο 6 ευνοείται η παραγωγή EPS. Επομένως η εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος και η αλλαγή του pH από το 3 (1<sup>η</sup> φάση) στο 6 (2<sup>η</sup> φάση) μετά από 2 ημέρες βελτιστοποιεί τη ζύμωση.
- Διφασικό σύστημα καλλιέργειας. Έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή γανοδερικών οξέων ευνοείται με χαμηλή τάση οξυγόνου. Για αυτό και καλλιέργεια *G. lucidum* που αποσκοπεί σε παραγωγή γανοδερικών οξέων τελείται σε δυο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ανακίνηση σε ένα περιστροφικό αναδευτήρα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ενώ μετά από αυτό η καλλιέργεια παραμένει στατική για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, επίσης (στάδιο δεύτερο).
- Ακίνητοποιημένη καλλιέργεια. Κατά τη διεξαγωγή ζύμωσης τύπου βυθισμένης καλλιέργειας σε φλάσκες Erlenmeyer, φύλλο αφρού πολυουρεθάνης χρησιμοποιείται ως φορέας ακίνητοποίησης, στην επιφάνεια της μήτρας του οποίου προσκολλάται μυκήλιο. Αποτέλεσμα τεχνικής αυτής λήψη υψηλότερης πυκνότητας βιομάζας και EPS σε σχέση με την καλλιέργεια χωρίς φορέα ακίνητοποίησης.

Μια κλασική υγρή καλλιέργεια ξεκινά με την παραγωγή του εμβολίου, που είναι κρίσιμο βήμα. Το μέγεθος, η βιωσιμότητα και ομοιογένεια του εμβολίου μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της μεταγενέστερης ζύμωσης σημαντικά και ως εκ τούτου θα πρέπει να καθοριστεί συγκεκριμένο πρωτόκολλο, ώστε η διαδικασία να είναι επαναλήψιμη. Σε αντίθεση με τους νηματοειδής μύκητες των οποίων το εμβόλιο μπορεί να είναι οι σπόροι που παράγουν, το *Ganoderma* που είναι μακρομύκητας, δε παράγει σπόρια παρά μόνο όταν αναπτύσσεται ως καρπόσωμα,



επομένως ο εμβολιασμός γίνεται με μυκήλιο. Για την ανάπτυξη μυκηλιακού εμβολίου, έχουν αναπτυχθεί δυο τεχνικές: είτε προετοιμασία του σπόρου καλλιέργειας σε άγαρ είτε σε προκαλλιέργεια. Με την 1<sup>η</sup> τεχνική μικρά κομμάτια μυκηλίου μεταφέρονται στο υγρό ζύμωσης όταν αυτά λαμβάνονται από το άγαρ. Η μεταφορά από ένα στερεό σε ένα υγρό περιβάλλον προκαλεί τη φάση υστέρηση/προσαρμογής. Συνήθως οι πυκνότητα του εμβολίου είναι μικρή. Σε κάθε περίπτωση η ποσότητα του εμβολίου πρέπει να είναι γνωστή ώστε η ίδια διαδικασία να μπορεί να επαναληφθεί. Με την 2<sup>η</sup> τεχνική απαιτείται ομοιογένεια της προκαλλιέργειας και μετά λήψη εμβολίου από αυτήν (Wagner κ.α., 2003). Συνήθως στο υγρό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται οργανική πηγή αζώτου που είναι πολύ καλύτερη από ό,τι η ανόργανη για την παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών επειδή τα απαραίτητα αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από ανόργανες πηγές αζώτου (Simonis κ.α., 2008).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να αλληλεπιδρούν επηρεάζοντας τη σχετική παραγωγικότητα τόσο της βιομάζας όσο και των προς απομόνωση προϊόντων, που στην περίπτωση του *G. lucidum* είναι τα GAs και οι IPS/EPS. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι η μορφολογία του μύκητα, η αρχική συγκέντρωση σακχάρου, ταχύτητα ανάδευσης, ρυθμός αερισμού, η θερμοκρασία, το pH, η πυκνότητα του εμβολίου, τα λιπαρά οξέα, ο λόγος C/N και τα μικρο-/μάκρο- στοιχεία (Wagner κ.α., 2003):

Μορφολογία. Η μορφολογία σχετίζεται με τον μεταβολισμό. Όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται υπό ανακίνηση, σχηματίζονται pellets (σφαιρίδια), το μέγεθος των οποίων καθορίζει τη σχετική παραγωγικότητα των διαφόρων μεταβολιτών. Για παράδειγμα, pellets μεγέθους μεγαλύτερου από το κρίσιμο μέγεθος για τη διάχυση του οξυγόνου προάγουν μεγάλη απόδοση γανοδερικού οξέως. Αυτό συμβαίνει διότι η μικρή συγκέντρωση οξυγόνου στο κέντρο των pellets διεγείρει την παραγωγή γανοδερικών οξέων από τα κύτταρα στην περιοχή αυτή. Και ενώ η ύπαρξη pellets μεγάλου μεγέθους ευνοεί την παραγωγή Gas, οι συγκεντρώσεις των IPS είναι χαμηλότερες σε τέτοιου είδους pellets. Το μέγεθος των pellets επηρεάζεται και αυτό από διάφορες μεταβλητές όπως: η συγκέντρωση σακχάρου στο μέσο, η ανάδευση και η πυκνότητα εμβολίου.

Αρχική συγκέντρωση σακχάρου στο μέσο. Έχει παρατηρηθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρου (>35 g/l) μειώνουν το ρυθμό αύξησης, λόγω των αυξημένων απαιτήσεων συντήρησης και αυξάνουν την ωσμωτική πίεση του μέσου (Wagner κ.α., 2003). Ακόμα η μορφολογία των pellets, το μέγεθος, και τα μεταβολικά γεγονότα εξαρτώνται από την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης και την χρονική περίοδο προσθήκης της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας (Simonis κ.α., 2008). Σύμφωνα με τους Hsieh κ.α. (2006) η παραγωγή πολυσακχαρίτη υποδεικνύει την κατεύθυνση της ροής της ενέργειας. Σε περίπτωση που η παραγωγή πολυσακχαρίτη είναι χαμηλή, η πηγή άνθρακα/ενέργειας είτε είναι εξαντλημένη είτε χρησιμοποιείται προς την ανάπτυξη και τη συντήρηση των κυττάρων ή για τη παραγωγή ενός άλλου προϊόντος.

Ανακίνηση και αερισμός. Είναι γνωστό ότι το οξυγόνο επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη, την κυτταρική μορφολογία, την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών και τη βιοσύνθεση μεταβολιτών (Simonis κ.α., 2008). Τόσο η μεταφορά οξυγόνου στο μέσο, όσο και το στρες, λόγω διάτμησης, αυξάνονται με την αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, για αυτό η εύρεση του βέλτιστου ρυθμού ανάδευσης είναι σημαντική. Έρευνες δείχνουν ότι υψηλός ρυθμός ανάδευσης ευνοεί την παραγωγή EPS, επειδή μειώνεται η απορρόφηση των εκκρινόμενων EPS από το κυτταρικό τοίχωμα ενώ είναι πιθανό να διεγείρεται και η σύνθεση τους. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση του ιξώδους λόγω υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας και EPS, απαιτεί αύξηση του ρυθμού ανάδευσης (Wagner κ.α., 2003), λόγω της περιορισμένης μεταφοράς οξυγόνου (Simonis κ.α., 2008). Οι Hsieh κ.α. (έτος) παρατήρησαν ότι αν και υψηλότερος ρυθμός αερισμού σε πρώιμα στάδια της καλλιέργειας μπορεί να προκαλέσει ταχεία παραγωγή EPS, οι πολυσακχαρίτες θα μπορούσαν επίσης να αποσυντεθούν υπό ορισμένες δυσμενείς συνθήκες κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Γενικά, έχει φανεί ότι η βέλτιστη ταχύτητα περιστροφής

είναι περίπου 100 rpm (στροφές ανά λεπτό), με την ταχύτητα περιστροφής να επηρεάζει το μέγεθος των σχηματιζόμενων pellets και των κατανομών τους, αφού όταν η ταχύτητα περιστροφής είναι χαμηλή, σχηματίζονται μεγαλύτερα μυκηλιακά σφαιρίδια (pellets), ενώ όταν είναι υψηλή τα pellets που σχηματίζονται είναι μικρού μεγέθους λόγω μεγάλης δύναμης διάτμησης (Yang και Liao, 1998). Στην περίπτωση των βιοαντιδραστήρων έχουν χρησιμοποιηθεί τουρμπίνες και air-lifts, που επιτρέπουν την άνοδο φυσαλίδων, προκαλώντας λιγότερη τάση διάτμησης στο μυκήλιο από ότι η τουρμπίνα, αλλά η μεταφορά οξυγόνου δεν είναι τόσο αποτελεσματική. Ακόμα οι ιδιότητες του υγρού μέσου καλλιέργειας, μπορούν να αλλάζουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς οξυγόνου. Οι Tang και Zhang (2003) έδειξαν ότι η μυκηλιακή ανάπτυξη μπορεί να ανασταλεί σημαντικά όταν η τάση του διαλυμένου οξυγόνου ήταν περίπου 10% του κορεσμένου αέρα λόγω του περιορισμού του οξυγόνου στα μυκηλιακά συσσωματώματα, ενώ παραγωγή EPS και IPS ήταν υψηλότερη, όταν η τάση του διαλυμένου οξυγόνου ήταν στο 25% του κορεσμένου αέρα.

Θερμοκρασία. Έχουν πραγματοποιηθεί ζυμώσεις με τη θερμοκρασία να κυμαίνεται από 25 έως 35 °C, με την πλέον καταλληλότερη να εντοπίζεται στους 30 °C. Σε 30 °C < T < 35 °C, ευνοείται η παραγωγή πολυσακχαρίτη και ο ρυθμός ανάπτυξης μυκηλίου, ενώ σε θερμοκρασίες εκτός αυτού του εύρους, μειώνεται δραστικά η παραγωγή και η ανάπτυξη τους αντίστοιχα.

pH. Σύμφωνα με τους Simonic κ.α. (2008) που μελέτησαν την επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων ανάπτυξης του *Ganoderma lucidum* HAI 447, το αρχικό pH του μέσου μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό κυτταρική λειτουργία της μεμβράνης, την κυτταρική ανάπτυξη, τη μορφολογία και τη δομή, τη διαλυτότητα των αλάτων, την ιοντική κατάσταση του υποστρώματος την πρόσληψη των διαφόρων θρεπτικών ουσιών, και την βιοσύνθεση των μεταβολικών προϊόντων. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν οι αρχικές τιμές pH είναι χαμηλές ευνοείται η καλλιέργεια γιατί το περιβάλλον ανάπτυξης αναστέλλει τις βακτηριακές επιμολύνσεις (Yang και Liao, 1998). Ωστόσο, μια υψηλή αρχική τιμή pH μπορεί να ευνοήσει την υψηλή κυτταρική αναπνευστική δραστηριότητα και την ανάπτυξη των κυττάρων και την κατανάλωση γλυκόζης. Η σχετική υψηλή κατανάλωση γλυκόζης μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή βιολογικών οξέων το πρώτο δεκαήμερο της ζύμωσης, γεγονός που ερμηνεύει γιατί διατηρείται το pH χαμηλό. Όμως μετά το δεκαήμερο το pH αυξάνεται απότομα στο 7. Χαμηλό pH έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση που ως πηγή αζώτου έχουν χρησιμοποιηθεί αμμωνιακά άλατα, καθώς τα ιόντα αμμωνίου αφομοιώνονται, με τα εναπομένοντα ανιόντα οξέα (όπως χλωριούχα, θειικά, ή φωσφορικά άλας), να επηρεάζουν και να διαμορφώνουν το μέσο ανάπτυξης. Το κατώτερο όριο αυτής της πτώσης του pH εξαρτάται από τη ρυθμιστική δράση των συστατικών του μέσου ανάπτυξης και του μυκηλίου) (Yang και Liao, 1998). Σημειώνεται ακόμα ότι, έχει παρατηρηθεί πως pH = 3, βελτιώνει τη ανάπτυξη, ενώ pH = 6 ευνοεί τη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, ίσως λόγω της διατήρησης της σφαιρικής μορφής των pellets. Από αυτό προκύπτει η ύπαρξη σχέσης μεταξύ pH, μορφολογίας και παραγωγής EPS. Ακόμα σημειώνεται ότι η πτώση του pH από 6 σε 2,6 προκάλεσε αλλαγή του σχήματος των pellets από σφαιρική σε νηματώδη (Wagner κ.α., 2003). Ακόμα ισχύει ότι αυξάνεται η παραγωγή των EPS και κυρίως των IPS όταν η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε μέσο με μικρότερη αρχική τιμή pH (Simonik κ.α., 2008).

Επίδραση της πυκνότητας του εμβολίου. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του εμβολίου αυξάνεται η απόδοση του μυκηλίου και ο αριθμός των pellets αλλά μειώνεται το μέγεθος του μυκηλίου-pellet. Η ύπαρξη πάρα πολλών pellets στο broth, μπορεί να οδηγήσει στην προσκόλληση μερικών από αυτών των μικροσκοπικών σωματιδίων κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, προκαλώντας αύξηση του μεγέθους των pellets (Yang και Liao., 1998). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η πυκνότητα του εμβολίου επιδρά στην κατανομή του μεγέθους των pellets υπό μορφή σφαίρας και συνδέεται με τον σχηματισμό προϊόντων, δεδομένου η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των IPS είναι υψηλότερη σε μικρά σφαιρικά pellets, ενώ η συγκέντρωση των

γανοδερικών οξέων είναι υψηλότερη σε μεγάλο μέγεθος. Η συσχέτιση αυτή διαπιστώθηκε όταν η ποσότητα εμβολίου που προστέθηκε σε καλλιέργεια του *G. lucidum* ήταν 70 mg /l.

Επίδραση των φυτικών ελαίων και των λιπαρών οξέων. Σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, συνήθως απαιτείται η προσθήκη αντιαφριστικών παραγόντων, που θα αποτρέψουν το σχηματισμό αφρού, καθώς ο τελευταίος αυξάνει τον ενεργό όγκο εργασίας, παρεμβαίνει στην παρακολούθηση και τον έλεγχο των συνθηκών ζύμωσης και κάνει την ανάκτηση των προϊόντων πιο δύσκολη. Στα πλαίσια χρήσης αντιαφριστικών παραγόντων έχουν χρησιμοποιηθεί φυτικά έλαια και των λιπαρά οξέα, τα οποία προκάλεσαν αύξηση του *G. lucidum*, ίσως λόγω της μερικής ενσωμάτωσης των λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών από το μέσο ανάπτυξης. Όσο αφορά την επίδραση τους στο σχηματισμό EPS, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, με την σύσταση, το είδος και την αναλογία του ελαίου ή λίπους να καθορίζει τη φύση της επίδρασης.

C/N. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πηγής αζώτου συμβάλει στην αύξηση παραγωγής βιομάζας, ενώ χαμηλότερη συγκέντρωση αζώτου συμβάλει στην παραγωγή πολυσακχαρίτη λόγω της υψηλής τιμής του λόγου C/N, η οποία με την σειρά της βοηθά την ενζυμική δραστηριότητα των ενζύμων που καταλύουν την σύνθεση πολυσακχαριτών (Simonis κ.α., 2008). Συγκεκριμένα οι Hsieh κ.α. (2006) συνέλεξαν χαμηλή συγκέντρωση βιομάζας και υψηλότερη πολυσακχαριτών υπό συνθήκη περιορισμού αζώτου, ενώ μια αύξηση συγκέντρωσης αζώτου οδήγησε σε αύξηση του pH και της παραγωγής βιομάζας και μείωση της παραγωγής πολυσακχαρίτη. Ακόμα, σύμφωνα με τους Fang και Zhong (2002) η παρουσία πεπτόνης σε σχετικά υψηλά επίπεδα μπορεί να προκαλέσει μείωση παραγωγής βιομάζας, πιθανώς λόγω της ύπαρξης αναστολέων ανάπτυξης εντός της, καταστέλλοντας έτσι την διεγερτική της δράση όταν αυτή προστίθεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Μίκρο- και μακρο- στοιχεία. Τα ιχνοστοιχεία (κυρίως ο P και το Mg), επηρεάζουν τη παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαρίτη. Υπενθυμίζεται ότι τα P και Mg είναι συμπαραγόντες για ορισμένα ένζυμα τα οποία καταλύουν την σύνθεση πολυσακχαρίτη. Όσο αφορά στο ασβέστιο, η προσθήκη του μπορεί να προκαλέσει μείωση της παραγόμενης βιομάζας και αύξηση των παραγόμενων πολυσακχαριτών (Simonis κ.α., 2008).

Έπειτα από εκτενή αναφορά των χαρακτηριστικών τόσο της υγρής ζύμωσης όσο και της στερεάς, μπορούμε να παραθέσουμε τις κύριες διαφορές, αποτυπώνοντας καλύτερα τις βασικές ιδιαιτερότητες της κάθε τεχνικής ζύμωσης (Manpreet κ.α., 2005).

#### Ζύμωση στερεάς κατάστασης (SSF)

Προτιμώνται οι οργανισμοί που απαιτούν λιγότερο νερό για αύξηση

Υπάρχουν λιγότερες πιθανότητες μόλυνσης λόγω της χαμηλής διαθεσιμότητας του νερού

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιολογικοί αντιδραστήρες μικρού μεγέθους

Απαιτείται λιγότερη κατανάλωση ενέργειας για τον αερισμό και τη μεταφορά αερίου

Ο περιοριστικός παράγοντας για την αύξηση είναι η διάχυση των θρεπτικών ουσιών

Υπάρχουν πολλές δυσκολίες στη μέτρηση της βιομάζας και άλλων διαδικασιών

Η επεξεργασία είναι εύκολη, φτηνότερη και λιγότερο χρονοβόρα

Υγρά απόβλητα δεν παράγονται

#### Ζύμωση υγρής κατάστασης

Η συγκέντρωση του μέσου είναι πάρα πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με την περιεκτικότητα σε νερό

Τα απαραίτητα για την επεξεργασία συστατικά είναι ακριβά

Η υψηλή δραστηριότητα του νερού γίνεται η σημαντικότερη αιτία μόλυνσης

Απαιτούνται μεγάλης κλίμακας βιολογικοί αντιδραστήρες επειδή τα μέσα είναι πάρα πολύ αραιωμένα

Η καλή μίξη καθιστά τη διάχυση εύκολη

Η υψηλή πίεση αέρα καταναλώνει περισσότερη ενέργεια και υπάρχει φτωχή μεταφορά του αερίου  
Το νερό καθιστά την διαδικασία δύσκολη και πολύ ακριβή  
Οι αισθητήρες είναι διαθέσιμοι κατά την διάρκεια του πειράματος και η δειγματοληψία είναι εύκολη για τη μέτρηση της βιομάζας

## II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## II.1. Γενική παρουσίαση

Στα παρακάτω εδάφια, περιγράφεται η σύσταση των υποστρωμάτων (υγρού και στερεού μέσου ανάπτυξης), το βιολογικό υλικό και οι συνθήκες καλλιέργειας που επιλέχθηκαν κατά τη ζύμωση πέντε φαρμακευτικών μακρομυκήτων του γένους *Ganoderma* (*G. adpersum*, *G. resinaceum*, *G. applanatum*, *G. lucidum* 330 και 331). Επιπλέον, γίνεται αναφορά στα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ώστε να προσδιορισθεί η αύξηση και τα μεταβολικά τους προϊόντα και δίνονται πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες λειτουργίας των αναλυτικών συσκευών και γενικά του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έλαβαν χώρα ως εξής:

Στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) πραγματοποιήθηκαν:

Οι υγρές και στερεές ζυμώσεις των μακρομυκήτων

Ο προσδιορισμός της βιομάζας και των μεταβολικών προϊόντων

Η παρασκευή εκχυλίσματος

Στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε η ανάλυση λιπιδίων, ως προς τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα (χρήση GC)

Στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της σύστασης των πολυσακχαριτών σε απλά σάκχαρα (χρήση HPLC)

Στο Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας - Φυτικοχημείας τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου πραγματοποιήθηκαν:

Προσδιορισμός ολικών φαινολών και τερπενοειδών εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσώματος

In vitro αναλύσεις ως προς την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσώματος

## II.2. Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 5 στελέχη φαρμακευτικών μυκήτων τα οποία ανήκουν στη κλάση των βασιδιομυκήτων. Τα στελέχη αυτά διατηρούνται στη τράπεζα καλλιέργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και φέρουν κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL (Athens Mushroom Research Laboratory), όπως καταγράφονται στον Πίνακα II.1.

**Πίνακας II.1.:** Τα είδη μακρομυκήτων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

Συνομοταξία	Είδος μακρομύκητα	AMRL	Προέλευση
Βασιδιομύκητες	<i>Ganoderma applanatum</i>	341	ΑΥΤΟΦΥΕΣ, ΕΛΛΑΔΑ
	<i>Ganoderma resinaceum</i>	325	ΑΥΤΟΦΥΕΣ, ΕΛΛΑΔΑ
	<i>Ganoderma adpersum</i>	315	ΑΥΤΟΦΥΕΣ, ΕΛΛΑΔΑ
		330	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΤΑΙΒΑΝ
		331	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΤΑΙΒΑΝ
	<i>Ganoderma lucidum</i>	332	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΚΙΝΑΣ



Όλες οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν σε PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt, Germany), έπειτα από επώαση 7-10 ημερών στους 30 °C, σύμφωνα με τον Πίνακα Π.2 (φωτογραφίες τρυβλίων παρατίθενται στο παράρτημα).

**Πίνακας Π.2.:** Σύνθεση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας μυκήτων *Ganoderma* spp. σε τρυβλία

Θρεπτικό μέσο	Συστατικά	g/l	Μέθοδος παρασκευής
PDA	Πατάτα	300	Σε 1l απιονισμένο νερό προστέθηκαν το εκχύλισμα της πατάτας, τα λοιπά υλικά και αναδεύτηκαν μέχρι να προκύψει ένα ομοιογενές μίγμα και ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C, για 20 min
	Γλυκόζη	20	
	CaCO <sub>3</sub> 0,1% (Sigma)	1	
	Άγαρ	18	

Η διατήρησή τους πραγματοποιείται σε σωλήνες με κεκλιμένο PDA στους 2 °C. Πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, γίνεται ανανέωση των στελεχών, προκειμένου οι καλλιέργειες να έχουν ηλικία 7-10 ημερών αναλόγως του μύκητα.

### Π.3. Θρεπτικό μέσο υγρής ζύμωσης

Σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250ml, πληρωμένες με 75±1ml θρεπτικό υλικό, πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια ως ζύμωση βυθού κλειστού τύπου. Στον Πίνακα Π.3 καταγράφεται η σύνθεση του υποστρώματος ανάπτυξης των 5 βασιδιομυκήτων. Ως κύρια πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η χημικώς καθαρή γλυκόζη [D(+)-glucose, Alphaesar, Karlsruhe, Germany], ενώ ως κύρια πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη (Merck, Darmstadt, Germany) και εκχύλισμα ζύμης (Fluka, Steinheim, Germany). Ο λόγος C/N του μέσου καθορίστηκε στο 30. Το pH του μέσου καλλιέργειας καταγράφηκε στο 5,8 ±0,3 ενώ οι τελικές τιμές pH, της ημέρας συλλογής βιομάζας, κυμάνθηκαν από 4,26 έως 5,26 αναλόγως του μύκητα.

**Πίνακας Π.3.:** Σύνθεση θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των 5 βασιδιομυκήτων κατά την καλλιέργεια που έλαβε χώρα στη παρούσα μελέτη

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/l)
Γλυκόζη	45,8
Εκχύλισμα ζύμης	2,5
Πεπτόνη	3,5
CaCO <sub>3</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,04
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,08

## Π.4. Πειράματα υγρής ζύμωσης σε φιάλες

Οι κωνικές φιάλες με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο (121°C, 20 λεπτά) και εμβολιάστηκαν με ανανεωμένη καλλιέργεια μύκητα. Ο εμβολιασμός επιτεύχθηκε με την προσθήκη εμβολίου 0.7cm με μύκητα νεαρής καλλιέργειας υπό ασηπτικές συνθήκες. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 30 °C, υπό στατικές συνθήκες, για 2 εβδομάδες περίπου. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των *G. lucidum* 330 & 331 όπου η επώαση διήρκησε 28 ημέρες, αρχικά υπό συνθήκες στατικές και στη συνέχεια σε επιδαπέδιο ανακινητή (ZHICHENGZHUY 221C, Shanghai, China) με ρυθμό ανάδευσης 170 rpm . Η καλλιέργεια αυτή θεωρήθηκε προκαλλιέργεια.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κυρίως καλλιέργεια μόνο που στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε από την προκαλλιέργεια υγρό εμβόλιο 5 ml, αφού πρώτα είχε ομογενοποιηθεί υπό στείρες συνθήκες.

## Π.5. Πειράματα ζυμώσεων στερεής κατάστασης σε σάκους

Για τις καλλιέργειες των μυκήτων *Ganoderma* spp. σε ζύμωση στερεής κατάστασης, χρησιμοποιήθηκαν δυο λιγνοκυτταρινούχα υλικά: πριονίδι οξιάς (O) & πριονίδι (και ροκανίδι) βελανιδιάς (B) που παρασκευάστηκαν σε αναλογία 75% γεωργικά υπολείμματα και 25% πρόσθετα (καλαμπόκι, CaCO<sub>3</sub> κ.β.) (Philippoussis 2015). Όπως καταγράφεται στον Πίνακα Π.4, με 47,97% άνθρακα και 0,15% άζωτο, ο τελικός λόγος C:N των υποστρωμάτων διαμορφώθηκε στο 310,26.

Πίνακας Π.4.: Σύνθεση υποστρωμάτων για τη στερεά ζύμωση των στελεχών *Ganoderma* σε σάκους

Υποστρώματα			Πρόσθετα				
Αναλογίες γεωργικών υπολειμμάτων και προσθετικών (% ξ.β.)							
Γεωργικά υπολείμματα			Καλαμπόκι	Κεχρί	Πίτουρο	Σογιάλευρο	CaCO <sub>3</sub>
<b>O (οξιά)</b>	65	Πριονίδι	10	5	12	8	1
<b>B (βελανιδιά)</b>	50	Πριονίδι	10	5	12	8	1
	15	Ροκανίδι					

### Π.5.1. Παρασκευή υποστρωμάτων – εμβολιασμός - συνθήκες καλλιέργειας

Προκειμένου να παρασκευαστούν τα υποστρώματα καλλιέργειας των μανιταριών *Ganoderma*, αρχικά τα γεωργικά υπολείμματα (O, B) εμβάπτιστηκαν σε νερό για 24h και στη συνέχεια παρέμειναν για στράγγιση άλλες 24h. Μετά ακολούθησε ο εμπλουτισμός των υπολειμμάτων με τα παραπάνω. Τα παρασκευασμένα πλέον υπόστρωμα O και B χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης διάφανων σάκων προπυλενίου διαστάσεων 20x32 cm με ειδικό φίλτρο για ανταλλαγή αερίων (SAC O<sub>2</sub> microsac, Belgium). Μετά το γέμισμα οι σάκοι ζυγίστηκαν ώστε το τελικό βάρος να είναι περίπου 1,8 kg και αποστειρώθηκαν στους 121 °C (πίεση 1.1atm) για 1 h και 30 λεπτά. Μετά την αποστείρωση ακολούθησε ο εμβολιασμός των σάκων με υγρό εμβόλιο παρασκευασμένο σύμφωνα με τον τρόπο Π.4. Υπό στείρες συνθήκες, το εμβόλιο τοποθετήθηκε κατά μήκος του κεντρικού άξονα του σάκου, με την κάθε κωνική να αντιστοιχεί και σε ένα σάκο. Συνολικά εμβολιαστήκαν 80 σάκοι για κάθε στέλεχος σε κάθε ένα υπόστρωμα. Μετά τον εμβολιασμό τους, οι σακούλες μεταφέρθηκαν για επώαση σε θάλαμο με θερμοκρασία 28 °C και σχετική υγρασία 95%, με την επώαση να λαμβάνει χώρα χωρίς φωτισμό. Κάθε βδομάδα γινόταν καταγραφή της μυκηλιακής ανάπτυξης (ποσοστό % του συνολικού όγκου του υποστρώματος που καταλαμβάνει ο μύκητας) και όταν το υπόστρωμα αποικήθηκε πλήρως (100%), οι σακούλες αφαιρέθηκαν και τα επωασμένα υποστρώματα μεταφέρθηκαν για καρποφορία σε θαλάμους με συνθήκες 20±1 °C αρχικά και στη συνέχεια 25 °C, συνεχές φως 300 lux, ενώ η υγρασία

ρυθμίστηκε σε 85% με υδρονέφωση διάρκειας 1-3 min, 2 φορές ημερησίως. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της καρποφορίας καταγράφονταν ο αριθμός και το βάρος των παραγόμενων καρποφοριών, ενώ μετά το 1<sup>ο</sup> κύμα καρποφορίας έγινε εμβάπτιση των σάκων σε κρύο νερό για 2 ώρες.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η Βιολογική Αποδοτικότητα (% B.A.), η Αποδοτικότητα % (A%) της καλλιέργειας και το μέσο βάρος καρποφοριών ως εξής:

$$\% \text{ B.A.} = \frac{\text{Συνολικό Νωπό Βάρος Καρποφοριών}}{\text{Ξηρό Βάρος Υποστρώματος}} * 100$$

$$\% \text{ A.} = \frac{\text{Συνολικό Νωπό Βάρος Καρποφοριών}}{\text{Νωπό Βάρος Υποστρώματος}} * 100$$

$$\text{Μεσο Βάρος Καρποφοριών (g)} = \frac{\text{Συνολικό Βάρος Καρποφοριών (g)}}{\text{Αριθμό καρποφοριών}}$$

## II.6. Αναλύσεις μυκηλίου και καρποσώματος

### II.6.1. Προσδιορισμός pH

Το pH στην αρχή και στο τέλος της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με τη συσκευή Jenway 3020 pHmeter (Essex, UK)

### II.6.2. Συλλογή, λυοφυλίωση και λειοτρίβηση βιομάζας

Για να συλλεχθεί η βιομάζα έλαβε χώρα διήθηση υπό κενό με τη χρήση φίλτρων Whatman No2, Kent, Germany). Έπειτα, σε προζυγισμένο γυάλινο φιαλίδιο, μεταφέρθηκε η βιομάζα και καταγράφηκε το νωπό βάρος των μυκηλίων σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (KernAGB, Darmstadt, Germany). Μετά τη συλλογή βιομάζας ακολούθησε λυοφιλίωση. Η προζυγισμένη νωπή βιομάζα καταψύχθηκε για 48 ώρες και μεταφέρθηκε στο λυοφιλιοποιητή (HetoLyoLab 3000). Η διαδικασία της λυοφιλίωσης ολοκληρώθηκε σε 48 h, ενώ μετά καταγράφηκε το ξηρό πλέον βάρος των μυκηλίων (βιομάζα) στο ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε με γνώμονα τη διατήρηση της ποιότητας, διότι με τη μέθοδο αυτή δεν υποβαθμίζεται η βιομάζα από την επίδραση της θερμότητας και διατηρείται έτσι το άρωμα, η γεύση, το χρώμα και η θρεπτική αξία.

Μετά την λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση, όπου η ξηρή βιομάζα υπέστη άλεση, προκειμένου να ληφθούν μικρόκοκκοι ξηρού μυκηλίου, υπό μορφή σκόνης. Η κονιορτοποίηση πραγματοποιήθηκε σε σφυρόμυλο (IKA/Labortechnik type DCFH48, Staufen), με τη διαδικασία να πραγματοποιείται 2 φορές ανά δείγμα. Έπειτα, η σκόνη συλλέχθηκε σε προζυγισμένο falcon και ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

### II.6.3. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης

Ο προσδιορισμός των μη καταναλωθέντων αναγόντων σακχάρων από τον μύκητα, δηλαδή της γλυκόζης, στο θρεπτικό μέσο, την ημέρα τερματισμού της ζύμωσης έλαβε χώρα με την φωτομετρική μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1954). Η αρχή της μεθόδου είναι η αναγωγή του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-άμινο-5-σαλικυλικό οξύ παρουσία υπεροξειδίου του νατρίου (NaOH) και η ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου: σε 0,5ml, αραιωμένου 1:25 δείγματος, προστέθηκε 0,5ml αντιδραστήριου DNS και αναδεύτηκε. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά και ψύχθηκαν σε 25 °C. Έπειτα προστέθηκαν 5ml απιονισμένου νερού, αναδεύθηκαν και

μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Όλες οι απορροφήσεις που μετρήθηκαν έγιναν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς:  $y = 1,733x + 0,292$ , εκφρασμένη σε g/l γλυκόζης.

#### II.6.4. Υδατική εκχύλιση

*Εκχύλιση σε θερμοκρασία 25°C ('ψυχρή εκχύλιση')*: Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος που βασίστηκε στους Israilides κ.α. (2008) όπου σε 0,5g ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 10ml απιονισμένου νερού. Μετά, ακολούθησε συνεχόμενη ανάδευση (170 rpm) για 24 h στους 25°C. Το εκχύλισμα ελήφθη μετά από φυγοκέντρηση (Micro 22R Hettich, Germany - 30 min/7000rpm/4 °C) και διπλή διήθηση υπό κενό με χρήση φίλτρων Whatman No2 &1.

*Εκχύλιση σε θερμοκρασία 100°C ('θερμή εκχύλιση')*: Με βάση την εργασία των Smiderle κ.α. (2006) αλλά και κάποιες τροποποιήσεις, σε 0,5g ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 10ml απιονισμένου νερού. Μετά, ακολούθησε βρασμός (100 °C) για 3h και φυγοκέντρηση (30 min/8000rpm/4 °C). Το υπερκείμενο που προέκυψε διηθήθηκε υπό κενό με χρήση φίλτρων Whatman No2 &1, ώστε να ληφθεί το 1<sup>ο</sup> εκχύλισμα, ενώ στο ίζημα προστέθηκαν 7ml απιονισμένου νερού στην περίπτωση των μηκυλίων και 5ml στα καρποσώματα. Η παραπάνω διαδικασία ετελέσθει εκ νέου. Το ολικό εκχύλισμα προέκυψε μετά την συνένωση των δυο επιμέρους εκχυλισμάτων.

#### II.6.5. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Σύμφωνα με τους Liang κ.α. (2010) και Diamantopoulou κ.α. (2014), 100 mg ξηρής βιομάζας εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας 20 ml/δείγμα 2,5M HCl (Merck) για μια ώρα στους 100°C. Έπειτα, ακολούθησε ουδετεροποίηση του pH του εκχυλίσματος με 2,5M NaOH (Merck), τα δείγματα διηθήθηκαν από φίλτρο Whatman N1 και δόθηκαν για προσδιορισμό των μονισακχαριτών, όπως περιγράφεται παρακάτω. Τα ολικά IPS προσδιορίστηκαν ποσοτικά με τη μέθοδο DNS και εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν η  $y = 1,733x + 0,29$ .

##### II.6.5.1. Προσδιορισμός σύστασης σακχάρων - Συνθήκες υγρής χρωματογραφίας (HPLC- High Performance Liquid Chromatography)

Ο προσδιορισμός της σύστασης των IPS σε απλά σάκχαρα έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC Waters 400) σε στήλη AminexHPX-87H (BioRad) και σε θερμοκρασία  $65 \pm 0,1$  °C. Η ανίχνευση των σακχάρων έγινε με διαφορικό διαθλασίμετρο (RI Waters 410). Ο όγκος δείγματος ήταν 20μl, η κινητή φάση ήταν υδατικό διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,8ml/λεπτό. Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 λεπτά. Η ταυτοποίηση των σακχάρων έγινε με βάση τον χρόνο κατακράτησης, οποίος συγκρίθηκε με τα γνωστά διαλύματα αυτών. Από τα πρότυπα διαλύματα προέκυψαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς με τις αντίστοιχες τους εξισώσεις, βάσει των οποίων προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των σακχάρων.

#### II.6.6. Προσδιορισμός εξωπολυσακχαριτών (EPS)

Για τον προσδιορισμό των εξωπολυσακχαριτών (EPS) ακολουθήθηκε φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού ολικών σακχάρων Dubois (Dubois κ.α, 1957). Σε προζυγισμένο falcon των 14ml προστέθηκαν 2,5ml μέσου καλλιέργειας και 7,5ml αιθανόλης (95% ο/ο, Carlo, Erba-SDS) και ακολούθησε ανάδευση του μίγματος και παραμονή στους 4 °C για 12h. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε (Mikro 22R, Hettich, Germany) στα 6000rpm, με 10000g, για 20 λεπτά, στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα οδηγήθηκε

προς ξήρανση στους 50 °C, για 3 ημέρες και ζυγίσθηκε. Έπειτα, προστέθηκαν 5ml (75% v/v, Carlo, Erba-SDS) αιθανόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex. Εκ νέου το μίγμα αφέθηκε για 24 ώρες στους 4 °C, φυγοκεντρήθηκε στα 6000rpm, για 20 λεπτά, στους 4 °C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ αυτή τη φορά, το ίζημα οδηγήθηκε προς ξήρανση στους 50 °C, για 1ημέρα και ζυγίσθηκε. Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, στο ίζημα προστέθηκε 1ml απιονισμένο νερό προκειμένου να επιτευχθεί διαλυτοποίηση, με τη χρήση vortex. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές (τελικός όγκος 4ml). Τέλος, μετά από κατάλληλη αραιώση ακολουθήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού ολικών σακχάρων Dubois.

### II.6.7. Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Η ποσότητα του συνολικού μικροβιακού ενδοκυτταρικού λίπους, στο τέλος της ζύμωσης των μανιταριών του γένους *Ganoderma* προσδιορίστηκε σύμφωνα με τις ακόλουθες μεθόδους:

#### A) ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ SOXHLET

1g ξ. βιομάζας υπέστη απολίπωση με τη μέθοδο Soxhlet. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την απολίπωση είναι EtOAc και ακετόνη (Merck), για 8h αντίστοιχα. Τα ολικά λιπίδια εκφράστηκαν σε g/l και % κ. β ξηρής βιομάζας.

#### B) ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΥΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ FOLCH (Folch κ.α., 1957)

Σε φιαλίδιο MacCartey προστέθηκε 1g ξηρής βιομάζας και ποσότητα αντιδραστηρίου Folch (μίγμα διαλυτών CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH, Carlo, Erba-SDS) σε αναλογία 2:1 μέχρι την κάλυψή του. Το γυάλινο αυτό φιαλίδιο σφραγίσθηκε αεροστεγώς, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύτη και φυλάχθηκε τουλάχιστον για 7 ημέρες σε σκοτεινό μέρος προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση του λίπους. Έπειτα βιομάζα και μίγμα διαλυτών διηθήθηκε μέσω χάρτινου ηθμού Whatman No2. Το διήθημα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη εξάτμισης προκειμένου να λάβει χώρα εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Stuart RE300DB) ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες. Στο τέλος της διαδικασίας, εντός της φιάλης παρέμειναν τα ολικά λιπίδια, τα οποία και ζυγίσθηκαν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Τα ολικά λιπίδια εκφράστηκαν σε g/l και % κ. β ξηρής βιομάζας.

#### II.6.7.1. Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων

Τα ολικά ενδοκυτταρικά λιπίδια που εκχυλίσθηκαν με το αντιδραστήριο Folch μετατράπηκαν στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, μέσω μεθυλίωσης χρησιμοποιώντας την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1984). Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η λήψη μεθυλικών εστέρων που είναι μόρια πιο πτητικά και λιγότερο πολικά, προκειμένου να γίνει ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτά. Η επιλογή αυτής της μεθόδου έναντι άλλων λιγότερων χρονοβόρων, βασίστηκε στο γεγονός ότι αποφεύγεται η μετατροπή των cis-ισομερών των λιπαρών οξέων στα αντίστοιχα trans, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δε απαντούν στα μικροβιακά λιπίδια. Η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Στο πρώτο, το περιβάλλον ήταν αλκαλικό και τελέσθηκε πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των λιπαρών οξέων για να ληφθούν οι αντίστοιχοι μεθυλικοί εστέρες. Παράλληλα τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα μεθανολικού νατρίου (MeO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) για να ληφθούν οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο δεύτερο στάδιο, τελέσθηκε η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Η αντίδραση διακόπηκε με προσθήκη νερού και οι μεθυλεστέρες συλλέχθηκαν με εκχύλιση με n-εξάνιο.

Εφαρμογή της μεθόδου: Στη σφαιρική φιάλη με το ενδοκυτταρικό λίπος, ποσότητες πέτρες βρασμού και 10ml διαλύματος μεθανολικού νατρίου (MeO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) που περιείχαν φαινολοφθαλεΐνη, ως δείκτη pH. Το δείγμα τοποθετήθηκε προς βρασμό για 20 λεπτά, σε κάθετο ψυκτήρα και μετά το πέρας του χρόνου προστέθηκαν 5-10 ml διαλύματος υδροχλωρικής μεθανόλης, μέχρι να αλλαχθεί το χρώμα του δείκτη από ερυθρό σε λευκό, δηλαδή μέχρι το pH του δείγματος να γίνει όξινο. Ο βρασμός συνεχίστηκε για άλλα 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε νερό για να σταματήσει η



αντίδραση και 6ml n-εξάνιο. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, αναδεύτηκε έντονα και αφήθηκε για λίγα λεπτά, προκειμένου να διαχωριστούν οι δυο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική). Σε μικρό φιαλίδιο συλλέχθηκε η φάση με το εξάνιο και προστέθηκε μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ώστε να απορροφηθεί η υγρασία. Τέλος, το δείγμα αναλύθηκε σε αέριο χρωματογράφο (GC).

Παρασκευή διαλυμάτων:

Διάλυμα μεθανολικού νατρίου: 1 g μεταλλικού νατρίου (Sigma) σε 100ml μίγματος μεθανόλης (70)/βενζολίου(30)(o/o, Carlo, Erba-SDS)

Διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης: 10 ml ακέτυλο-χλωριδίου (Fluka) προστέθηκαν στάγδην σε 125ml μεθανόλης (ισχυρά εξώθερμη αντίδραση).

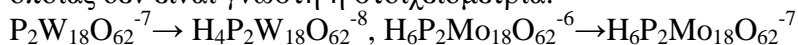
#### II.6.7.2. Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας (GC – Gas Chromatography)

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με έκχυση 1-2μl από το διάλυμα των μεθυλεστέρων, στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου Fisons 6080 (Fisons Instruments, Manchester, UK). Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν οι εξής: θερμοκρασία φούρνου 200 °C για 13 λεπτά, αύξηση της θερμοκρασίας στους 220 °C (2 °C ανά λεπτό) για 4 λεπτά και περεταίρω αύξηση της θερμοκρασίας στους 240 °C για 3 λεπτά. Θερμοκρασία επαγωγέα στους 250 °C και θερμοκρασία ανιχνευτή στους 300 °C. Φέρον αέριο He ροή 2ml/λεπτό, για ενεργοποίηση φλόγας  $\text{H}_2$  (60kPa),  $\text{O}_2$  (110 kPa). Χαρακτηριστικά στήλης: 1) τύπος στήλης FusedsilicaWCOT:CP-Sill 88 (0,2μL) 2) μήκος στήλης 50m 3) διάμετρος 0,32mm 4) πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF=0,25μm (J&W Scientific). Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 30 λεπτά. Τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια προτύπου διαλύματος μεθυλεστέρων (FAME MixC8-C22, Supelco Analytical, USA), όπου με βάση τους χρόνους κατακράτησης και το εμβαδόν της κάθε κορυφής προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.

#### II.6.8. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων (χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών) ακολουθήθηκε η μέθοδος Folin- Ciocalteu.

Αρχή μεθόδου: Η μέθοδος Folin- Ciocalteu βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση. Το Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας δεν είναι γνωστή η στοιχειομετρία:



Το προϊόν είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (750 nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του F-C και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε ένα φιαλίδιο erpedorf τοποθετούνται 790μl απιονισμένου νερού και έπειτα 10 μl δείγματος αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 5 mg/ml ή καθαρής μεθανόλης για την παρασκευή του τυφλού δείγματος. Στη συνέχεια, προστίθενται 50μl αντιδραστήριου F-C. Ακολουθεί ανάδευση, ενώ μετά το πέρας 1min προστίθενται επίσης 150μl κορεσμένου διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 % β/ο). Το μίγμα ανακινείται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750 nm, σε φωτόμετρο ELISA ενώ κατασκευάζεται και



πρότυπη καμπύλη αναφοράς με καφεϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς: Παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg/l. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος  $\psi=f(x)$ , όπου  $x$  η ποσότητα του γαλλικού οξέος (GA) σε mg/l και  $y$  η απορρόφηση στα 750 nm. Η εξίσωση που προκύπτει είναι η:  $y=0,0008x-0,00968$

### **Π.6.9. Προσδιορισμός απλών πολυφαινολών με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)**

Αρχή μεθόδου: Η επίτευξη του διαχωρισμού των διαφόρων συστατικών ενός δείγματος εξαρτάται και καθορίζεται από: 1) τις διαφορετικές δυνάμεις συγκράτησης και έκλουσης μεταξύ των συστατικών του δείγματος, 2) του υλικού πλήρωσης της στήλης ή του υλικού που καλύπτει εσωτερικά τη στήλη, 3) της παρουσίας επιλεγμένων ιόντων και των καμπυλών αναφοράς και 4) της ροής του φέροντος αερίου.

Προετοιμασία δειγμάτων: Σε φιαλίδια GC προστίθενται 50 ή 100  $\mu$ l από κάθε υδατικό εκχύλισμα μνηλίου (ή 200  $\mu$ l από κάθε υδατικό εκχύλισμα καρποσώματος) και 50  $\mu$ l εσωτερικού προτύπου (3-(4-υδροξυφαινυλο)-1-προπανόλη). Ακολουθεί εξάτμιση σε φυγοκεντρικό εξάτμιστήρα κενού (SpeedVac). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη πραγματοποιείται παραγωγοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη 250  $\mu$ l του σιλυλιωτικού αντιδραστηρίου BSTFA (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, sigma Aldrich, fluka chemica), σφράγιση των φιαλιδίων και θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 70 °C για 20 λεπτά. Τα φιαλίδια φυλάσσονται στους -20°C μέχρι την ανάλυση.

Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας/φασματοσκοπία μάζας (GC/MS): Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα σύστημα της Agilent (Wallbronn, Germany) HPseries 6890 N εφοδιασμένος με ανιχνευτή HP 5973 MS (EI, ηλεκτρονιακού ιονισμού 70 eV), εισαγωγή split-splitless και αυτόματο δειγματολήπτη HP 7683. Για την ανάλυση 1  $\mu$ l σιλυλιωμένου δείγματος εισάγεται στον εισαγωγέα σε θερμοκρασία 220 °C με λόγο σχάσης (splitratio) δείγματος προς φέρον αέριο 1:10. Η γραμμή μεταφοράς του δείγματος στον ανιχνευτή μάζας τέθηκε στους 280 °C. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν η HP-5MS (Agilent) 30 m x 0.2mm x 0.25 $\mu$ m και το φέρον αέριο ήταν He υψηλής καθαρότητας, με ροή 0,7 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ήταν: αρχική θερμοκρασία 70 °C επί 5min, άνοδος θερμοκρασίας στους 130 °C με ρυθμό 15 °C/min, άνοδος στους 160 °C με ρυθμό 4 °C/min παραμονή επί 15min και τελικά άνοδος στους 300 °C όπου και παραμένει επί 15 min.

Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (selective ion monitoring –SIM- GC/MS). Στη μέθοδο αυτή, που χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό 27 απλών πολυφαινολών και τερπενικών οξέων, γίνεται καταγραφή επιλεγμένων ιόντων-θραυσμάτων (selective ion monitoring –SIM) χαρακτηριστικών των προς προσδιορισμό συστατικών, τα οποία έχουν καθορισθεί από μέτρηση σιλυλιωμένων παραγώγων προτύπων ουσιών.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός (ανίχνευση) των συστατικών βασίζεται στην παρουσία στο χρωματογράφημα τριών χαρακτηριστικών για κάθε συστατικό ιόντων, σε χρόνο κατακράτησης (RT) $\pm$ 0.05 min του αναμενόμενου χρόνου κατακράτησης των συστατικών στα πρότυπα διαλύματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε ένα από τα τρία ιόντα που ορίζεται ως ιόν στόχος (targetion), ενώ επιβεβαιώνεται από τους λόγους της έντασης απόκρισης των άλλων 2 ιόντων (qualifierions) προς την ένταση απόκρισης του ιόντος στόχου στο δείγμα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου. Ως τέτοιο επελέγη η 3-(4-υδροξυ-φαινυλο)-1-προπανόλη. Μια σειρά προτύπων διαλυμάτων – μιγμάτων των συστατικών που προσδιορίζονται – οδήγησε στην κατασκευή καμπυλών αναφοράς για κάθε συστατικό σε

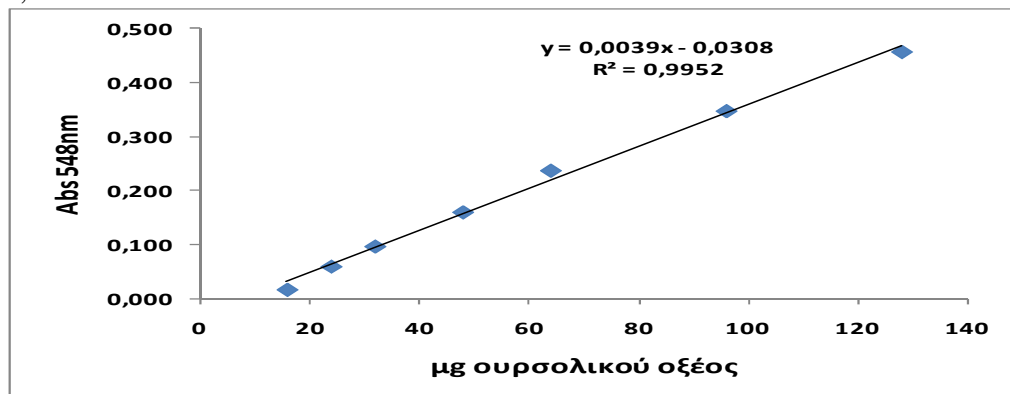
περιοχή συγκεντρώσεων από 80–3500 ng/ml. Οι καμπύλες αναφοράς ήταν γραμμικές με συντελεστές γραμμικής συσχέτισης  $R^2 > 0,996$  για όλες τις ουσίες που προσδιορίστηκαν.

### II.6.10. Προσδιορισμός των ολικών τριτερπενοειδών

Το περιεχόμενο των συνολικών τριτερπενοειδών των υδατικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με χρωματομετρική μέθοδο, βασισμένη στους Fan και He (2006); Hiai κ.α. (1976) αν και παρόμοια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και από τους Shiau (2009); Chen κ.α. (2010), με τη διαφορά ότι αυτοί ταυτοποίησαν σαπωνίνες και χρησιμοποίησαν διαφορετικό πρότυπο.

Αρχή μεθόδου: Η βανιλίνη και το οξικό οξύ είναι χρωμογόνα αντιδραστήρια. Συγκεκριμένα η βανιλίνη εύκολα οξειδώνεται και δίνει βαθύ πορφυρό χρώμα όταν οξειδώνεται από το υπερχλωρικό οξύ. Ο μηχανισμός της αντίδρασης προκαλεί αφυδάτωση των υδροξυλομάδων, αυξάνοντας τον αριθμό των διπλών δεσμών και δίδοντας συζευγμένο σύστημα (Madland, 2013).

Εφαρμογή της μεθόδου: 200μl υδατικού εκχυλίσματος μυκηλίων ή καρποσωμάτων μεταφέρονται σε σωλήνες με βιδωτό πώμα και ξηραίνονται με λυοφιλίωση. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,3 ml διαλύματος 5% βανιλίνης σε glacial οξικό οξύ (β/ο) και 1 ml διαλύματος υπερχλωρικού οξέως. Το διάλυμα αναδεύεται με vortex, θερμαίνεται για 45 λεπτά στους 60 °C και στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί προσθήκη 5 ml glacial οξικού οξέως, το διάλυμα αναδεύεται καλά με vortex, και η απορρόφηση του διαλύματος μετράται στα 548 nm. Για την ποσοτικοποίηση χαράχθηκε πρότυπη καμπύλη με χρήση διαλύματος (0,32 mg/ml) ουρσολικού οξέος, του οποίου η πρότυπη καμπύλη είναι:  $y=0,0039x-0,0308$ .



Εικόνα II.1.: Πρότυπη καμπύλη με το ουρσολικό οξύ να είναι το διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (πρότυπο διάλυμα)

### II.6.11. Αντιοξειδωτικές δοκιμές

#### II.6.11.1. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH<sup>•</sup>)

Αρχή μεθόδου: Η εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Απόρροια της δέσμευσης αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας είναι ο αποχρωματισμός του διαλύματος. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515 nm, με σε φωτόμετρο ELISA.

Εφαρμογή της μεθόδου: Σε φιαλίδια erpendorf προστίθενται 25 μl δείγματος– εκχυλίσματος, αδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 1mg/ml ή μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό και 975 μl DPPH<sup>•</sup> [Διάλυμα DPPH<sup>•</sup> σε MeOH (3,9 mg σε 100 ml)]. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Η απορρόφηση μετράται σε t=0 min και t=30 min στα 515 nm σε φωτόμετρο ELISA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω της πρότυπης καμπύλης,  $y=69,24x+0,3529$ .

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς: Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,4, 1,6, 2 mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος  $\psi=f(x)$ , όπου  $x$  η ποσότητα του Trolox σε mM και  $y$  η %  $\Delta A_{515}$ , όπου:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515}^0 - A_{515}^{30}) / A_{515}^0] \times 100$$

#### II.6.11.2. Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability)

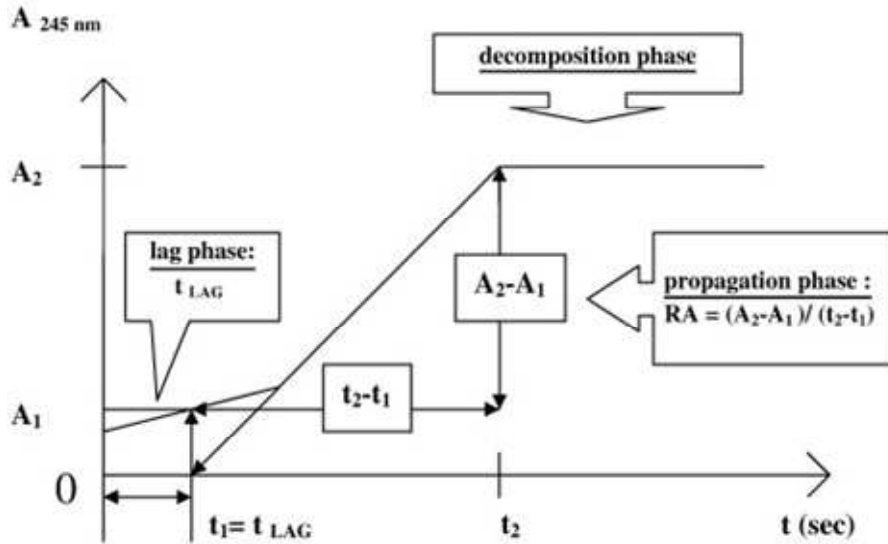
Για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες με διάφορα εύρη λήψης όγκων και τα αντίστοιχα tips τους, αναλυτικός ζυγός, vacutainer tube και ογκομετρική φιάλη για την παρασκευή διαλυμάτων, αποσταγμένο νερό, συσκευή Vortex για την ανάδευση και ομοιογενοποίηση των δειγμάτων και των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, καθώς επίσης και φωτόμετρο ELISA reader (Biotek PowerWave XS2).

Αρχή της μεθόδου: Με το διάλυμα του θεικού χαλκού ( $\text{CuSO}_4$ ) προκαλείται οξείδωση της LDL κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξειδία. Η ανίχνευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση (LagTime).

Αναλυτική πορεία: Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο ορός που απομονώθηκε από υγιείς εθελοντές. Ο ορός αίματος είναι το υπερκείμενο που προκύπτει μετά από φυγοκέντριση δείγματος αίματος που έχει ληφθεί απουσία αντιπηκτικού και έχει παραμείνει για 10-15 min μέχρι να ολοκληρωθεί η πήξη του. Παρασκευάζεται stock διάλυμα  $\text{CuSO}_4$  συγκέντρωσης 20mM, για το οποίο ζυγίζονται 0,0125g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (MW=249,68) και διαλύονται σε 2,5ml αποσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$ . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, παρασκευάζεται working διάλυμα  $\text{CuSO}_4$  συγκέντρωσης 200  $\mu\text{M}$ , για το οποίο αραιώνεται 1:100 το stock διάλυμα  $\text{CuSO}_4$  με αποσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$ . Δηλαδή, λαμβάνονται 20  $\mu\text{l}$  και αραιώνονται με αποσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  έως όγκο 2000  $\mu\text{L}$ . Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα PBS buffer, για το οποίο αναδιαλύονται σε 1000 ml αποσταγμένου νερού 9 g χλωριούχου νατρίου ( $\text{NaCl}$ ), 0,9076g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2408g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ρυθμίζεται το pH στο 7,4. Παρασκευάζεται διάλυμα ορού αραιωμένο 1:12 με PBS buffer. Δηλαδή, λαμβάνονται 5 $\mu\text{L}$  ορού και αραιώνονται με PBS έως όγκο 60 $\mu\text{l}$  σε erpendorfs των 2ml. Έπειτα, παρασκευάζεται μίγμα  $\text{CuSO}_4$  και PBS, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 16 $\mu\text{M}$ . Για την πλάκα που χρησιμοποιήθηκε, η οποία περιείχε 96 θέσεις και απορροφά στο υπεριώδες (ultraviolet, UV) φάσμα ακτινοβολιών, λήφθηκαν 23ml PBS και προστέθηκαν 2ml  $\text{CuSO}_4$ . Σε κάθε θέση της πλάκας τοποθετούνται 20 $\mu\text{l}$  αραιωμένου ορού. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230 $\mu\text{l}$  μίγματος PBS- $\text{CuSO}_4$ , η πλάκα εισάγεται στο ELISA reader και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 8h ανά 2 min, στην περίπτωση των μυκηλίων, ενώ για 7h για τα καρποσώματα. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού διεξήχθη τόσο χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος (control) όσο και με προσθήκη 0,5 και 1,0 $\mu\text{l}$  εκχυλίσματος.

Η καμπύλη που προκύπτει μετά από το πρωτόκολλο οξείδωσης ορού είναι της μορφής που φαίνεται στην Εικόνα II.2. Καταγράφεται φωτομετρικά η απορρόφηση των παραγόμενων συζυγών διενίων (conjugated diene lipid hydroperoxides, CD) στα 245 nm. Η χρονική πορεία της οξείδωσης της LDL παρουσιάζει αρχικά μία φάση κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση (lag-phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των αντιοξειδωτικών του δείγματος, ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, λόγω του σχηματισμού CD (propagation phase) όταν εξαντληθούν τα αντιοξειδωτικά. Η αντίσταση της LDL στην οξείδωση υπολογίζεται σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Η χρονική υστέρηση καθορίζεται γραφικά ως το σημείο τομής των εφαπτομένων των τμημάτων της καμπύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (σημείο στο

οποίο άρχισε να αυξάνεται η απορρόφηση). Η μέτρηση περιλαμβάνει την εύρεση του lag time σε δείγματα ορού πριν και μετά από την παρέμβαση. Εάν παρουσιασθεί αύξηση του χρόνου επαγωγής σε σχέση με αυτόν πριν από την παρέμβαση, ορίζουμε την αναστολή στην οξειδωτική τροποποίηση της LDL, λόγω της αύξησης των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών.



**Εικόνα Π.2.:** Κινητική της επαγόμενης από το χαλκό οξείδωσης των λιπιδίων του ορού *in vitro*. Η τιμή  $t_{LAG}$  αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών του ορού. Η τιμή RA αντιπροσωπεύει τη μετατροπή των PUFAs σε υδροϋπεροξειδία λίπους (συζευγμένα διένια). A=απορρόφηση, t=χρόνος.

## III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παραλαβή εκχυλισμάτων μυκηλίων και καρποσωμάτων (έπειτα από υγρή και στερεή καλλιέργεια, αντίστοιχα) προκειμένου να εξεταστεί η σύστασή των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες και τερπενοειδή καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

### III. 1. Συγκριτική μελέτη φυσιολογικών-βιοχημικών χαρακτηριστικών αύξησης πέντε στελεχών *Ganoderma* σε υγρό θρεπτικό μέσο

Κατά την υγρή καλλιέργεια των μανιταριών γένους *Ganoderma* τα είδη: *G. adspersum*, *G. resinaceum*, *G. applanatum*, *G. lucidum* 330 και 331 καλλιεργήθηκαν υπό μορφή μυκηλίου με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη και λόγο C/N 30/1. Διερευνήθηκε η παραγωγή βιομάζας (X, g/l), ενδοπολυσακχαριτών (IPS), εξωπολυσακχαριτών (EPS) και λιπιδίων (L, g/l και L,% κ.β) σε συνδυασμό με την κατανάλωση της γλυκόζης (Glc<sub>c</sub>, g/l) σε στατική καλλιέργεια και σε στατική/αναδεδυμένη για τα *G. lucidum*.

Το pH του μέσου ανάπτυξης την ημέρα έναρξης και την ημέρα ολοκλήρωσης της ζύμωσης, παρουσιάζεται στον Πίνακα III.1. Παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας όλων των ειδών *Ganoderma* το pH του μέσου ανάπτυξης είναι όξινο, δεν παραμένει σταθερό αλλά σταδιακά μειώνεται, κάτι που συνάδει με τη φυσιολογία του γένους *Ganoderma*.

Πίνακας III.1.: Προσδιορισμός του pH στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης

Μακρομύκητες	Διάρκεια ζύμωσης (ημέρες)	pH <sub>αρχικό</sub>	pH <sub>τελικό</sub>	% Πτώση του pH
<i>G. resinaceum</i>	12	5,43	4,75	9,8
<i>G. adspersum</i>	13	5,43	4,9	12,5
<i>G. applanatum</i>	14	6,11	5,26	23,9
<i>G. lucidum</i> 330	27	5,65	4,455	21,2
<i>G. lucidum</i> 331	27	6,22	5,72	8,0

#### III.1.1. Προσδιορισμός παραμέτρων αύξησης και παραγωγικότητας σε υγρή καλλιέργεια μακρομυκήτων

Μετά το πέρας της ζύμωσης καταγράφηκε η βιομάζα προ (νωπή) και μετά της ξήρανσης, υπολογίστηκε η % υγρασία και εκτιμήθηκε η % Glc<sub>c</sub>, ο συντελεστής απόδοσης Y<sub>X/Glc</sub>, δηλαδή ο λόγος της συγκέντρωσης της παραγόμενης βιομάζας (X) προς τη συγκέντρωση του καταναλωθέντος υποστρώματος και υπολογίστηκε ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης ανά ημέρα (Glc/d). Επιπλέον, μετρήθηκε η περιεχόμενη, στο μέσο αύξησης, ποσότητα EPS και η ποσότητα των IPS η οποία περιέχεται στη ξηρή βιομάζα και υπολογίστηκε ο συντελεστής απόδοσης Y<sub>EPS/Glc</sub> και Y<sub>IPS/Glc</sub>, δηλαδή ο λόγος της συγκέντρωσης των παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών και ενδοπολυσακχαριτών αντίστοιχα, προς τη συγκέντρωση του καταναλωθέντος υποστρώματος.

Πίνακας III.2A.: Μέσες τιμές βιομάζας (X, g/l), κατανάλωσης γλυκόζης (Glc<sub>c</sub> %) και υγρασίας του μυκηλίου των μακρομυκήτων *Ganoderma* σε υγρή καλλιέργεια με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη, στους 30 °C.

Μακρομύκητες	Ολοκλήρωση ζύμωσης (ημέρες)	X (g/l)	Υγρασία (%)	Glc <sub>c</sub> (%)	Glc/d	Y <sub>X/Glc</sub>
<i>G. resinaceum</i>	12	11,92	83,37	41,83	1,44	0,44
<i>G. adspersum</i>	13	11,52	85,49	45,07	1,43	0,56
<i>G. applanatum</i>	14	18,80	91,98	81,16	2,40	0,59
<i>G. lucidum</i> 330	27	13,09	85,85	78,23	1,20	0,41
<i>G. lucidum</i> 331	27	13,94	88,19	97,70	1,50	0,41

Τέλος, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα της ξηρής βιομάζας σε λιπίδια (L). Στον Πίνακα III.2A και στον Πίνακα III.2B καταγράφονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων.

Αρχικά παρατηρείται ότι όλοι οι μακρομύκητες *Ganoderma* που δοκιμάστηκαν παρήγαγαν σημαντική ποσότητα βιομάζας. Συγκεκριμένα, ο *G. applanatum* παρήγαγε την περισσότερη βιομάζα (18,8 g/l), ακολούθησαν οι μύκητες *G. lucidum* (13-14 g/l) και τέλος οι *G. resinaceum* και *G. adspersum* με ~12 g/l τιμή βιομάζας. Ακόμα φαίνεται ότι η ζύμωση του *G. applanatum* ολοκληρώθηκε σύντομα (14<sup>η</sup> ημέρα) όταν η γλυκόζη του θρεπτικού μέσου είχε καταναλωθεί σε πολύ μεγάλο υψηλό ποσοστό (81%) σε αντίθεση με τα στελέχη *G. lucidum* που για την παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας βιομάζας κατανάλωσαν (σχεδόν) όλη τη γλυκόζη του υποστρώματος σε 27 ημέρες. Τέλος, με την παραγωγή λίγο χαμηλότερης βιομάζας αλλά σε σύντομο χρόνο ολοκληρώθηκε και η ζύμωση από τους μύκητες *G. resinaceum* και *G. adspersum*. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση αυτή, η μακροσκοπική εξέταση των κωνικών έδειξε πλήρωση τους με βιομάζα και έλλειψη θρεπτικού μέσου, οπότε και αποφασίστηκε η διακοπή της ζύμωσης. Τότε παραδόξως διαπιστώθηκε η χαμηλή κατανάλωση και ποσότητα της γλυκόζης. Επίσης, η απόδοση  $Y_{X/S}$  που προέκυψε ήταν ικανοποιητική και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,41 έως 0,59, με τα στελέχη *G. lucidum* να έχουν το μικρότερο συντελεστή απόδοσης ( $Y_{X/S}$ ) και το *G. applanatum* τη μεγαλύτερη.

**Πίνακας III.2B.:** Μέσες τιμές των παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών (EPS-g/l), ενδοπολυσακχαριτών (IPS-g/l, % κ.β.) και λιπιδίων (L-% κ.β.) και συντελεστών απόδοσης των EPS και IPS βάσει της καταναλωθείσας γλυκόζης ( $Y_{EPS/Glc}$  και  $Y_{IPS/Glc}$  αντίστοιχα) των *Ganoderma* spp. στο τέλος της καλλιέργειας τους.

Μακρομύκητες	EPS (g/l)	IPS (g/l)	IPS (% κ.β.)	L (% κ.β.), Soxhlet	L (% κ.β.), Folch	$Y_{EPS/Glc}$	$Y_{IPS/Glc}$
<i>G. resinaceum</i>	0,520	11,52	65,04	4,20	4,46	0,028	0,67
<i>G. adspersum</i>	0,464	9,61	69,81	5,29	7,13	0,027	0,55
<i>G. applanatum</i>	0,583	14,17	78,35	4,42	2,84	0,018	0,42
<i>G. lucidum</i> 330	0,415	7,83	63,65	4,37	5,60	0,013	0,24
<i>G. lucidum</i> 331	0,587	7,13	53,87	6,54	4,13	0,015	0,18

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα III.2B., η ποσότητα των EPS κυμάνθηκε από 0,415 (*G. lucidum* 330) έως ~0,58 g/l (*G. lucidum* 331 και *G. applanatum*). Συγκεκριμένα, το *G. applanatum* παρήγαγε αντίστοιχη ποσότητα EPS ως προς την κατανάλωση γλυκόζης ( $Y_{EPS/Glc}$ ) με το *G. lucidum* 331. Όμως η μικρότερη παραγωγή βιομάζας του στελέχους αυτού δείχνει ότι η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε από τον μύκητα περισσότερο για τη σύνθεση EPS από ό,τι για βιομάζα. Αυτό γίνεται ακόμα πιο εμφανές στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* που παρουσιάζουν και τις μεγαλύτερες  $Y_{EPS/Glc}$ , αλλά όχι και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας. Επίσης, ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος ανά ημέρα (Glc/d) ήταν ο υψηλότερος στην καλλιέργεια του *G. applanatum*, ενώ στα υπόλοιπα στελέχη ήταν πολύ χαμηλότερος με την μικρότερη τιμή να εμφανίζεται στον *G. lucidum* 330, όπου πάλι φαίνεται ότι η γλυκόζη τροφοδότησε την παραγωγή βιομάζας αντί για EPS. Πολύ υψηλή συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών συνέθεσαν όλα τα στελέχη *Ganoderma* σε απόλυτες (~7-14g/l) και σε σχετικές τιμές (>50% κ.β.), που κατά αύξοντα αριθμό ήταν ως εξής: *G. applanatum* > *G. resinaceum* ~ *G. adspersum* > *G. lucidum* 330. Μάλιστα για τα στελέχη *G. resinaceum*, *G. adspersum* και *G. applanatum* αυτό έγινε σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, μετά από 12-14 ημέρες ζύμωσης. Ωστόσο, ο συντελεστής μετατροπής της γλυκόζης σε IPS ήταν μεγαλύτερος στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* από ό,τι στο *G. applanatum*, οπότε και φαίνεται η προτίμηση της χρησιμοποίησης της γλυκόζης στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* για

παραγωγή IPS παρά για βιομάζα. Αντίθετα, στον μακρομύκητα *G. applanatum* η γλυκόζη του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα για παραγωγή IPS και βιομάζας.

Ακόμα, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης IPS που καταγράφηκε στον μύκητα *G. applanatum* κρίθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός της σύστασης των IPS σε απλά σάκχαρα (Πίνακας III.3), όπου και φάνηκε πως η γλυκόζη ήταν το κύριο σάκχαρο που ανιχνεύτηκε και μάλιστα σε ποσοστό 73%. Σε πολύ μικρότερη ποσότητα ανιχνεύτηκε ξυλιτόλη, φρουκτόζη και μαννιτόλη.

**Πίνακας III.3.:** Σύσταση ολικών IPS σε απλά σάκχαρα στο *G. applanatum*

Μακρομύκητας	Σάκχαρα (% κ.β. των ολικών IPS)			
	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαννιτόλη	Ξυλιτόλη
<i>G. applanatum</i>	73,37	8,7	7,07	10,87

Όσο αφορά στο % κ.β. του λιπιδιακού περιεχομένου των πέντε *Ganoderma* που εξετάστηκαν, αυτό κυμάνθηκε από 2,8 έως 7,13 (Πίνακας III.2B), με τις μεθόδους Soxhlet και Folch να παρουσιάζουν κάποιες διαφορές. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση των IPS, η ποσότητα των λιπιδίων που συντέθηκε ήταν μικρότερη στο μανιτάρι *G. applanatum*, ενώ η μέγιστη ποσότητα υπολογίστηκε στο *G. adspersum* (μέθοδος Folch) και στο *G. lucidum* (μέθοδος Soxhlet). Κατά συνέπεια, τα λιπίδια των δυο αυτών στελεχών αναλύθηκαν περαιτέρω και προς την σύστασή τους σε λιπαρά οξέα και τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα III.4.

**Πίνακας III.4.:** Ανάλυση των λιπαρών οξέων (Λ.Ο., % κ.β.) των παραγόμενων λιπιδίων από τα *G. adspersum* και *G. lucidum* 330

Λιπαρά οξέα	Μακρομύκητες	
	<i>G. adspersum</i>	<i>G. lucidum</i> 330
	Λ.Ο. (% κ.β.)	
<b>C14:0 (μυριστικό οξύ)</b>	1,0	1,0
<b>C16:0 (παλμιτικό οξύ)</b>	16,5	16,4
<b>C18:0 (στεατικό οξύ)</b>	7,5	1,1
<sup>Δ9</sup> <b>C18:1 (ελαϊκό οξύ)</b>	11,6	9,0
<sup>Δ9,12</sup> <b>C18:2 (λινελαϊκό οξύ)</b>	61,1	67,4
<b>ΛΟΙΠΑ*</b>	2,3	5,1

\*ΛΟΙΠΑ Λ.Ο., κυρίως C8:0, C10:0, C12:0, C20:0

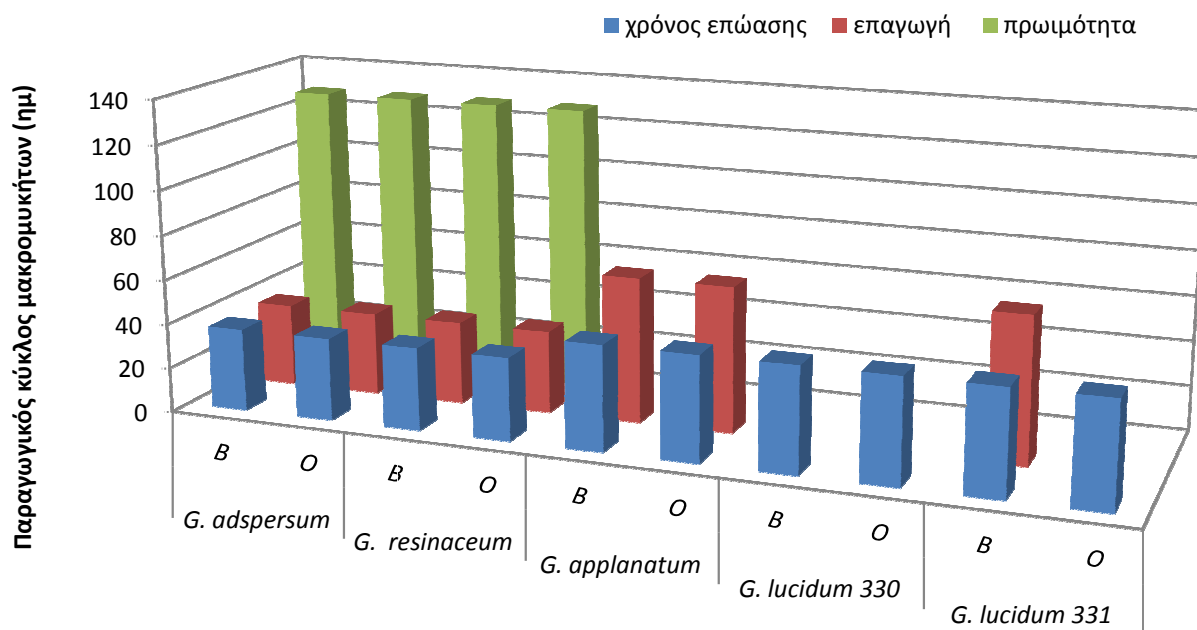
Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι το λιπιδιακό προφίλ των δυο *Ganoderma* μοιάζει αρκετά, αφού και στα δυο μανιτάρια σε μεγαλύτερη ποσότητα εντοπίστηκε το <sup>Δ9,12</sup>C18:2 και μετά το C16:0, ενώ την χαμηλότερη ποσότητα την κατείχε το C14:0. Ωστόσο, στο *G. adspersum* ανιχνεύτηκαν υψηλότερα ποσοστά C18:0 και C18:1 σε σχέση με το *G. lucidum* 330.

### III. 2.Στερεή καλλιέργεια μανιταριών *Ganoderma spp*

Στην παράγραφο II.5 και στα αντίστοιχα εδάφια παρουσιάστηκε όλη η διαδικασία με την οποία έλαβε χώρα η στερεή ζύμωση.

#### III.2.1. Παραγωγή καρποσωμάτων των ειδών *Ganoderma spp* σε σάκους με λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα

Στο Διάγραμμα III.1 δίνονται στοιχεία που αφορούν τις καλλιεργητικές παραμέτρους (χρόνος επώασης, χρόνος από εμβολιασμό μέχρι εμφάνιση πρώτων καταβολών- επαγωγή, χρόνος από



**Στέλεχος/Υπόστρωμα**

**Διάγραμμα III.1.:** Στερεή ζύμωση μανιταριών *Ganoderma* σε υπόστρωμα βελανιδιάς (B) και οξιάς (O) και καταγραφή των καλλιεργητικών φάσεων της επώασης, της επαγωγής και της πρωιμότητας του παραγωγικού κύκλου

επώαση έως 1<sup>η</sup> συγκομιδή-πρωιμότητα) της στερεής ζύμωσης των μανιταριών *Ganoderma* στα υποστρώματα B και O.

Αρχικά βλέπουμε ότι μανιτάρια *G. adspersum* και *G. resinaceum* ολοκλήρωσαν με επιτυχία τις καλλιεργητικές φάσεις της επώασης και της καρποφορίας και στα δυο υποστρώματα, ενώ το *G. applanatum* αν και έδωσε καταβολές, αυτές δεν αναπτύχθηκαν σε μανιτάρια. Τα στελέχη των *G. applanatum* και *G. lucidum* ολοκλήρωσαν την επώαση σε περισσότερο χρόνο (47 ημέρες) από ό,τι τα *G. adspersum* και *G. resinaceum* (37 ημέρες). Ειδικά για τα *G. lucidum* πρόκειται για ιδιαίτερα αργής ανάπτυξης μανιτάρια και τα υποστρώματα καλλιέργειας τους μολύνονται εύκολα από μύκητες ανταγωνιστές και βακτήρια, για αυτό και δεν ολοκλήρωσαν με επιτυχία τον όλο τον καλλιεργητικό τους κύκλο. Σε ό,τι αφορά το στάδιο της επαγωγής, τα μανιτάρια μας χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: στα *G. adspersum* και *G. resinaceum* που επώαστηκαν σε B και O σε 37

**Πίνακας III.5.:** Ποσοτικά (αριθμός καρποφοριών, απόδοση-A %, B.A. %) και ποιοτικά (υγρασία, μέσο βάρος καρποφοριών) χαρακτηριστικά των καρποφοριών κατά την καλλιέργεια των *G. adspersum* και *G. resinaceum* σε υπόστρωμα βελανιδιάς (B) και οξιάς (O)

Μακρομύκητες	Υπόστρωμα καλλιέργειας	Αριθμός καρποφοριών	Συν. Βάρος Καρποφοριών (g)	% Υγρασία Νωπών Καρποφοριών	Μέσο ξ. β Καρποφοριών (g)	A %	B. A. %
<i>G. adspersum</i>	B	25	13,05	27,79	0,52	0,12	2,38
	O	4	2,71	19,56	0,68	0,07	0,40
<i>G. resinaceum</i>	B	28	34,57	24,66	1,23	0,18	6,32
	O	16	5,63	10,78	0,35	0,10	0,83

ημέρες και τα *G. applanatum* και *G. lucidum* που χρειάστηκαν διπλάσιο χρόνο. Τελικά, ώριμες καρποφορίες συγκομίστηκαν μετά από 128 ημέρες στα είδη *G. adspersum* και *G. resinaceum* και

μάλιστα αυτές ήταν περισσότερες στο υπόστρωμα της βελανιδιάς και για τα δυο στελέχη (25 και 28 καρποσώματα αντίστοιχα, Πίνακας III.5).

Επίσης, το συνολικό βάρος, το μέσο βάρος των καρποφοριών, όπως και η % Β.Α. ήταν σημαντικά μεγαλύτερα στο υπόστρωμα Β και για τα δυο στελέχη, με το *G. resinaceum* να δίνει πολύ υψηλότερες τιμές από το *G. adspersum* (34,57g, 1,23g και 6,32%, αντίστοιχα). Τέλος, παρατηρείται ότι η υγρασία των καρποφοριών *Ganoderma* είναι χαμηλή (<30%) σε σύγκριση με άλλα είδη μανιταριών και υψηλότερη στο υπόστρωμα της βελανιδιάς από ό,τι της οξιάς.

### III.2.2. Προσδιορισμός πολυσακχαριτών και λιπιδίων

Όπως και στη περίπτωση της ξηρής βιομάζας των μυκηλίων, έτσι και στη ξηρή βιομάζα των καρποσωμάτων, προσδιορίστηκε το % κ.β. των IPS και των λιπιδίων. Χρησιμοποιήθηκε επιπλέον καρπόσωμα μανιταριού *G. lucidum*, ως μάρτυρας καθώς πρόκειται για ένα είδος μανιταριού ευρείας αποδοχής και χρήσης λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Το συγκεκριμένο στέλεχος (AMRL 332), είχε προηγουμένως μελετηθεί στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ.

**Πίνακας III.6.:** Σχετικές (% κ.β.) μέσες τιμές ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων (L) μανιταριών *G. adspersum*, *G. resinaceum* και *G. lucidum* που καλλιεργήθηκαν στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ .

Όνομα	Υπόστρωμα καλλιέργειας	IPS (% κ.β.)	L (% κ.β.)
<i>G. adspersum</i>	B	39,28	1,49
	O	43,68	ΔΕ*
<i>G. resinaceum</i>	B	41,80	0,80
	O	39,26	ΔΕ
<i>G. lucidum</i> 332	B	47,95	2,92

\* ΔΕ: δεν εξετάστηκε

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι το ποσοστό των λιπιδίων (% κ.β.) των καρποσωμάτων των *G. adspersum*, *G. resinaceum* είναι μικρό (<3%) και χαμηλότερο από αυτό του *G. lucidum*. Όσον αφορά στο % κ.β. των IPS, αυτό κυμάνθηκε από ~ 39-44% και δεν εμφάνισε μεγάλες διαφορές ανάμεσα στα είδη *G. adspersum* και *G. resinaceum* ούτε και μεταξύ των υποστρωμάτων Β και Ο. Λίγο υψηλότερη τιμή παρουσιάστηκε στο *G. adspersum* στη βελανιδιά και στο *G. resinaceum* στην οξιά, μικρότερες ωστόσο από την τιμή των IPS του *G. lucidum*.

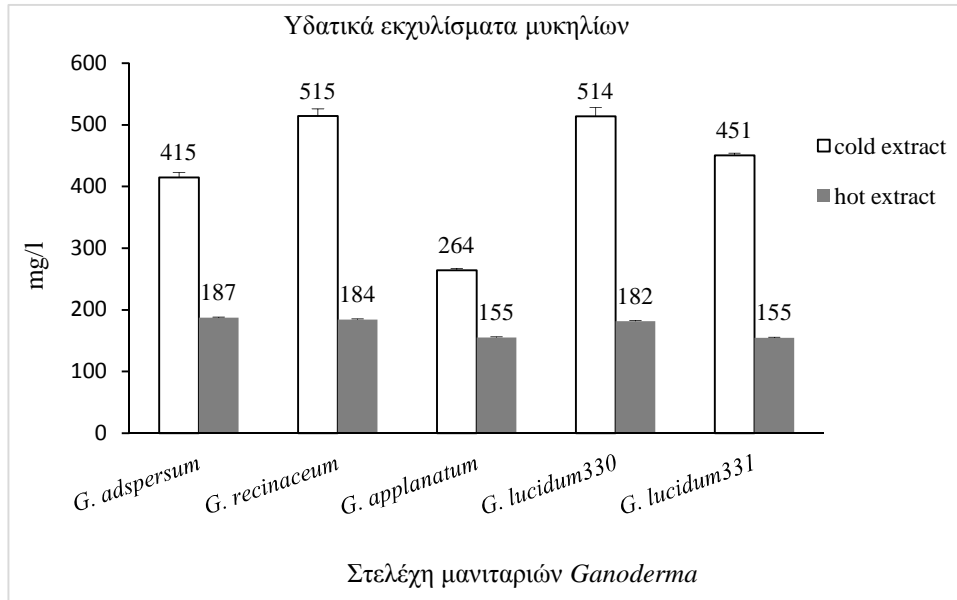
### III. 3. Προσδιορισμός ολικών φαινολών και τερπενοειδών στα υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων και καρποσωμάτων

Στην παράγραφο II.6.4 περιγράφηκε ο τρόπος με τον οποίο έγινε η εκχύλιση ώστε να ληφθούν τα υδατικά εκχυλίσματα. Στα οποία έγινε μια σειρά από χημικές αναλύσεις προκειμένου να προσδιοριστεί το περιεχόμενό τους σε φαινολικές ενώσεις και τερπενοειδή. Δίπλα στο κάθε είδος έχει σημειωθεί «Ο» που αντιστοιχεί στο υπόστρωμα οξιά και «Β» για το υπόστρωμα βελανιδιά. Τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν από τον υπολογισμό των μέσων όρων των επαναλήψεων, καθώς και από τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης (SD).



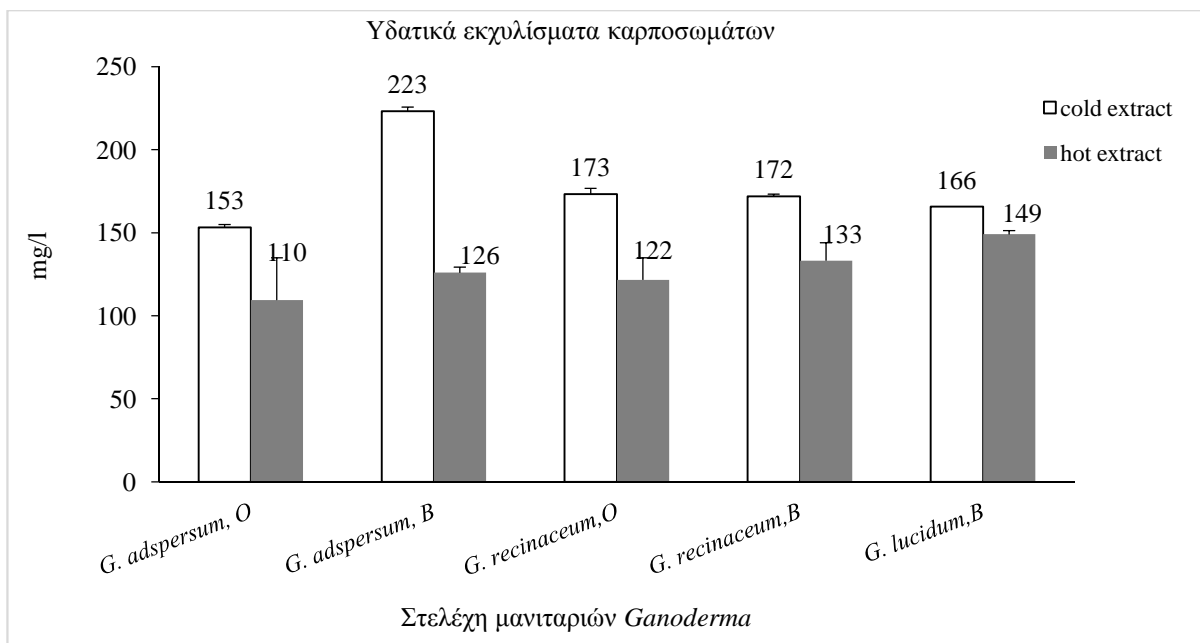
III.3.1. Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου ακολουθήθηκε η μέθοδος Folin- Ciocalteu, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα.



**Διάγραμμα III.2.:**  
Ολικό φαινολικό περιεχόμενο των υδατικών εκχυλισμάτων των μυκηλίων

Από το Διάγραμμα III.2 φάνηκε ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των μυκηλιακών ΨΕ ήταν  $\leq 515$  mg/l, ενώ των μυκηλιακών ΘΕ δεν ξεπερνούσε τα 190mg/l. Ως προς το είδος, φάνηκε ότι το φαινολικό περιεχόμενο των μυκηλιακών ΨΕ, διακυμάνθηκε: ***G. resinaceum* ~ *G. lucidum 330* > *G. lucidum 331* > *G. adspersum* > *G. applanatum***, ενώ για τα ΘΕ ήταν: ***G. adspersum* > *resinaceum* > *lucidum 330* > *G. applanatum* = *G. lucidum 331*.**



**Διάγραμμα III.3.:** Ολικό φαινολικό περιεχόμενο των υδατικών εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων

Όσον αφορά στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων από το Διάγραμμα III.3 διαπιστώνουμε ότι το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των ΨΕ ήταν  $\leq 2.23$  mg/l, ενώ των ΘΕ δε ξεπερνούσε τα 150 mg/l. Συγκεκριμένα, το φαινολικό περιεχόμενο των κρύων εκχυλισμάτων, διακυμάνθηκε ως προς το είδος: *G. adspersum*, B > *G. resinaceum*, O ~ *G. resinaceum*, B > *G. lucidum* 332, B > *G. adspersum*, O ενώ για τα ΘΕ ήταν: *G. lucidum* 332, B > *G. resinaceum*, B > *G. adspersum*, B > *G. resinaceum*, O > *G. adspersum*, O.

**III.3.2. Προσδιορισμός απλών πολυφαινόλων με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)**

Ο προσδιορισμός των απλών πολυφαινόλων και τερπενικών οξέων των υδατικών εκχυλισμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι πρότυπες απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα που προσδιορίστηκαν με GC/MS ως τριμεθυλσυλλαιθέρες.

**Πίνακας III.7.:** Οι πρότυπες απλές πολυφαινόλες και τερπενικά οξέα

Ένωση	Ιόν-στόχος (target ion) (m/z) <sup>a</sup>	Ιόντα επιβεβαίωσης (qualifier ions) (m/z) <sup>a</sup>
Πολυφαινόλες		
Βανιλίνη	194	209
Κινναμωμικό οξύ	205	220
Τυροσόλη	179	267, 282
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ	267	223, 193
p-Υδροξυφαιτυλοξικό οξύ	252	296, 281
3-(4-Υδροξυφαιτυλ)-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-Διϋδροξυφαιτυλοξικό οξύ	384	267, 179
Συριγγικό 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
Σιναπικό οξύ	368	353, 338
Ρεσβερατρόλη	444	445, 443
Χρυσίνη	383	384
Επικατεχίνη	368	355, 474
Ναριγκενίνη	473	296
Κατεχίνη	368	355, 474
Γενιστεΐνη	473	
Καμπερόλη	559	560
Χλωρογενικό οξύ	345	307, 324
Κερκετίνη	647	559, 575
Μυρσετίνη	735	647, 575
Λουτεολίνη	559	471, 399
Τερπενικά οξέα		
Ολεανολικό οξύ	203	320, 482
Ουρσολικό οξύ	203	320
Μασλινικό οξύ	203	320

a: αφορούν τους τριμεθυλσυλλαιθέρες των συστατικών

Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται οι απλές πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων που ταυτοποιήθηκαν μέσω GC-MS (μέθοδος SIM).

**Πίνακας III.8.:** Πολυφαινόλες (μg/g ξ.β.) σε υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων (μ) και καρποσωμάτων του *G. adspersum*. (Ο=υπόστρωμα οξιιά, Β=υπόστρωμα βελανιδιά)

Απλές πολυφαινόλες	<i>G. adspersum</i> (μ)		<i>G. adspersum</i> , Ο		<i>G. adspersum</i> , Β	
	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)
Βανιλίνη	0,638	ΔΑ*	0,093	0,897	0,477	0,7745
Κινναμωμικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,08	2,184	0,555	1,332
Τυροσόλη	0,318	0,527	ΔΑ	0,0745	ΔΑ	0,2605
<i>p</i> -OH-βενζοϊκό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,723	0,3605	1,419	0,418
Βανιλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,729	0,4685	1,535	0,631
Συριγλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	1,182	ΔΑ	3,516	1,467
Καφεϊκό οξύ	3,205	21,25	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
Ρεσβερατρόλη	5,511	ΔΑ	0,346	ΔΑ	0,187	ΔΑ
Φερουλικό οξύ	ΔΑ	0,2414	0,063	ΔΑ	ΔΑ	0,054
Πρωτοκατεχικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,405	0,225	0,601	ΔΑ
Γαλλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,156	ΔΑ	0,036	ΔΑ
<i>p</i> -OH-φαινυλοξικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	1,911	ΔΑ	2,536	1,223
Συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών	9,672	21,777	3,153	3,9845	7,689	4,883

\*ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φάνηκε ότι η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών στα υδατικά εκχυλίσματα των *G. adspersum* (Πίνακας III.8) κυμάνθηκε από 3,2 έως 21,7 μg/g ξ. βιομάζας. Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα των μυκηλίων με τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων Ο και Β, παρατηρείται ότι η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών στα μυκηλιακά εκχυλίσματα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των καρποσωμάτων. Ακόμα, η συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων Β είναι μεγαλύτερη από εκείνη των καρποσωμάτων Ο. Επιπλέον, με εξαίρεση την περίπτωση των εκχυλισμάτων *G. adspersum*, Β, η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών είναι μεγαλύτερη στα ΘΕ από ότι στα ΨΕ. Από τις απλές φαινόλες που ανιχνεύτηκαν αξίζει να σημειωθεί ότι: 1) η ρεσβερατρόλη εντοπίζεται σε όλα τα ΘΕ και 2) η βανιλίνη, το κινναμωμικό/*p*-OH-βενζοϊκό/βανιλικό οξύ εντοπίζεται σε όλα τα εκχυλίσματα καρποσωμάτων. Ακόμα, μεγάλη είναι η συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος στο μυκηλιακό θερμό εκχύλισμα, δεδομένου ότι αυτό διαμορφώνει και την συνολική συγκέντρωση σε απλές φαινόλες στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Επίσης, παρατηρείται διαφοροποίηση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στις πολυφαινόλες ανάλογα με το υπόστρωμα και το είδος της εκχύλισης, όπως π.χ. παρουσία του συριγλικού, φερουλικού και *p*-OH-φαινυλοξικό οξέος στα ΘΕ της Β και του πρωτοκατεχικού οξέος στο ΘΕ της Ο και όχι της Β.

Επίσης, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φάνηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα υδατικά εκχυλίσματα των *G. resinaceum* (Πίνακας III.9) κυμάνθηκε από 4,2 έως 50,9 μg/g ξ. βιομάζας. Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα των μυκηλίων με τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων Ο και Β, παρατηρείται ότι η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών στα μυκηλιακά εκχυλίσματα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των καρποσωμάτων. Ακόμα, η

συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων Β είναι μικρότερη από εκείνη των καρποσωμάτων Ο. Επιπλέον, η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών είναι μεγαλύτερη στα ΨΕ από ότι στα ΘΕ.

**Πίνακας III.9.:** Πολυφαινόλες (μg/g ξ.β.) σε υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων (μ) και καρποσωμάτων του *G. resinaceum* (Ο=υπόστρωμα οξιά, Β=υπόστρωμα βελανιδιά).

Απλές πολυφαινόλες	<i>G. resinaceum</i> (μ)		<i>G. resinaceum</i> , Ο		<i>G. resinaceum</i> , Β	
	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)
Βανιλίνη	ΔΑ*	ΔΑ	0,218	1,4635	0,386	0,7315
Κινναμωμικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,293	2,0925	0,365	1,21
Τυροσόλη	8,94	ΔΑ	ΔΑ	0,176	0,015	0,1545
<i>p</i> -ΟΗ-βενζοϊκό οξύ	25,441	ΔΑ	0,31	0,4795	0,17	0,2695
Βανιλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	2,077	1,4175	1,773	1,1145
Συριγκικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	4,367	2,0245	3,949	2,669
Καφεϊκό οξύ	11,712	17,5576	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
Ρεσβερατρόλη	ΔΑ	ΔΑ	0,361	0,991	ΔΑ	ΔΑ
Φερουλικό οξύ	4,799	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
<i>p</i> -ΟΗ-φαινυλοξικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,416	ΔΑ	0,555
Πρωτοκατεχικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,49	0,3315	0,356	0,234
3,4-Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	0,729	0,67	0,763	1,562
Γαλλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,061	ΔΑ
<b>Συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών</b>	50,892	17,5576	7,115	5,0885	5,907	4,2075

\*ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε

Από τις απλές φαινόλες που ανιχνεύτηκαν αξίζει να σημειωθεί ότι: η βανιλίνη, το κινναμωμικό οξύ, το *p*-ΟΗ-βενζοϊκό οξύ, το βανιλικό, συριγκικό, πρωτοκατεχικό οξύ και το 3,4 διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ εντοπίζονται σε όλα τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων. Ακόμα, μεγάλη είναι η συγκέντρωση των *p*-ΟΗ-βενζοϊκών και καφεϊκών οξέων μυκηλιακά εκχυλίσματα, δεδομένου ότι αυτά διαμορφώνουν και την συνολική συγκέντρωση σε απλές φαινόλες των αντίστοιχων εκχυλισμάτων. Επίσης, παρατηρείται διαφοροποίηση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στις πολυφαινόλες ανάλογα με το υπόστρωμα και το είδος της εκχύλισης, όπως είναι η απουσία της τυροσόλης στο ΨΕ της Ο, της ρεσβερατρόλης στα εκχυλίσματα της Β και του γαλλικού οξέος στο ΨΕ της Ο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα III.10 φάνηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα υδατικά εκχυλίσματα των *G. applanatum* ήταν ~ 7,9 και 12,44 μg/g ξ.β., με τα ΨΕ να είναι αυτά με την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε απλές φαινόλες σε σχέση με τα ΘΕ. Από τις απλές φαινόλες που ανιχνεύτηκαν αξίζει να σημειωθεί ότι και εδώ εντοπίζεται το καφεϊκό οξύ στα μυκηλιακά εκχυλίσματα και μάλιστα είναι αυτό που διαμορφώνει και την συνολική συγκέντρωση σε απλές φαινόλες των αντίστοιχων εκχυλισμάτων, επειδή μεταξύ των άλλων απλών φαινολών αυτό εντοπίστηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (στο κρύο εκχύλισμα).

**Πίνακας III.10.:** Πολυφαινόλες (μg/g ξ.β.) σε υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων (μ) του *G. applanatum*.

<i>G. applanatum</i> (μ)		
Απλές πολυφαινόλες	Cold (25 °C)	Hot (100 °C)
Τυροσόλη	1,248	ΔΑ*
<i>p</i> -OH-βενζοϊκό οξύ	3,26	ΔΑ
Καφφεϊκό οξύ	4,696	7,8761
Ρεσβερατρόλη	3,24	ΔΑ
<b>Συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών</b>	12,444	7,8761

\*ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φάνηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα υδατικά εκχυλίσματα των *G. lucidum* 330 και 331 (Πίνακας III.11) κυμάνθηκε από 4,39 έως 42,7 μg/g ξ. β.. Από τις απλές φαινόλες που ανιχνεύτηκαν αξίζει να σημειωθεί

**Πίνακας III.11.:** Πολυφαινόλες (μg/g ξ.β.) σε υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων (μ) του *G. lucidum* 330 και 331 και καρποσωμάτων του *G. lucidum* 332, Β. (Ο= οξιά, Β= βελανιδιά).

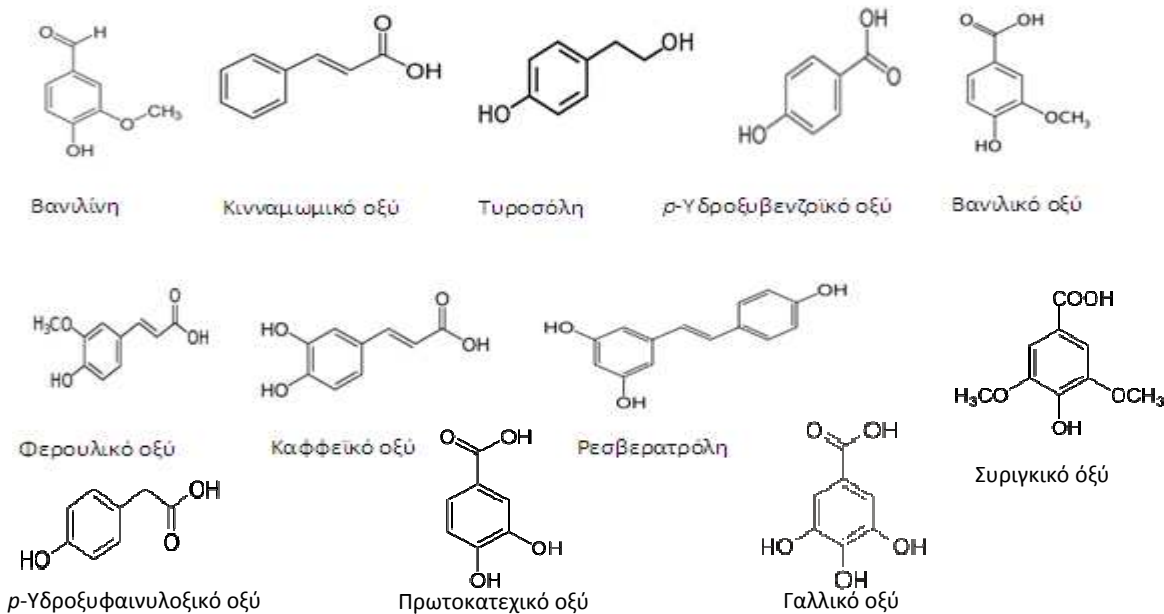
Απλές πολυφαινόλες	<i>G. lucidum</i> 330 (μ)		<i>G. lucidum</i> 331(μ)		<i>G. lucidum</i> 332, Β	
	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)	Cold (25°C)	Hot (100°C)
Βανιλίνη	0,988	ΔΑ*	ΔΑ	ΔΑ	0,234	0,9425
Κινναμωμικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	1,488	ΔΑ	0,996	2,238
Τυροσόλη	7,312	ΔΑ	2,604	ΔΑ	0,089	ΔΑ
<i>p</i> -OH-βενζοϊκό οξύ	16,856	ΔΑ	1,296	ΔΑ	0,186	0,767
Καφφεϊκό οξύ	14,648	15,0569	3,502	8,007	ΔΑ	ΔΑ
Ρεσβερατρόλη	2,909	ΔΑ	2,406	ΔΑ	0,135	ΔΑ
Φερουλικό οξύ	0,024	ΔΑ	0,16	ΔΑ	0,054	ΔΑ
Βανιλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,294	1,3205
Συριγλικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,101	1,498
<i>p</i> -OH-φαινυλοξικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,193	ΔΑ
Πρωτοκατεχικό οξύ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	0,107	0,3555
<b>Συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών</b>	42,737	15,0569	11,456	8,007	4,389	7,1215

\*ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε

ότι τα βανιλικό, συριγλικό, *p*-OH-φαινυλοξικό και πρωτοκατεχικό οξέα εντοπίστηκαν μόνο στα εκχυλίσματα καρποσωμάτων. Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα των μυκηλίων με τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων Β, παρατηρείται ότι η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών στα μυκηλιακά εκχυλίσματα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των καρποσωμάτων.Ακόμα, η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών είναι μεγαλύτερη στα ΨΕ από ότι στα ΘΕ, με εξαίρεση την περίπτωση του εκχυλίσματος *G. lucidum* 332, Β. Ακόμα, στην περίπτωση των μυκηλιακών εκχυλίσμάτων του *G. lucidum* 330 παρατηρείται ότι το *p*-OH-βενζοϊκό και το καφφεϊκό οξύ εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις υπόλοιπες φαινόλες, καθορίζοντας έτσι την συνολική συγκέντρωση των απλών φαινολών στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα.



Από όλους τους παραπάνω πίνακες που παρουσιάστηκαν φαίνεται ότι η συνολική συγκέντρωση των απλών πολυφαινολών των μελετώμενων μανιταριών κυμαίνεται από 3 έως 50μg/g ξηρού βάρους. Στα υδατικά μυκηλιακά εκχυλίσματα οι απλές φαινόλες που έχουν ταυτοποιηθεί στα περισσότερα *Ganoderma*, είναι: το *p*-OH-βενζοϊκό οξύ, το καφεϊκό οξύ και η ρεσβερατρόλη.



**Εικόνα III.1:** Απεικόνιση των απλών πολυφαινολών που ανιχνεύθηκαν στα υδατικά εκχυλίσματα των *Ganoderma*.

Ενώ, όσον αφορά στα αντίστοιχα καρποσωμικά, τα περισσότερα φαινολικά οξέα είναι: η βανιλίνη, το κινναμωμικό οξύ, η τυροσόλη, το *p*-OH-βενζοϊκό οξύ, το βανλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγικό οξύ και λιγότερο το καφεϊκό οξύ και η ρεσβερατρόλη. Στην Εικόνα III.1 απεικονίζονται οι απλές πολυφαινόλες που ταυτοποιήθηκαν με GC/MS.

Τα δείγματα εκτός από τη μέθοδο SIM μετρήθηκαν και με τη μέθοδο SCAN που καταγράφει το σύνολο των ιοντικών θραυσμάτων κάθε ένωσης και η αναγνώριση βασίζεται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας NIST 95 και Wiley. Ωστόσο μόνο στα μυκηλιακά εκχυλίσματα ήταν επιτυχής η ανάλυση με την μέθοδο αυτή.

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα και στα 5 μελετώμενα μανιτάρια ~30-56% ήταν οι συνολικά γνωστές ενώσεις με ~70-43% να είναι οι άγνωστες. Πιο συγκεκριμένα προέκυψε ότι τα εκχυλίσματα περιείχαν:

- Πουρίνη και γουανιδίνη
- Κιτρικό οξύ, 2,5-διμεθυλφαινυλοσουλφόνη, φουροσαρδονίνη (σεσκιτερπένιο)
- Αμινοξέα (L-Norvaline, L-ασπαρτικό οξύ, L-γλουταμινικό οξύ, L-φαινυλαλανίνη, L-ασπαραγίνη, L-γλουταμίνη, L-τυροσίνη, L-τρυπτοφάνη, L-λυσίνη)
- Υδατάνθρακες (γλυκοφουρανόζη, ριβιτόλη, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, D-γαλακτόζη, αλτρόζη, D-μαννιτόλη, πυρανόζη).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα εκχυλίσματα ήταν πλούσια σε υδατάνθρακες και από αυτούς σε μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνιζαν οι πυρανόζες οι οποίες ήταν γλυκο- και μαννο-πυρανόζες. Ακόμα εντοπίστηκε και γλουκονικό οξύ το οποίο προέρχεται από την γλυκόζη όταν αυτή οξειδωθεί.

**Πίνακας III.12.:** Ενώσεις που έχουν εντοπιστεί σε υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων γένους *Ganoderma* με τη μέθοδο SCAN

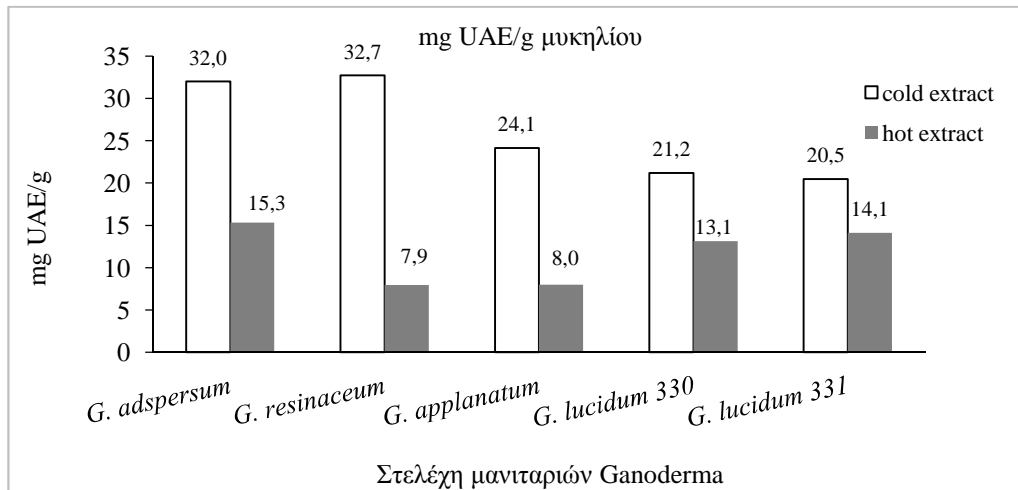
	Μυκηλιακά Εκχυλίσματα μανιταριού γένους <i>Ganoderma</i>				
	<i>G. adspersum</i>	<i>G. resinaceum</i>	<i>G. applanatum</i>	<i>G. lucidum</i> 330	<i>G. lucidum</i> 331
Ενώσεις	% του συνολικού εμβαδού κορυφών				
<b>Furosardonin A</b>	0,12	ΔΑ*	ΔΑ	2,971	ΔΑ
<b>L-Norvaline</b>	0,06	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
<b>L-Ασπαρτικό</b>	1,716	1,62	1,8	4,47	5,35
<b>L-Γλουταμικό οξύ</b>	1,5	1,791	3,241	4,33	14,959
<b>2,5-διμεθυλ διφαινυλ σουλφονικό</b>	1,31	1,79	6,32	4,48	ΔΑ
<b>L-Φαινυλαλανίνη</b>	1,66	0,98	ΔΑ	2,7	3,44
<b>L-Ασπαραγίνη</b>	0,24	0,36	ΔΑ	0,75	2,18
<b>Ριβιτόλη</b>	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1,421
<b>L-Λυσίνη</b>	0,52	0,77	1,23	0,34	2,01
<b>Ξυλιτόλη 5TMS</b>	2,919	1,3	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
<b>Αραβιτόλη</b>	3,65	3,2	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
<b>L-Γλουταμίνη</b>	0,08	0,26	ΔΑ	0,15	ΔΑ
<b>Γυκοφουρανόζη</b>	13,231	6,74	2,33	9,8	ΔΑ
<b>Κιτρικό οξύ</b>	0,45	0,26	1,42	2,98	ΔΑ
<b>Γουανιδίνη</b>	ΔΑ	0,42	26,8	ΔΑ	14,5
<b>D-Γαλακτόζη</b>	0,3	1,01	ΔΑ	ΔΑ	1,82
<b>Αλτρόζη</b>	2,326	3,2	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ
<b>L-Τυροσίνη</b>	0,7	2,03	1,77	2,2	6,3
<b>D-Μαννιτόλη</b>	4,06	2,07	ΔΑ	4,3	ΔΑ
<b>9H-Πουρίνη</b>	ΔΑ	0,31	ΔΑ	ΔΑ	1,787
<b>Γλουκονικό οξύ</b>	1,1	2,05	2,015	0,16	2,04
<b>L-Θρυπτοφάνη</b>	0,1	0,14	ΔΑ	ΔΑ	0,57
<b>Πυρανόζη</b>	34,5	15,0	ΔΑ	33,4	1,6
<b>Συνολικά</b>	36,042	30,301	44,911	39,471	56,377
<b>Άγνωστες Ενώσεις</b>	63,958	69,699	55,089	60,529	43,623

\*ΔΑ: δεν ανιχνεύτηκε

### III.3.3. Ποσοτικοποίηση των συνολικών τριτερπενοειδών

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ολικών τριτερπενοειδών που βρέθηκαν στα μυκηλιακά και καρποσωμικά εκχυλίσματα.

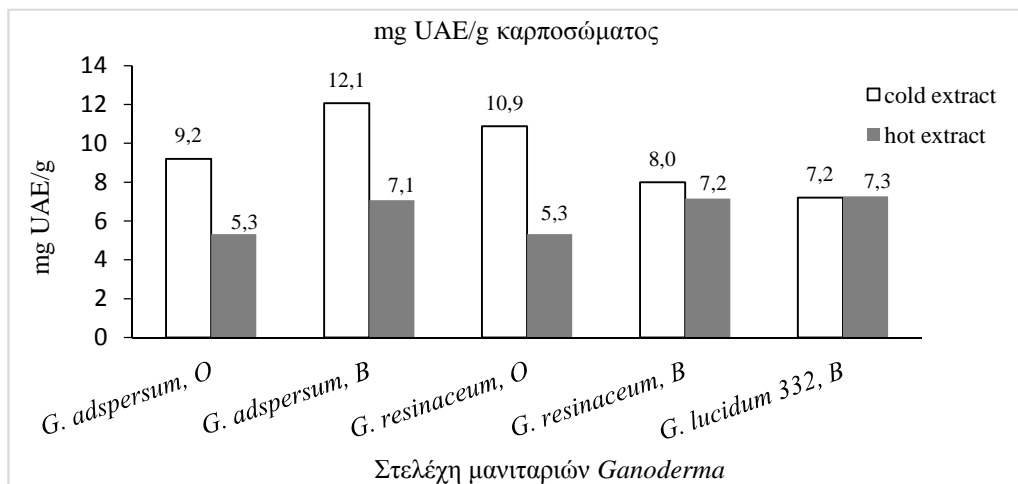
Από το Διάγραμμα III.4. φαίνεται ότι τα ολικά τερπενοειδή στην ΨΕ κυμάνθηκαν από 20 έως 33mg UAE/g μυκηλίου, ενώ τα αντίστοιχα της ΘΕ από 8 έως 15mg UAE/g μυκηλίου, με τα εκχυλίσματα τόσο του *G. adspersum* όσο και του *G. resinaceum* να ξεχωρίζουν, καθώς στην εκχύλιση χαμηλής θερμοκρασίας περιείχαν αυξημένη ποσότητα τερπενοειδών έναντι των υπολοίπων στελεχών.



**Διάγραμμα III.4.:**

Συνολικά τριτερπενοειδή σε μυκήλια μανιταριών, εκφρασμένα ως mgUAE/g μυκηλίου

Όσον αφορά στα καρποσώματα, τα ολικά τερπενοειδή ήταν από 7 έως 12mg UAE/g καρποσώματος για την ΨΕ και από 5 έως 7mg UAE/g καρποσώματος για την ΘΕ. Στην περίπτωση των καρποσωμάτων φαίνεται ότι περισσότερα ολικά τερπενοειδή περιέχονται στα ψυχρά εκχυλίσματα των: *G. adspersum*, B, *G. resinaceum* O και *G. adspersum*, O. Ωστόσο το περιεχόμενο των ολικών τερπενοειδών είναι πολύ μικρότερο με τα αντίστοιχα μυκηλιακά εκχυλίσματα.



**Διάγραμμα III.5.:**

Συνολικά τριτερπενοειδή σε καρποσώματα μανιταριών, εκφρασμένα ως mgUAE/g καρποσωμάτων

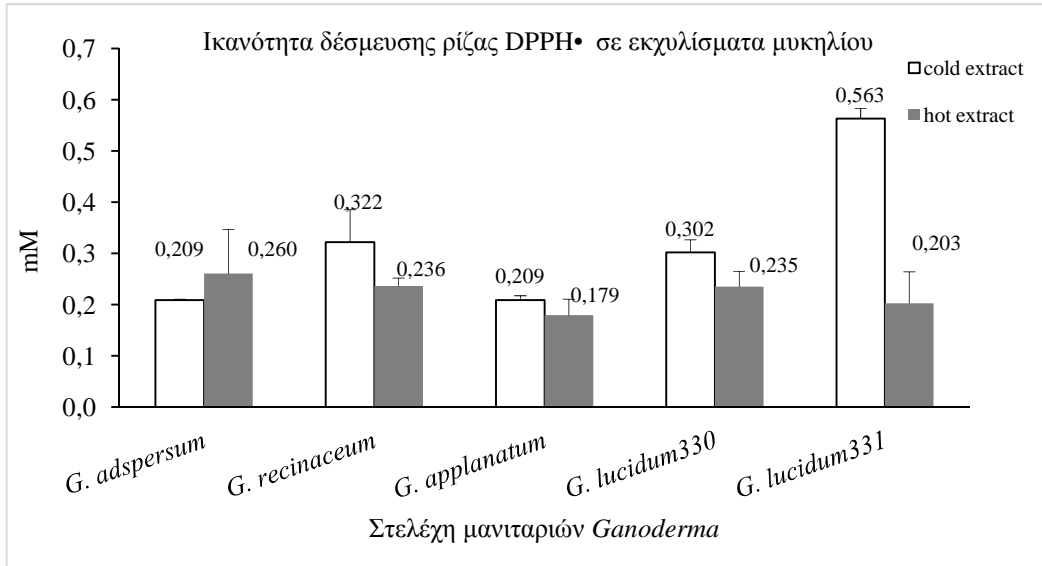
Ακόμα, διαπιστώνεται ότι με την εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία (μυκηλίων και καρποσωμάτων) επιτεύχθηκε παραλαβή περισσότερων τριτερπενοειδών σε σχέση με ΘΕ.

### III. 4. Αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων μυκηλίων και καρποσωμάτων

Τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν από τον υπολογισμό των μέσων όρων των επαναλήψεων, καθώς και από τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης (SD).

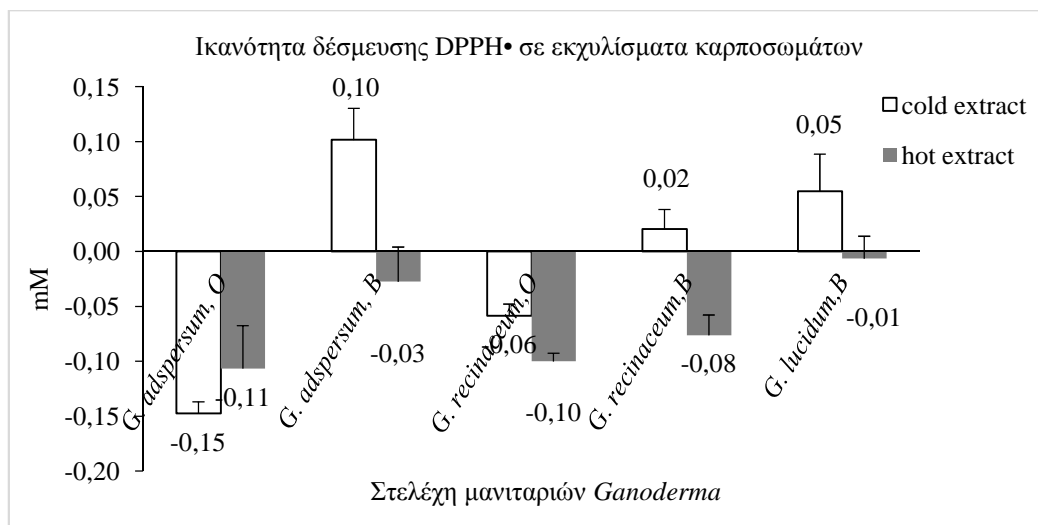
**III.4.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)**

Με τη μέθοδο DPPH• προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων των μυκηλίων και των καρποσωμάτων.



**Διάγραμμα III.6.:** Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδατικών μυκηλιακών εκχυλισμάτων με βάση τη μέθοδο DPPH

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα, φαίνεται ότι σχεδόν όλα τα υδατικά εκχυλίσματα μυκηλίων της ΨΕ παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• σε σχέση με εκείνα της ΘΕ, με εξαίρεση την περίπτωση του *G. adspersum*. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των εκχυλισμάτων (χαμηλότερης και υψηλότερης θερμοκρασίας) όλων των υπό μελέτη μανιταριών, το *G. lucidum* 331 ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα διότι αυτό κατά την ψυχρή εκχύλιση παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (δέσμευση της DPPH• κατά 56,3%).



**Διάγραμμα III.7.:** Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υδατικών εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων με βάση τη μέθοδο DPPH•

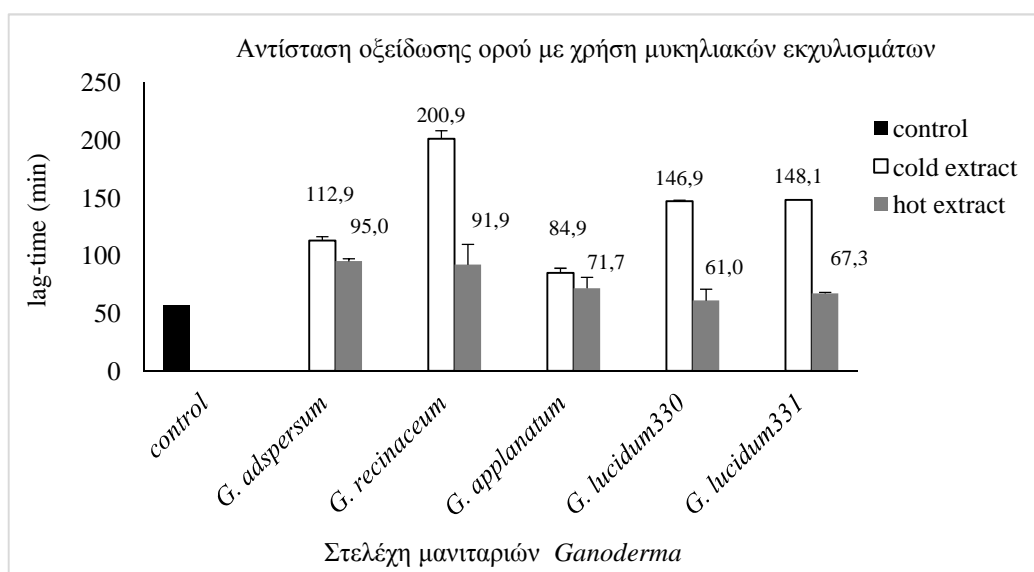
Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων φαίνεται ότι, μόνο τα εκχυλίσματα ψυχρής εκχύλισης επιδεικνύουν ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH• και από αυτά, μόνο

εκείνα που ανήκουν στα είδη *adspersum*, *resinaceum*, *lucidum* των οποίων η καλλιέργεια έγινε σε υπόστρωμα βελανιδιάς.

Τόσο από το Διάγραμμα III.6 όσο και από το Διάγραμμα III.7 γίνεται αντιληπτό ότι με την εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία, εκχυλίστηκαν πολύ περισσότερα φαινολικά συστατικά (και στα μυκηλιακά και στα εκχυλίσματα καρποσωμάτων) σε σχέση με την εκχύλιση σε υψηλότερη θερμοκρασία.

#### III.4.2 Μέτρηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability)

Με τη δοκιμασία προσδιορισμού του χρόνου αντίστασης του ορού αίματος στην οξείδωση, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων μυκηλίων και καρποσωμάτων.



#### Διάγραμμα

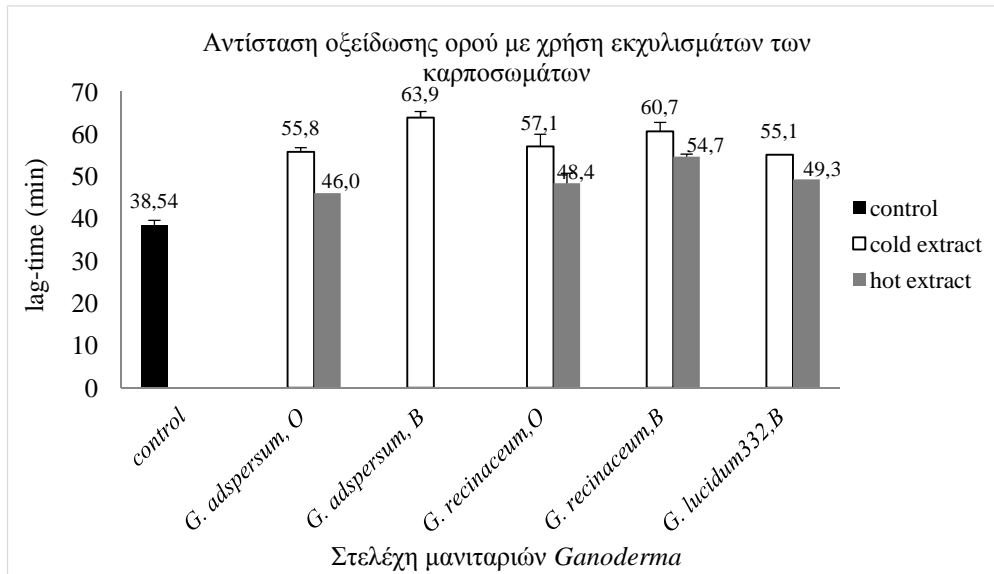
#### III.8.:

Προσδιορισμός χρόνου αντίστασης του ορού του αίματος στην οξείδωση παρουσία υδατικών μυκηλιακών εκχυλισμάτων (0,5μl)

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι όλα τα υδατικά μυκηλιακά εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα παρατείνοντας τον χρόνο αντίστασης (σε λεπτά) της οξείδωσης του ορού του αίματος. Συγκεκριμένα, τα υδατικά μυκηλιακά εκχυλίσματα της ψυχρής εκχύλισης επιμηκύνουν τον χρόνο αντίστασης στην οξείδωση έως και 353% ενώ τα αντίστοιχα της ΘΕ έως 167%. Ως προς το είδος, η αντιοξειδωτική ικανότητα των μυκηλιακών εκχυλισμάτων ψυχρής εκχύλισης, διακυμάνθηκε ως εξής: *G. resinaceum* > *G. lucidum* 330/331 > *G. adspersum* > *G. applanatum*, ενώ για τα ΘΕ ήταν: *G. adspersum* > *G. resinaceum* > *G. applanatum* > *G. lucidum* 331 > *G. lucidum* 330.

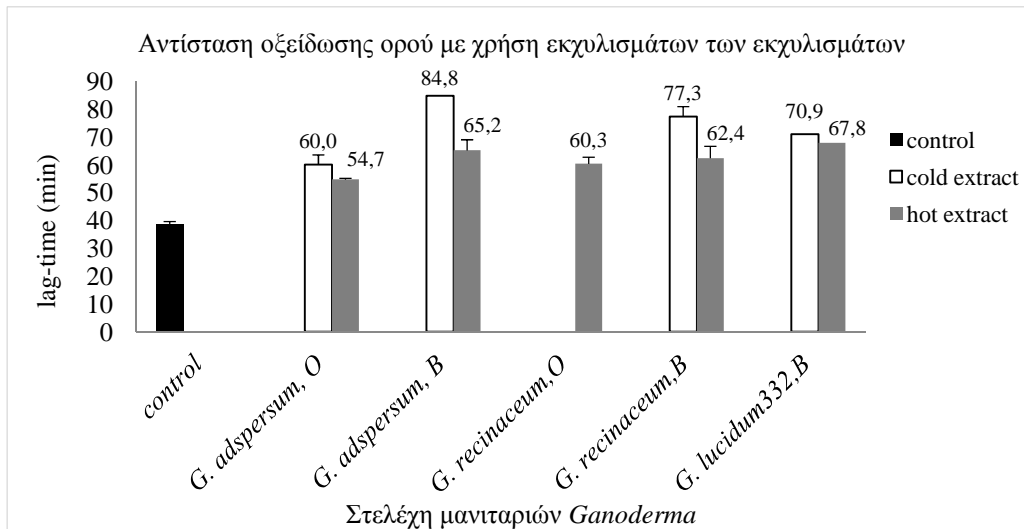
Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τα καρποσωμικά εκχυλίσματα, μόνο που εδώ δεν εξετάστηκε μόνο η επίδραση των 0,5μl εκχυλίσματος, αλλά και του 1μl στον ορό του πλάσματος.





**Διάγραμμα III.9.:** Προσδιορισμός χρόνου αντίστασης του ορού του αίματος στην οξείδωση παρουσία υδατικών εκχυλισμάτων καρποσωμάτων (0,5μl)

Από τον παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ΨΕ και των θερμών αντίστοιχα. Αρκετά διαφορετική είναι η εικόνα του Διαγράμματος III.10, χωρίς ωστόσο να εντοπίζονται πάρα πολύ μεγάλες διακυμάνσεις στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ΘΕ, όπως συνέβη στα μυκηλιακά εκχυλίσματα.

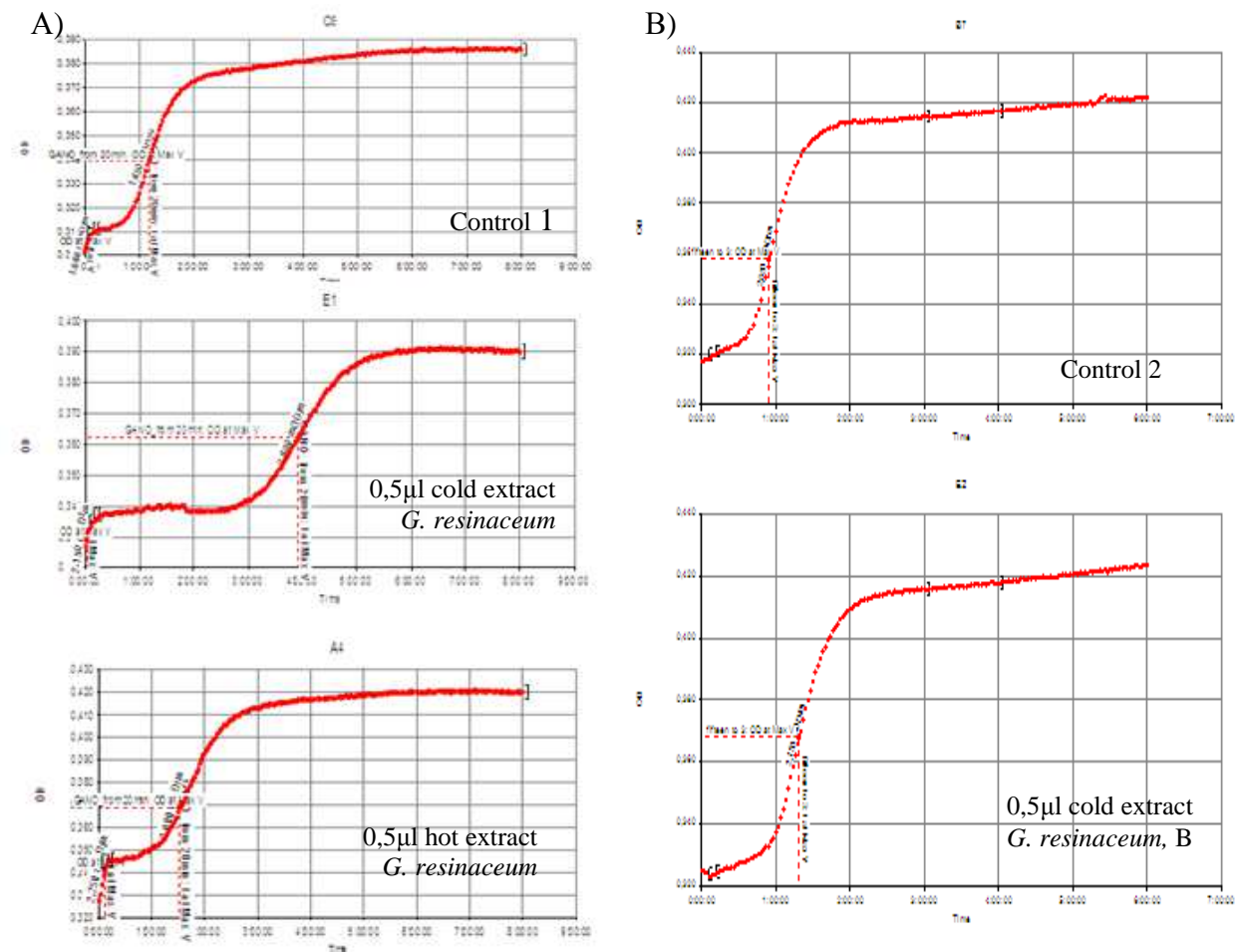


**Διάγραμμα III.10.:** Προσδιορισμός χρόνου αντίστασης του ορού του αίματος στην οξείδωση παρουσία υδατικών εκχυλισμάτων καρποσωμάτων (1μl)

Από τα Διαγράμματα III.9 και III.10 φαίνεται ότι τα καρποσωπικά εκχυλίσματα της ψυχρής εκχύλισης επιμηκύνουν τον χρόνο αντίστασης στην οξείδωση έως και 219% ενώ τα αντίστοιχα της θερμής εκχύλισης έως 175%. Ως προς το είδος η αντιοξειδωτική ικανότητα των ψυχρών εκχυλισμάτων των καρποσωμάτων, κυμάνθηκε ως εξής: (0,5μl) *adspersum, B* > *resinaceum, B* > *resinaceum, O* > *adspersum, O* ~ *lucidum 332, B* και (1μl) *adspersum, B* > *resinaceum, B* > *lucidum 332, B* > *adspersum, O* ενώ για τα ΘΕ ήταν: (0,5μL) *resinaceum, B* > *lucidum 332, B* > *resinaceum, O* > *adspersum, O* και (1μl) *lucidum 332, B* > *adspersum, B* > *resinaceum, B* > *resinaceum, O* > *adspersum, O*. Ακόμα, με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλίσματος (από 0,5μl σε 1,0 μl) παρατηρήθηκε αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης και επιπλέον παράταση του χρόνου αντίστασης (σε λεπτά) στην οξείδωση του ορού του αίματος.

Τέλος, τόσο στην περίπτωση των μυκηλιακών εκχυλισμάτων όσο και στην περίπτωση των καρποσωμάτων διαπιστώνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ψυχρής εκχύλισης ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτή της ΘΕ.

Αν και η διαφορά μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μυκηλιακών εκχυλισμάτων σε σχέση με την αντίστοιχη των καρποσωμάτων είναι μεγάλη, παρ'όλ'αυτά η προσθήκη των καμπυλών του lag time θεωρήθηκε σκόπιμη. Με αυτό τον τρόπο γίνεται ακόμα πιο κατανοητή η διαφορά των εκχυλισμάτων και η επίδραση που φέρουν στον ορό του αίματος. Ενδεικτικά



**Εικόνα III.2.:** Καμπύλες lag time για τα εκχυλίσματα του *G. resinaceum* A) από μυκίλιο B) από καρπόσωμα

παρατίθενται οι καμπύλες του lag time των μυκηλιακών ψυχρών και θερμών εκχυλισμάτων, του *G. resinaceum* αλλά και του 0,5μl ψυχρού εκχυλίσματος καρποσωμάτων του *G. resinaceum*. Η επιλογή των συγκεκριμένων καμπυλών δεν είναι τυχαία, διότι όλα τα μυκηλιακά εκχυλίσματα του *G. resinaceum* επέδειξαν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα άλλα. Ενώ δεν υπάρχουν τόσο σημαντικές διαφορές στα αντίστοιχα καρποσωμικά.

Από την παραπάνω εικόνα άξιο προσοχής είναι η χρονική διάρκεια κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση της LDL (lag-phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των αντιοξειδωτικών του δείγματος, αλλά και η απότομη αύξηση της απορρόφησης, λόγω της εξάντλησης των αντιοξειδωτικών και του σχηματισμού CD (propagation phase). Κομβικό σημείο για τον προσδιορισμό της χρονικής υστέρησης στις παραπάνω καμπύλες είναι το σημείο τομής των εφαπτόμενων των τμημάτων της καμπύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (δηλαδή του σημείου στο οποίο άρχισε η αύξηση της απορρόφησης).

## **IV.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η ευεργετική επίδραση που ασκούν τα μανιτάρια γένους *Ganoderma* spp καθώς και τα προϊόντα τους, όπως τα υδατικά εκχυλίσματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν σημείο κλειδί για την ένταξή τους στην ομάδα των λειτουργικών τροφίμων, δηλαδή εκείνων των τροφίμων που είναι εμπλουτισμένα με συστατικά ικανά να παράγουν οφέλη για την υγεία (Han κ.α., 2005). Τόσο η παραγωγή των συγκεκριμένων μανιταριών όσο και η εμπορία αυτών και των προϊόντων τους έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον, με την επιλογή της τεχνικής καλλιέργειας και του υποστρώματος ανάπτυξης να αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα καθορισμού της πορείας της καλλιέργειας. Ως υπόστρωμα μιας καλλιέργειας, συνήθως χρησιμοποιούνται άφθονες και φτηνές πρώτες ύλες, πάρα ή/και υπο-προϊόντα διεργασιών καθώς και αγροτο/βιομηχανικά υπολείμματα. Με σκοπό της παρούσας εργασίας τη μελέτη της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων μυκηλίου και καρποσωμάτων μυκήτων του γένους *Ganoderma*, η εργασία χωρίζεται σε δυο τμήματα. Το πρώτο τμήμα αφορά την διαδικασία παραλαβής υδατικών εκχυλισμάτων από μυκήλια και καρποσώματα μανιταριών του γένους *Ganoderma* έπειτα από υγρή ζύμωση χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες για τη στερεή καλλιέργεια. Στο δεύτερο τμήμα εξετάστηκε η σύσταση των εκχυλισμάτων σε ολικές φαινόλες και τερπενοειδή καθώς και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Αναφορικά με το πρώτο τμήμα της εργασίας, είναι γνωστό ότι σε μια υγρή καλλιέργεια είναι σημαντικός ο καθορισμός και ο προσδιορισμός των διαφόρων παραμέτρων αύξησης των υπό μελέτη μακρομυκήτων όπως της πηγής άνθρακα, του λόγου C/N αλλά και του pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης αντίστοιχα διότι αυτοί σχετίζονται με την παραγωγή βιομάζας και μεταβολικών προϊόντων, όπως οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS), οι ένδοπολυσακχαρίτες (IPS) και τα λιπίδια (L). Αρχικά ως κύρια πηγή άνθρακα επιλέχθηκε η γλυκόζη διότι ευνοεί την ανάπτυξη των βασιδιομυκήτων, πιθανόν λόγω της αποτελεσματικής ενσωμάτωσης της μέσω της αναπνευστικής οδού έπειτα από φωσφορυλίωση (Papaspnyridi κ.α., 2011), ενώ ο λόγος C/N καθορίστηκε στο 30/1 που ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων αυτών. Εκτός από την πηγή άνθρακα και το λόγο C/N σημασία έχει και το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης. Στις καλλιέργειες βυθισμένου τύπου συνηθίζεται να προσδιορίζεται η τιμή του pH τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της ζύμωσης, δεδομένου ότι το pH είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή EPS (Yang και Liao, 1998) και γανοδερικών οξέων (Fang και Zhong, 2002). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το βέλτιστο εύρος pH στο οποίο αναπτύσσονται τα μανιτάρια γένους *Ganoderma* είναι 5,5 – 6,0. Βέβαια αυτό δεν είναι απόλυτο διότι έχει παρατηρηθεί μέγιστη βιομάζα σε pH 6,0-6,5 για το *G. lucidum* και 7 για το *G. resinaceum* (Magday κ.α., 2014). Στην περίπτωση του *G. applanatum* έχει φανεί ότι ένα εύρος pH της τάξεως από 6,0 έως 9,0 είναι κατάλληλο για ανάπτυξη βιομάζας. Σε άλλη μελέτη, το *G. lucidum* φάνηκε ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε pH 5,0-9,0 με βέλτιστο για μυκηλιακή ανάπτυξη το 5,0 (Jayasinghe, 2008; Magday κ.α., 2014).

Ο καθορισμός της τιμής του pH εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, ενώ έχει προταθεί πως οι χαμηλές τιμές αρχικού pH εμποδίζουν τις βακτηριακές επιμολύνσεις, ευνοώντας τη κυρίως καλλιέργεια (Yang και Liao, 1998). Μια τυπική υγρή καλλιέργεια μανιταριού *Ganoderma* (π.χ. *G. lucidum*) διαρκεί από 7 έως 14 ημέρες (Yang και Liao, 1998), με το pH να σημειώνει συνήθως πτώση (Kim κ.α., 2002; Simonic κ.α., 2008) λόγω της παραγωγής κυρίως των γανοδερικών και λουσιδενικών οξέων που είναι δευτερογενείς μεταβολίτες (Chin, 2000), όπως συνέβη στη παρούσα εργασία. Τα οξέα αυτά είναι γνωστό ότι εκκρίνονται κυρίως τις πρώτες μέρες της καλλιέργειας (Kim κ.α., 2002).

Όσον αφορά στην επίδραση της γλυκόζης στην παραγωγή μυκηλιακής μάζας, συνήθως με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, αυξάνεται η βιομάζα (Semonic κ.α., 2008), αν και δεν ισχύει πάντοτε κάτι τέτοιο. Έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις όπου μια

τέτοια κίνηση μπορεί να επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα λόγω οσμωτικής πίεσης, οδηγώντας σε μεταβολική μετατόπιση και σε εν μέρει χρησιμοποίηση της αφομοιωμένης γλυκόζης προκειμένου να ικανοποιηθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις για συντήρηση (Diamantopoulou κ.α., 2016).

Από τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας συμπεραίνεται ότι όλοι οι μακρομύκητες *Ganoderma* που δοκιμάστηκαν παρήγαγαν σημαντική ποσότητα βιομάζας. Ο *G. applanatum* παρήγαγε την περισσότερη βιομάζα (18,8 g/l) και ακολούθησαν οι μύκητες *G. lucidum* (13-14 g/l) και τέλος οι *G. resinaceum* και *G. adspersum* με ~12 g/l τιμή βιομάζας. Ο *G. applanatum* όχι μόνο παρήγαγε την μεγαλύτερη βιομάζα αλλά είχε και το μεγαλύτερο ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης ανά ημέρα (Glc/d) (2,40 g/d) και το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης  $Y_{X/S}$  σε σχέση με τους υπόλοιπους μακρομύκητες που εξετάστηκαν (0,59 g/g).

Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν γίνει με πηγή άνθρακα απλά σάκχαρα όπως λακτόζη και γλυκόζη, αλλά και το δισακχαρίτη σακχαρόζη και αποσκοπούσαν στην παραγωγή βιομάζας, IPS και γανοδερικού οξέος του μύκητα *G. lucidum* (Tang και Zhong, 2002; Chen, 2002). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι με πηγή άνθρακα την γλυκόζη, οι και Zhong (2002β) κατέγραψαν για το *G. lucidum*  $X_{max}$  (g/l)=10,08±0,52 και  $Y_{X/S}$ =0,33 κατά την 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας του, ενώ σε πείραμα που έγινε από τους Fang και Zhong (2002), έχει καταγραφεί βιομάζα μέχρι και 20,9 g ξ.β./l. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Diamantopoulou κ.α. (2012) κατά την 16<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας του *G. lucidum* 330, η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας που καταγράφηκε (στα διάφορα θρεπτικά μέσα που εξετάστηκαν στα οποία πηγή άνθρακα ήταν η γλυκόζη) ήταν αυτή των 2,7 g/l υπό στατικές συνθήκες και των 10,9 g/l υπό ανάδευση. Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε και ο *G. applanatum* 341 όπου κατά την 16<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειάς του, η μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας που καταγράφηκε ήταν αυτή των 15,7 g/l υπό στατικές συνθήκες και των 8 g/l υπό ανάδευση, ενώ η απόδοσή του ( $Y_{X/S}$ ) είναι παρόμοια με αυτή που υπολογίστηκε στην παρούσα εργασία. Σε ένα ακόμα παράδειγμα υγρής ζύμωσης, παρατηρήθηκε την 7<sup>η</sup> μέρα καλλιέργειας του *Ganoderma australe* ATHUM 4345 μυκηλιακή βιομάζα, συγκέντρωσης ~8,94 g/l (Papasyridi κ.α., 2011). Συγκρίνοντας τις βιβλιογραφικές αναφορές με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, επιβεβαιώνεται ο ισχυρισμός ότι η παραγόμενη βιομάζα ήταν αρκετά σημαντική με την απόδοση  $Y_{X/S}$  να κυμαίνεται σε ικανοποιητικό βαθμό.

Εκτός από τη μελέτη της παραγωγής βιομάζας μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των πολυσακχαριτών, τόσο σε φαρμακευτικά όσο και σε εδώδιμα μανιτάρια. Οι Tang και Zhong (2002) μελετώντας το *G. lucidum* κατέγραψαν  $EPS_{max}$  (g/l)=0,47±0,01 και  $IPS_{max}$  (g/l)=0,97±0,06, ενώ ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι Fang και Zhong (2002); Kim κ.α. (2002); Lomberh (2002); Lee κ.α. (2007) ασχολήθηκαν και αυτοί με τη μελέτη της παραγωγής πολυσακχαριτών από μανιτάρια. Κατά τη μελέτη τόσο της παραγωγής βιομάζας όσο και πολυσακχαριτών σε μια καλλιέργεια σημαντικό ρόλο παίζει η επίδραση του λόγου C/N, διότι η μείωση της πηγής αζώτου επιφέρει μείωση της παραγόμενης βιομάζας και αύξηση των παραγόμενων πολυσακχαριτών. Το τελευταίο συμβαίνει επειδή επάγεται η ενζυμική δραστηριότητα προωθώντας την σύνθεση πολυσακχαριτών. Από την άλλη μεριά, μια αύξηση της πηγής αζώτου μπορεί να προκαλέσει αύξηση του pH, της παραγωγής βιομάζας και μείωση της παραγωγής πολυσακχαριτών (λόγω του χαμηλού λόγου C/N) (Hsieh κ.α., 2006; Simonic κ.α., 2008). Επιπλέον, η σύσταση της πηγής αζώτου και η μορφή με την οποία θα προστεθεί παίζει ρόλο. Για παράδειγμα, η πεπτόνη, η κατεξοχήν οργανική πηγή αζώτου, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει μείωση στην παραγωγή βιομάζας, πιθανώς λόγω της ύπαρξης αναστολέων ανάπτυξης εντός της πεπτόνης, καταστέλλοντας έτσι την διεγερτική της δράση (Fang και Zhong, 2002; Simonic κ.α., 2008).



Σχετικά με την παραγωγή EPS και IPS, από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι για την επίτευξη υψηλής απόδοσης σε EPS απαιτείται μέτρια θερμοκρασία (25 °C), υψηλές συγκεντρώσεις άνθρακα (60 g/l) και μικρή διάρκεια καλλιέργειας (8-12 ημέρες). Αντίθετα, για την επίτευξη υψηλής απόδοσης σε IPS απαιτείται χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης (10-15 °C), χαμηλή αναλογία C/N και ελάχιστη διάρκεια καλλιέργειας τις 10 ημέρες (Lee κ.α., 2007). Η παραγωγικότητα και των δυο ειδών πολυσακχαριτών συνδέεται μεταξύ τους διότι χρησιμοποιούνται οι ίδιες πρόδρομες ουσίες (Lee κ.α., 2007). Επιπλέον, στην περίπτωση του *G. applanatum* από μελέτη που έχει γίνει, φάνηκε ότι συσσωρεύει περισσότερους IPS κατά τη φάση θανάτου και EPS κατά τη στάσιμη (Lee κ.α., 2007). Σε μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν έχει μελετηθεί η επίδραση του λόγου C/N στην παραγωγή IPS και EPS σε υγρή καλλιέργεια βυθισμένου τύπου στο *G. applanatum* και στο *G. lucidum*. Στην περίπτωση του *G. applanatum*, ο C/N από 40 μέχρι 80 φάνηκε να ευνοεί τη βιοσύνθεση EPS, ενώ ο C/N < 40 τη βιοσύνθεση IPS (Lee κ.α., 2007). Από την άλλη στον *G. lucidum* το εύρος του λόγου C/N που έχει διερευνηθεί ήταν 12,1-32,4 (Fraga κ.α., 2014), αλλά και 70-80 (Sanodiya κ.α., 2009). Η επιλογή του λόγου C/N=30 στην παρούσα μελέτη δεν ήταν τυχαία αφού όπως προκύπτει και από τους Fraga κ.α. (2014) με C/N κοντά στο 30, η παραγωγή της βιομάζας και των EPS ήταν πάρα πολύ ικανοποιητική. Η διερεύνηση της επίδρασης του λόγου C/N είναι γενικά αντικείμενο μελέτης κατά τη διεξαγωγή καλλιέργειών κάτι που φαίνεται και στη μελέτη των Diamantopoulou κ.α. (2016) όπου ο εξεταζόμενος μύκητας ήταν ο *Volvariella volvacea*. Μάλιστα ακόμα και στην περίπτωση της καλλιέργειας του *V. volvacea* (σε ένα εύρος από 20-60), η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και IPS, καθώς και οι αντίστοιχοι συντελεστές απόδοσης ήταν καλύτεροι σε C/N=30 σε σχέση με τους υπόλοιπους λόγους. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του Πίνακα III.2B., υπενθυμίζεται ότι η ποσότητα των παραγόμενων EPS κυμάνθηκε από 0,415 (*G. lucidum* 330) έως ~ 0,58 g/l (*G. lucidum* 331 και *G. applanatum*). Υψηλή συγκέντρωση IPS συνέθεσαν όλα τα στελέχη *Ganoderma* σε απόλυτες (~7-14 g/l) και σε σχετικές τιμές (>50% κ.β) που κατά αύξοντα αριθμό ήταν ως εξής: *G. applanatum* > *G. resinaceum* ~ *G. adspersum* > *G. lucidum* 330. Τόσο η ποσότητα των IPS όσο και των EPS εκτιμάται ως αρκετά ικανοποιητική με δεδομένο ότι με τις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές αλλά και κατά τους Petre κ.α. (2010) το περιεχόμενο τριών στελεχών του *G. lucidum* σε πολυσακχαρίτες κυμάνθηκε από 3,70-5,23 mg/ml, ενώ η ποσότητα των EPS ήταν παρόμοια με εκείνη των *G. lucidum* 330 και *G. applanatum* 341 της μελέτης που παρουσιάζεται από τους Diamantopoulou κ.α. (2012).

Από τα αποτελέσματα όπως αυτά δίνονται στους Πίνακες III.2A και III.2B φαίνεται ότι το *G. applanatum* παρήγαγε αντίστοιχη ποσότητα EPS ως προς την κατανάλωση γλυκόζης ( $Y_{EPS/Glc}$ ) με το *G. lucidum* 331. Όμως η μικρότερη παραγωγή βιομάζας δείχνει ότι η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε από τον μύκητα περισσότερο για τη σύνθεση EPS από ό,τι βιομάζα. Αυτό γίνεται ακόμα πιο εμφανές στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* που παρουσιάζουν και τις μεγαλύτερες  $Y_{EPS/Glc}$ , αλλά όχι και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας. Όσο αφορά στον συντελεστή μεταφοράς της γλυκόζης σε IPS ήταν μεγαλύτερος στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* από ότι στο *G. applanatum*, οπότε και φαίνεται ότι η προτίμηση της χρησιμοποίησης της γλυκόζης στους *G. resinaceum* και *G. adspersum* περισσότερο για παραγωγή IPS παρά για βιομάζα. Αντίθετα στον μακρομύκητα *G. applanatum* η γλυκόζη του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα για παραγωγή IPS και βιομάζας. Πολλές φορές η παραγωγή των IPS είναι συζευγμένη με την μυκηλιακή αύξηση, αν και ένας τέτοιος ισχυρισμός συσχέτισης χρήζει στατιστική διερεύνηση των μελετώμενων μεταβλητών ( $X$ , EPS, IPS,  $Y_{X/Glc}$ ,  $Y_{EPS/Glc}$ ,  $Y_{IPS/Glc}$ ). Επιλέγοντας τον *G. applanatum* από τους υπόλοιπους μακρομύκητες, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης IPS, προσδιορίστηκε η σύσταση των IPS σε απλά σάκχαρα (Πίνακας III.3), όπου και φάνηκε πως η γλυκόζη ήταν το κύριο σάκχαρο που ανιχνεύτηκε και μάλιστα σε ποσοστό 73%. Σε πολύ μικρότερη ποσότητα ανιχνεύτηκε η ξυλιτόλη, η φρουκτόζη και η μανιτόλη. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες, όπως αυτή των Lee

κ.α. (2007). Από την μελέτη των Lee κ.α. (2007) προέκυψε ότι τα συστατικά σύνθεσης των IPS και EPS ήταν κυρίως η γλυκόζη και έπειτα η γαλακτόζη, η μαννόζη και η ξυλόζη (Lee κ.α. 2007), ενώ η ύπαρξη των παραπάνω σακχάρων καθώς και της φουκόζης στους EPS, επαληθεύεται και από τους Fraga κ.α. (2014). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι το σάκχαρο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι η γλυκόζη, ενώ στη μελέτη των Yang κ.α. (2010) όπου και διερευνήθηκε η σύνθεση των IPS του *G. lucidum*, το σάκχαρο που ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν η μαλτόζη και μετά η φρουκτόζη και γλυκόζη, ενώ σε πολύ μικρότερο ποσοστό ανιχνεύτηκαν η σουκρόζη και η ξυλόζη.

Στη συνέχεια δόθηκε σημασία και στην ανάλυση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων των μυκηλίων των μελετώμενων μανιταριών. Η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί σημαντικό κομμάτι της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών ουσιαστών και διαφορετικών ρόλων που δύναται να παίζουν στο κύτταρο. Παρόλο που τα μανιτάρια είναι οργανισμοί χαμηλής περιεκτικότητας η γνώση της σύστασης τους σε λιπαρά οξέα είναι σημαντική, αφού τα κορεσμένα λιπαρά οξέα προκαλούν μια σειρά από προβλήματα υγείας όπως αύξηση της χοληστερόλης. Από την άλλη πλευρά τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ιδίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) τα οποία ανήκουν στις οικογένειες ωμέγα-6 και ωμέγα-3 (π.χ. το αραχιδονικό οξύ και το α-λινολενικό οξύ), επιδρούν θετικά στην υγεία, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, δρώντας μεταξύ των άλλων και καρδιοπροστατευτικά. Επομένως προτείνεται μια διατροφή χαμηλή σε θερμίδες και πλούσια σε UFAs προς όφελος της υγείας (Tang κ.α., 2011) και σε αυτό συμβάλλουν και σκευάσματα φαρμακευτικών (μη εδώδιμων) μανιταριών όπως είναι αυτά του γένους *Ganoderma*. Για τους παραπάνω λόγους συνηθίζεται η μελέτη των λιπιδίων όχι μόνο σε μυκήλια αλλά σε καρποσώματα και σε σπόρια των μανιταριών *Ganoderma*. Όσο αφορά στο λιπιδιακό περιεχόμενο των 5 μελετώμενων *Ganoderma*, της παρούσας μελέτης, αυτό ήταν από 2,8 έως 7,13% ο/ο, ποσοστό σχετικά καλό αν συγκριθεί με εκείνο των καρποσωμάτων του *G. applanatum* και των υπόλοιπων μακρομυκήτων που εξετάστηκαν από τους Pedneault κ.α. (2008) και δεδομένου ότι τα μανιτάρια δεν είναι ελαιογόνοι οργανισμοί. Με το *G. adspersum* και *G. lucidum* 330 να επιδεικνύουν το μεγαλύτερο ποσοστό σε λιπίδια ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση διερευνώντας την σύσταση τους σε λιπαρά οξέα, όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα III.4. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φάνηκε ότι το λιπιδιακό προφίλ των δυο *Ganoderma* μοιάζει αρκετά, αφού και στα δυο μανιτάρια σε μεγαλύτερη ποσότητα εντοπίστηκε το  $^{Δ9,12}C18:2$  και μετά το C16:0, ενώ την χαμηλότερη ποσότητα την κατείχε το C14:0. Ωστόσο στο *G. adspersum* ανιχνεύτηκαν υψηλότερα ποσοστά C18:0 και C18:1 σε σχέση με το *G. lucidum* 330. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μας με άλλες μελέτες όπως αυτή των Liu κ.α. (2007), οι οποίοι μελέτησαν την λιπιδιακή σύσταση των βασιδιοσπορίων του *G. lucidum*, διαπιστώνεται η κυρίαρχη παρουσία των C16:0 (παλμιτικό οξύ), των C18:0 (στεατικό οξύ) και των C18:1 (ελαϊκό οξύ). Επίσης σύμφωνα με τους Martinez κ.α. (1991) τα τρία αυτά λιπαρά οξέα έχουν εντοπιστεί και σε καρποσώματα των *G. applanatum* και *G. australe*. Η ύπαρξη των παραπάνω λιπαρών οξέων και ο εντοπισμός τους σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με άλλα, έχει παρατηρηθεί και σε άλλους μακρομύκητες, όπως φαίνεται και από την εργασία των Tang κ.α. (2011), οι οποίοι μελέτησαν ασκομύκητες γένους *Tuber*, αλλά και των Pedneault κ.α. (2008), Kalogeropoulos κ.α (2013) και Valverde κ.α. (2014) που μελέτησαν βασιδιομύκητες.

Κατά τη διάρκεια μιας καλλιέργειας στερεής κατάστασης (SSF) λόγω της έντονης μεταβολικής δραστηριότητας των μυκήτων παράγεται θερμότητα (Chen, 2004). Στα πρώτα στάδια, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του οξυγόνου παραμένει ομοιόμορφη σε όλο το υπόστρωμα, αλλά καθώς η ζύμωση προχωρά, το οξυγόνο μεταφέρεται και παράγεται θερμότητα που σταδιακά αυξάνει με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ λεπτών και κακής ποιότητας καρποσωμάτων. Η μεταφορά θερμότητας είναι στενά συνδεδεμένη με τον αερισμό του θαλάμου

ζύμωσης. Η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι επίσης πολύ κρίσιμη γιατί επηρεάζει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, τον σχηματισμό σπορίων, τη βλάστηση και τον σχηματισμό προϊόντων. Υψηλό επίπεδο υγρασίας οδηγεί σε μείωση του πορώδους υποστρώματος, το οποίο με τη σειρά του αποτρέπει τη διείσδυση οξυγόνου. Αυτό μπορεί να ευνοήσει τη βακτηριακή μόλυνση. Από την άλλη πλευρά, η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία μπορεί να οδηγήσει στην κακή προσβασιμότητα των θρεπτικών ουσιών με αποτέλεσμα την κακή μικροβιακή ανάπτυξη (Pandey, 2003).

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι συνήθως το 70-90% του περιεχομένου των υποστρωμάτων καλλιέργειας *Ganoderma* είναι πριονίδια φυλλοβόλων δέντρων, με το καλαμπόκι, το σοργό, το βαμβάκι, τη μπαγκάσα, το γύψο κτλ να εμπλουτίζουν την σύνθεση του υποστρώματος, καλύπτοντας την σύνθεση του υποστρώματος 100% (Ueitele κ.α., 2014). Όσο αφορά στην περίπτωση του καλαμποκιού, είναι γνωστό ότι η παρουσία καλαμποκιού στο υπόστρωμα αυξάνει περισσότερο την απόδοση και τη ΒΑ% σε σχέση με άλλα πρόσθετα (Erke, 2009). Η επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος καλλιέργειας *Ganoderma* είναι σημαντική προκειμένου να ληφθεί ικανοποιητική απόδοση παραγωγής (Ueitele κ.α., 2014). Από χημικής άποψης τα ξύλα της οξιάς και της βελανιδιάς δεν διαφέρουν πολύ αφού σύμφωνα με τους Fišerová κ.α. (2013), το % περιεχόμενο για την οξιά είναι: 22,7 η κατά Kalson λιγνίνη, 46,9 η α-κυτταρίνη και 26,59 η ημικυτταρίνη, ενώ για την βελανιδιά είναι: 23,27 η κατά Kalson λιγνίνη, 44,98 η α-κυτταρίνη και 25,66 η ημικυτταρίνη. Έλλειψη σημαντικών διαφορών ως προς την χημική σύσταση των δυο αυτών ξύλων αποκάλυψε και η μελέτη των Szczerkowski κ.α. (2007). Αν και τα υλικά αυτά μοιάζουν χημικά, έχει παρατηρηθεί διαφορετική συμπεριφορά όταν αυτά χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριών. Όπως αναφέρεται σε μελέτη του Πανεπιστημίου Cornell στη *Lentinula edodes* (Mudge κ.α., 2013) η βελανιδιά τείνει να είναι παραγωγική για περισσότερα χρόνια από ό, τι μερικά άλλα είδη όπως η οξιά, πράγμα που σημαίνει ότι θα ληφθούν περισσότερα μανιτάρια. Ίσως οι λόγοι για τους οποίους τα δυο αυτά υποστρώματα επιδεικνύουν διαφορετική παραγωγικότητα να είναι βιοχημικοί και να σχετίζονται με την έκκριση των LME. Υπενθυμίζετε ότι τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν να προσληφθούν από τους μύκητες λευκής σήψης. Από μελέτη των Simonis κ.α. (2009) με αντικείμενο έρευνας την έκκριση των ενζύμων MnP, VP και Lac σε διάφορα υποστρώματα, μεταξύ των οποίων ήταν και η βελανιδιά, φάνηκε ότι στα διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης του *Ganoderma carnosum* η δραστηριότητα των υπό μελέτη ενζύμων ήταν διαφορετική. Όσον αφορά σε κάποια φυσικά χαρακτηριστικά όπως τα σημειώνει ο Madanis (2003) η ξηρή πυκνότητα της οξιάς είναι 0,7 g/cm<sup>3</sup> και της βελανιδιάς από 0,65-0,82 g/cm<sup>3</sup>. Επιπλέον όταν η πυκνότητα του ξύλου συνδυάζεται με σκούρο χρώμα τότε ενισχύεται η φυσική διάρκεια του ξύλου, με το ξύλο της βελανιδιάς από άποψη αντοχής να θεωρείται ανθεκτικό και σκληρό αντίθετα με αυτό της οξιάς που είναι μαλακό.

Στην παρούσα στερεή ζύμωση, από την ημέρα που έγινε ο εμβολιασμός μέχρι την ημέρα που ολοκληρώθηκε η εμφάνιση του πρώτου κύματος μεσολάβησαν 128 ημέρες, αν και σε άλλες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί χρόνοι μόλις 50, 63<sup>ov</sup> και 75 ημερών (Elissetche κ.α., 2007; Ke κ.α., 2011; Mehboob κ.α., 2011). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η στερεή καλλιέργεια του *Ganoderma* για εμπορικούς σκοπούς συνήθως απαιτεί 120-200 ημέρες ώστε να παραχθούν πλήρη καρποσώματα (Hsieh και Yang, 2004). Το χρονικό διάστημα αυτό είναι μεγάλο και επίφοβο για επιμολύνσεις (Narkprasom κ.α., 2012), οι οποίες είτε εμποδίζουν την ανάπτυξη του μυκηλίου επί του σάκου (εμποδίζοντας έτσι την εξάπλωσή του αλλά και τον σχηματισμό καρποσωμάτων) είτε προσβάλλουν τα καρποσώματα, όπως και συνέβη στην περίπτωση των ειδών *G. applanatum* και *G. lucidum*. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί όπως και εδώ ότι η επιτυχία του μυκηλίου να αποικήσει το υπόστρωμα εντός του σάκου (αργά ή γρήγορα) δε σηματοδοτεί

και επιτυχία σχηματισμού καταβολών ή καρποσωμάτων (Yang κ.α., 2003). Μετά τη συγκομιδή των καρποσωμάτων υπολογίσθηκε η απόδοση σε g, η % απόδοση καθώς και η % BA. Από ό,τι φάνηκε η (%) απόδοση καθώς και η (%) B.A. ήταν μεγαλύτερη στα είδη *G. adspersum* και *G. resinaceum* των οποίων η καλλιέργεια έλαβε χώρα σε βελανιδιά σε σχέση με αυτή της οξιάς, κάτι το οποίο συμβαδίζει και με τη βιβλιογραφία (Erke, 2009). Συγκρίνοντας την (%) απόδοση καθώς και την % B.A. της παρούσας μελέτης με αυτή άλλων μελετών σχετικές με το *G. lucidum* προκύπτει ότι η εκτιμώμενη (%) απόδοση και % BA είναι κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρουσιάζουν οι Erke (2009); Peksen και Yakuroglu, (2009); Singh κ.α. (2014). Αντίθετα οι % BA που υπολογίσθηκαν από τους Ueitele κ.α. (2014) δεν ήταν πολύ μεγάλες σε σχέση με αυτές των μελετώμενων *Ganoderma* της παρούσας εργασίας. Γενικά έχουν γίνει αρκετές μελέτες όπου ερευνάται η επίδραση του υποστρώματος και των προσθέτων στην απόδοση και στην % B.A., όπου πολλές φορές τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και πολυποίκιλα, δυσκολεύοντας την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην μελέτη των Gurung κ.α. (2012) με αντικείμενο μελέτης το *G. lucidum*, το εύρος τιμών της απόδοσης και % B.A ήταν αρκετά μεγάλο, με την προσθήκη του καλαμποκιού ως πρόσθετο να μην συμβάλει στη μέγιστη απόδοση και % B.A., συγκριτικά με άλλα. Επιπλέον, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η βιβλιογραφικά αναφερόμενη % B.A. των μανιταριών *Ganoderma* ανεξαρτήτως του υποστρώματος καλλιέργειας, είναι κατά πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή των *Pleurotus ostreatus* (έως 64% B.A.), ενός άλλου βασιδιομύκητα (Shah κ.α., 2004). Από αυτό γίνεται αντιληπτό ότι η απόδοση και η B.A. % μιας καλλιέργειας καθορίζεται πρωτίστως από την κατάλληλη επιλογή γένους-είδους, και έπειτα από το υπόστρωμα ανάπτυξης.

Όσον αφορά στα μεταβολικά προϊόντων των καρποσωμάτων όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα III.6, διαπιστώνεται ότι αν και η συγκέντρωση των IPS στο καρπόσωμα ήταν υψηλή (~40% κ.β.), το % περιεχόμενο σε IPS των μυκηλίων ήταν κατά πολύ μεγαλύτερο. Γενικά, ισχύει ότι το περιεχόμενο των καρποσωμάτων των περισσότερων μανιταριών σε υδατάνθρακες κυμαίνεται από 44,0 έως και 74,3%, ενώ στα καρποσώματα των μανιταριών *Ganoderma* spp είναι από 21,8 έως 27,8% (Tseng, 2005). Παρόμοια, το L των μυκηλίων ήταν περισσότερο από αυτό των καρποσωμάτων. Δεδομένου ότι η σύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας επηρεάζει το % περιεχόμενο σε IPS Skalicka-Woźniak κ.α. (2012), και ότι η οξιά και η βελανιδιά έχουν παραπλήσια χημική σύσταση, μπορεί να ερμηνευτεί γιατί το % περιεχόμενο των *Ganoderma* που καλλιεργήθηκαν σε βελανιδιά δε διέφερε πολύ σε σχέση με το αντίστοιχο των *Ganoderma* που καλλιεργήθηκαν σε οξιά (Fišerová κ.α., 2013).

Αναφορικά με το δεύτερο τμήμα της εργασίας αρχικά έλαβε χώρα ο προσδιορισμός ολικών φαινολών και τερπενοειδών στα υδατικά εκχυλίσματα των μυκηλίων και καρποσωμάτων και έπειτα ακολούθησε η εξέταση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Οι φαινόλες είναι γνωστές στη βοτανική ως σημαντικές ενώσεις που λόγω των υδροξυλικών τους ομάδων εμφανίζουν ικανότητα δέσμευσης ριζών και αντιοξειδωτική δράση. Ακόμα είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση της λιπιδιακής υπεροξειδωσης. Ο τρόπος δράσης τους ποικίλει, για αυτό και έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να συλλάβουν μονήρες οξυγόνο, να αποδομήσουν πρωτογενή προϊόντα οξειδωσης, αποτρέποντας την συνεχόμενη αφαίρεση υδρογόνου από ουσίες. Αποτέλεσμα της δράσης των φαινολών είναι η μείωση διαφόρων παραγόντων κινδύνου και η πρόληψη διαφόρων ασθενειών (πχ αθηροσκλήρωση) διότι στις φαινολικές ενώσεις έχει αποδοθεί αντιοξειδωτική και αντι-φλεγμονώδης δράση (Kaliora κ.α., 2006; Giochari κ.α., 2016). Για όλους αυτούς τους λόγους η γνώση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου είναι σημαντική τόσο στα βρώσιμα όσο και στα φαρμακευτικά μανιτάρια. Η πιο πολυχρησιμοποιημένη μέθοδος προσδιορισμού του συνολικού φαινολικού περιεχομένου ενός δείγματος (πχ φρούτων, λαχανικών) είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu, η οποία



και χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων των μανιταριών *Ganoderma*. Ωστόσο εκτός από αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιείται και η Folin–Denis, που είναι και αυτή δοκιμασία τύπου Folin (Padda και Picha, 2007).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με λοιπές βιβλιογραφικές αναφορές έγινε αντιληπτό ότι τόσο το είδος των προς μελέτη μανιταριών όσο ο τρόπος εκχύλισης, η επιλογή του διαλύτη αλλά και η ύπαρξη φαινολο-πρωτεϊνικών συμπλόκων καθορίζουν την απόδοση της εκχύλισης και κατ'επέκταση και το φαινολικό περιεχόμενο. Υπενθυμίζεται ότι στην παρούσα εργασία με την υδατική εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία (ΨΕ), εκχυλίστηκαν πολύ περισσότερα φαινολικά συστατικά (και στα μυκηλιακά και στα καρποσωμικά εκχυλίσματα) σε σχέση με την υδατική εκχύλιση σε υψηλότερη θερμοκρασία (ΘΕ). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Wang και Xu (2014), σε εδώδιμα. Στην μελέτη των Wang και Xu (2014) προσδιορίστηκε επιπλέον και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο εκχυλισμάτων των οποίων η εκχύλιση έγινε με ακετόνη και αιθανόλη, από όπου και προέκυψε ότι τα υδατικά εκχυλίσματα ήταν πιο πλούσια σε φαινόλες από εκείνα με ακετόνη και αιθανόλη, χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα (Abugri και McElhenney, 2013). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι απεσταγμένο υδατικό εκχύλισμα από *G. applanatum* περιείχε 4,45 mg/ mL σε TA/PGA ισοδύναμο, το περιεχόμενο του οποίου ήταν μικρότερο σε σχέση με τα αντίστοιχα αιθανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα (Abugri και McElhenney, 2013). Το ότι με την ΨΕ το φαινολικό περιεχόμενο ήταν μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της ΘΕ, αλλά και το γεγονός ότι το γένος και το είδος των υπό μελέτη μανιταριών καθορίζει το φαινολικό περιεχόμενο, φάνηκε και από την εργασία του Hsu Ching-yu (2013). Μάλιστα συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της δικής τους εργασίας με τα δικά μας διαπιστώνεται ότι το φαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων *Ganoderma* ήταν κατά πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των *G. aboinese*, *G. atrum*, *G. lucidum* και *G. sinense*, στα οποία όχι μόνο το TPC ήταν αρκετά χαμηλότερο (TPC <2000μg GAE/g), αλλά και πάρα πολύ μικρότερο σε σχέση με τα μανιτάρια *Pleurotus* spp και τα *Agaricus* spp της εργασίας του Hsu Ching-yu (2013).

Αν και μπορούν να σημειωθούν ομοιότητες μεταξύ των αποτελεσμάτων της εργασίας αυτής και των παραπάνω βιβλιογραφικών αναφορών, η τάση που παρατηρήθηκε δεν είναι καθολική. Υπενθυμίζοντας ότι το TPC των εκχυλισμάτων (μυκηλίων και καρποσωμάτων) υψηλότερης θερμοκρασίας ήταν κάτω από 200mg/l χωρίς να παρουσιάζονται πολύ μεγάλες διακυμάνσεις, με τα ψυχρά εκχυλίσματα να παρουσιάζουν ελαφρώς μεγαλύτερο TPC. Αντίθετα, από την μελέτη των Tan κ.α. (2015) επί του *Ganoderma neo-japonicum*, φαίνεται ότι στα υδατικά θερμής εκχύλισης εκχυλίσματα των καρποσωμάτων το TPC είναι μεγαλύτερο και όχι στα μυκηλιακά, με την υδατική εκχύλιση σε υψηλή θερμοκρασία να αποδίδει μικρότερο φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με την αντίστοιχη αιθανολική. Η διαφοροποίηση αυτή δυσχεραίνει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων αφού κατά περίπτωση υπάρχουν διαφορές, τόσο ως προς το είδος των εξεταζόμενων μανιταριών και του τρόπου καλλιέργειας που ακολουθήθηκε αλλά και ως προς το είδος της εκχύλισης. Επιπλέον αξίζει να τονιστεί, ότι ο διαφορετικός χρόνος ολοκλήρωσης της ζύμωσης στην υγρή καλλιέργεια αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει τη σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων, δεδομένου ότι σε πείραμα που έγινε αποκλειστικά με *G. lucidum* το φαινολικό περιεχόμενο αποδείχθηκε ότι ήταν χρονο-εξαρτώμενο της ζύμωσης (Chien κ.α., 2011).

Μετά από τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu ακολούθησε και ο προσδιορισμός των απλών πολυφαινολών των υδατικών εκχυλισμάτων με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας (GC-MS). Σε βιβλιογραφικά δεδομένα όπου προσδιορίστηκε το φαινολικό περιεχόμενο του μανιταριού *G. lucidum*, εντοπίστηκε η ύπαρξη γαλλικού οξέος, πυρογαλλόλης, 5-σουλφοσαλικυλικού οξέος,

πρωτοκατεχικού οξέος, κατεχίνης, μυρισετίνης, κερκετίνης, καμπερολόλης, εσπερετίνης, η συνολική συγκέντρωση των οποίων ήταν 162 μg/g (Kim κ.α., 2008). Σε άλλη μελέτη έχουν εντοπιστεί *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ και *p*-Κουμαρικό οξύ (Heleno κ.α, 2012). Φαίνεται λοιπόν ότι η συγκέντρωση των συνολική φαινολικών οξέων των εκχυλισμάτων των υπό μελέτη μανιταριών είναι μικρότερη από αυτή που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία, ενώ οι μόνες κοινές ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί ήταν το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό και το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Συγκρίνοντας τη σύσταση των μανιταριών *Ganoderma* σε φαινόλες όπως αυτή παρουσιάζεται στις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές και στα αποτελέσματα μας, με το φαινολικό περιεχόμενο των βασιδιομυκήτων *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Russula delica* και *Suillus bellinii* (όπως αυτό προέκυψε με τη μέθοδο SIM) παρατηρείται ότι το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ είναι το κατεξοχήν κοινό φαινολικό οξύ (Kalogeropoulos κ.α, 2013). Ενώ φαινολικές ενώσεις όπως, το καφεϊκό οξύ, η ρεσβερατρόλη, η βανιλίνη, το κινναμωμικό οξύ, η τυροσόλη, το βανιλικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το συριγκικό οξύ, ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα εκχυλίσματα των εξεταζόμενων μανιταριών, οι αντίστοιχες στα *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Russula delica* και *Suillus bellinii* ανιχνεύτηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση έως και καθόλου. Ακόμα, υπενθυμίζεται ότι στα εκχυλίσματα των μυκηλίων η συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών είναι μεγαλύτερη από εκείνη των καρποσωμάτων και πως τα ΨΕ είναι αυτά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση απλών φαινολών σε σχέση με τα ΘΕ. Ακόμα, συγκρίνοντας τη συνολική συγκέντρωση απλών φαινολών των καρποσωμάτων Ο και Β, όπως αυτή προέκυψε από τη μέθοδο SIM, δεν μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για το ποιο υπόστρωμα ευνοεί την παραγωγή μεγαλύτερης συγκέντρωσης απλών φαινολών, ενώ παρατηρείται διαφοροποίηση των ουσιών που ανιχνεύτηκαν στις πολυφαινόλες ανάλογα με το υπόστρωμα και το είδος της εκχύλισης.

Επιπλέον, υπενθυμίζεται ότι με τη μέθοδο SCAN αντλήθηκαν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με το υδατανθρακικό και αμινοξικό περιεχόμενο των μυκηλιακών εκχυλισμάτων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με τη βιβλιογραφία, διαπιστώνεται ότι έχουν απομονωθεί από μανιτάρια *Ganoderma (lucidum* και *tsugae)* υδατάνθρακες και συγκεκριμένα γλυκάνες, όπως: b-(1→3)-γλυκουρονογλυκάνη, μαννογαλακτογλυκάνη, αραβινογλυκάνη, γλυκογαλακτάνη. Επιπλέον είναι γνωστό ότι έχουν απομονωθεί συμπλέγματα πρωτεϊνο-γλυκανών στα οποία το 9,3% ήταν πρωτεΐνη συζευγμένη με α-ετεροπολυσακχαρίτες όπως η μαννόζη και η ξυλόζη, συμπλέγματα πρωτεϊνο-γλυκανών με 25,8% πρωτεΐνη αλλά και γλυκο-πρωτεΐνες με γλυκόζη ως κύριο δομικό λίθο στην οποία εντοπίζονται αραβινόζη, μαννόζη, ξυλόζη και γαλακτόζη (Wasser, 2002). Έπειτα από ανάλυση των αμινοξέων εκχυλισμάτων *G. lucidum*, βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι έχουν εντοπιστεί: ασπαρτικό οξύ, θρεονίνη, σερίνη, γλουταμινικό οξύ, προλίνη, γλυκίνη, αλανίνη, βαλίνη, μεθειονίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, ιστιδίνη, λυσίνη και αργινίνη (Sanodiya κ.α., 2009).

Στην παρούσα εργασία σημασία δόθηκε και στην ποσοτικοποίηση των συνολικών τριτερπενοειδών. Η αξία των τριτερπενοειδών είναι σημαντική για αυτό και χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελούν τα τριτερπενοειδή φυτικής προέλευσης, τα οποία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και στις χημικές βιομηχανίες. Ένας ακόμα λόγος για τον οποίο αυξάνεται το ενδιαφέρον σχετικά με τα τριτερπενοειδή είναι η οικολογική τους σημασία, αφού μπορούν να ελέγξουν τους επιβλαβείς οργανισμούς και να προστατέψουν τους φυτικούς οργανισμούς από το στρες που μπορεί να προκληθεί από αβιοτικούς παράγοντες (Tholl, 2015). Για τους παραπάνω λόγους η ποσοτικοποίηση των τριτερπενοειδών έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον. Επειδή δεν είναι αρωματικές ενώσεις όπως τα φαινολικά η ποσοτικοποίηση και ανάλυση τους με φασματοσκοπία UV είναι δύσκολη, ενώ οι συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι χρωματογραφικές, όπως:



HPLC, GC/MS και GC-FID (Huie κ.α., 2004; Ha κ.α., 2015; Alalan κ.α., 2016). Ωστόσο έχουν αναπτυχθεί χρωματομετρικές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την ποσοτικοποίηση φυτικών τερπενοειδών, ενώ με κάθε επιφύλαξη αντίστοιχη εφαρμογή για τερπενοειδή σε μανιτάρια δεν έχει λάβει χώρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα εδάφια, το περιεχόμενο των συνολικών τριτερπενοειδών των υδατικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με χρωματομετρική μέθοδο, βασισμένη στους Fan και He (2006); Hiai κ.α., (1976) αν και παρόμοια μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και από τους Shiau (2009); Chen κ.α. (2010), με τη διαφορά ότι αυτοί ταυτοποίησαν σαπωνίνες και χρησιμοποίησαν διαφορετικό πρότυπο. Ακόμα ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέθοδος εκτίμησης της συγκέντρωσης των τερπενοειδών όπως χρησιμοποιείται από τους Ghorai κ.α. (2012). Λόγω αδυναμίας εύρεσης βιβλιογραφίας που να αφορά ποσοτικοποίηση τερπενοειδών σε μανιτάρια με χρωματομετρικές τεχνικές δεν έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με κάποια βιβλιογραφική αναφορά. Ωστόσο, υπενθυμίζεται ότι με την εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία (μυκηλίων και καρποσωμάτων) επιτεύχθηκε παραλαβή περισσότερων τριτερπενοειδών σε σχέση με την εκχύλιση σε υψηλή θερμοκρασία.

Τέλος, εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων μυκηλίων και καρποσωμάτων. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι είναι: η μέθοδος 1,3-διεθυλ-2-θειοβαρβιτουρικού οξέος (DETBA), η μέθοδος Oyaizu για τον προσδιορισμό της αναγωγικής ισχύς, η μέθοδος δέσμευσης της ελεύθερης DPPH• και υδροξυλικής ρίζας καθώς και η μέθοδος FRAP και αυτή του Shimada. Στη παρούσα εργασία από τις παραπάνω μεθόδους χρησιμοποιήθηκε αυτή της δέσμευσης της ελεύθερης DPPH• αλλά και αυτή της μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ορού (Total Serum Oxidizability). Φάνηκε ότι όλα τα ΨΕ παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• σε σχέση με αυτή της ΘΕ, με εξαίρεση την περίπτωση του *G. adspersum*, ενώ από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων, μόνο τα εκχυλίσματα ΨΕ επιδεικνύουν ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH• και από αυτά, κυρίως εκείνα που ανήκουν στα είδη *G. adspersum*, *G. resinaceum*, *G. lucidum* των οποίων η καλλιέργεια έγινε σε υπόστρωμα βελανιδιάς. Το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα από μανιτάρια *Ganoderma* επιδεικνύουν αντιοξειδωτική ικανότητα δεν αποτελεί έκπληξη (Lindequist κ.α., 2005; Sanodiya κ.α., 2009), καθώς την ικανότητα οφείλονται και οι φαρμακευτικές τους χρήσεις. Επιπλέον, σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• είναι τόσο η επιλογή του διαλύτη, όσο και του πρωτοκόλλου εκχύλισης των υπό μελέτη δειγμάτων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν με ήδη υπάρχουσες μελέτες, η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• όλων των εκχυλισμάτων είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη που παρατίθεται από τους Kim κ.α. (2008) όταν μελέτησαν το *G. lucidum*. Μειωμένη φαίνεται να είναι η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• σε σχέση με εκείνη που αναφέρεται από τους Alispahic κ.α. (2015) για τα μανιτάρια *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus* και *Boletus edulis*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό του Hsu Ching-yu (2013) όπου η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH• από τα *G. aboinese*, *G. atrum*, *G. lucidum* και *G. sinense* ήταν αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με την ικανότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων. Επιπλέον, στην εργασία του Hsu Ching-yu (2013) παρατηρήθηκε ότι τα ΘΕ φέρουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα ΨΕ κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Όσον αφορά στο κομμάτι της διερεύνησης του αντιοξειδωτικού δυναμικού μετρώντας την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Serum Oxidizability), προέκυψε ότι σχεδόν όλα τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα παρατείνοντας τον χρόνο αντίστασης (σε λεπτά) στην οξείδωση του ορού του αίματος, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος στο οποίο εκτιμήθηκε η ικανότητα

δέσμευσης της ρίζας DPPH•. Η αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάστηκε στα εκχυλίσματα της ΨΕ των μυκηλίων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με τα αντίστοιχα ΘΕ και το ίδιο συνέβη και με τα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας (από 0,5μL σε 1,0 μl) εκχυλίσματος αύξησε και την αντιοξειδωτική δράση, παρατείνοντας περισσότερο τον χρόνο αντίστασης (σε λεπτά) στην οξείδωση του ορού του αίματος. Αυτή ήταν μικρότερη στα εκχυλίσματα των καρποσωμάτων σε σχέση με αυτή των μυκηλίων. Άρα, τα υδατικά μυκηλιακά εκχυλίσματα (και πολύ περισσότερο τα ψυχρά) εμφανίζουν το μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό δυναμικό. Τόσο κατά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με βάση τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH•, όσο και κατά τον προσδιορισμό χρόνου αντίστασης του ορού του αίματος στην οξείδωση, τα εκχυλίσματα ΘΕ έχουν επιδείξει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα που μπορεί να οφείλεται σε μετουσίωση βιοδραστικών ενώσεων όπως οι ελεύθερες πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες των πρωτεΐνο-συμπλεγμάτων (Ferreira κ.α., 2015). Για το λόγο αυτό ίσως να μην ήταν κατάλληλο το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε και θα έπρεπε να τροποποιηθεί, για παράδειγμα η ΘΕ να γίνει σε 30 λεπτά (Hsu Ching-yu, 2013). Σε κάθε περίπτωση, τα ευρήματα είναι ικανοποιητικά δεδομένου ότι παρατείνεται ο χρόνος εμφάνισης της οξειδωμένης LDL του πλάσματος, η οποία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση αθηροσκλήρωσης και γενικά καρδιαγγειακών νόσων (Esterbauer και Ramos, 1995). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με άλλα παραπλήσιου περιεχομένου, επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων από μανιτάρια *Ganoderma* (Sanodiya κ.α., 2009), με τη διαφορά ότι στην παρούσα μελέτη, σε καμία περίπτωση τα *G. lucidum* δεν ήταν αυτά που εμφάνισαν τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα (συγκριτικά με την αντιοξειδωτική δράση των υπόλοιπων μελετώμενων *Ganoderma*) παρόλο που η διάρκεια της ζύμωσης τους ήταν η μεγαλύτερη μεταξύ των υπολοίπων. Το τελευταίο σημειώνεται δεδομένου ότι σε πείραμα που έγινε αποκλειστικά με *G. lucidum* η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα αποδείχθηκε χρονο-εξαρτώμενη της ζύμωσης (Chien κ.α., 2011). Επίσης, βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι η ικανότητα αναστολής οξείδωσης της LDL έχει αποδοθεί στη δυνατότητα που έχουν τα φαινολικά συστατικά να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL και στην ύπαρξη καλής συσχέτισης μεταξύ τους (Chien κ.α., 2011).

Η πιο συνηθισμένη ερμηνεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι στην ύπαρξη φαινολικών ουσιών, χωρίς να είναι η μόνη. Πολλοί είναι αυτοί που αποδίδουν την ικανότητα σάρωσης ριζών στην ύπαρξη πολυσακχαριτών, εικάζοντας ότι αυτοί αφαιρούν το ανωμερικό υδρογόνο των μονοσακχαριτών τους συμβάλλοντας έτσι στην ικανότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, οι πολυσακχαρίτες ενισχύουν περισσότερο την αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες, επειδή η απόσπαση ανωμερικού υδρογόνου από εσωτερικό μονομερές του πολυσακχαρίτη(μονοσακχαρίτη) είναι πιο εύκολη σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες (Tsiapali κ.α, 2001; Ren, 2014; Ferreira κ.α., 2015). Σύμφωνα με τους Heleno κ.α. (2012); Shi κ.α. (2013) οι πολυσακχαρίτες με στους μονοσακχαρίτες που αυτοί φέρουν, το μοριακό μέγεθος, τη δομή και τη διαμόρφωση τους προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση. Ενώ ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε μελέτη που έγινε η ικανότητα σάρωσης της ρίζας αποδόθηκε στην ύπαρξη του γανοδερμικού πολυσακχαρίτη (GLP), όπου παρατηρήθηκε αύξηση της ικανότητας σάρωσης λόγω αύξησης της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη (Kim κ.α., 2008). Επιπλέον, εκτός από τους πολυσακχαρίτες, ικανότητα σάρωσης ρίζας DPPH• επιδεικνύουν και οι πρωτεΐνο-πολυσακχαρίτες, με το πρωτεϊνικό (πεπτιδικό) τμήμα του συμπλέγματος να καθορίζει ακόμα και την ικανότητα σάρωσης της ρίζας. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και αυτοί που ισχυρίζονται ότι κλάσματα πολυσακχαριτών δεν συμμετέχουν στην σάρωση ελευθέρων ριζών (Saltarelli κ.α, 2009). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η κυστεΐνη, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ, η τοκοφερόλη, οι πολυυδροξυ αρωματικές ενώσεις και οι αρωματικές αμίνες θα μπορούσαν να ανάγουν και να αποχρωματίσουν την ρίζα (Shi κ.α., 2013). Άλλωστε υπάρχουν αναφορές ότι η αντιοξειδωτική

δράση οφείλεται στην παρουσία φαινολών λόγω των οξειδοαναγωγών τους ιδιοτήτων (Kim κ.α., 2008; Saltarelli κ.α., 2009; Shi κ.α., 2013).

Ανακεφαλαιώνοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνοψίζονται τα ακόλουθα:

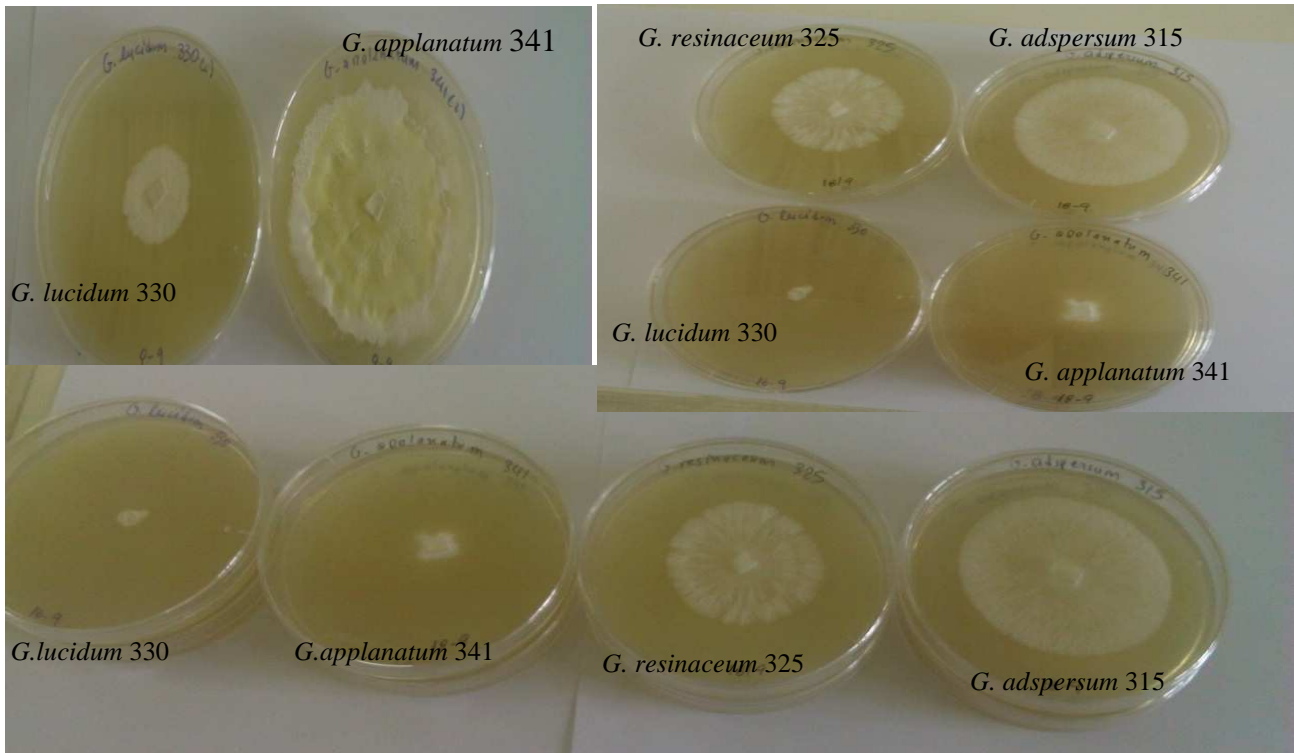
Η βελανιδιά ήταν το υπόστρωμα που ευνόησε περισσότερο την καλλιέργεια και την παραγωγή ώριμων καρποσωμάτων σε σχέση με την οξιά. Όλα τα στελέχη *Ganoderma* που μελετήθηκαν συνέθεσαν σημαντική ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών, γεγονός που μπορεί να συνδεθεί και με την βιοδραστική ικανότητα που επέδειξαν. Τα μυκήλια των μανιταριών *Ganoderma* περιείχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαρίτες και λιπίδια σε σχέση με τα καρποσώματα, ενώ ο χρόνος ολοκλήρωσης της καλλιέργειάς τους περιορίστηκε σε λίγες βδομάδες σε αντίθεση με τα καρποσώματα που χρειάστηκαν μήνες. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα των μυκηλίων ήταν αυτά με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα αντίστοιχα των καρποσωμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση φαινολών, τερπενίων αλλά και στο γεγονός ότι στα μυκήλια η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των καρποσωμάτων.

Τα εκχυλίσματα των μανιταριών των οποίων η καλλιέργεια έγινε σε βελανιδιά ήταν πιο βιοδραστικά σε σχέση με τα αντίστοιχα σε οξιά, ενώ εντύπωση προκάλεσε η περίπτωση του *G. applanatum*, διότι αν και περιείχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών σε σχέση με τα υπόλοιπα μανιτάρια δεν ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα. Όλα σχεδόν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα εμφάνισαν αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά όσα ελήφθησαν σε χαμηλή θερμοκρασία εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα σε υψηλή. Αυτό μπορεί οφείλεται στην παραλαβή υψηλότερης συγκέντρωσης φαινολών, τερπενίων και λοιπών βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. οι πολυσακχαριτών). Από τα εξεταζόμενα μανιτάρια, ξεχώρισε το *G. resinaceum* το οποίο όχι μόνο περιείχε τη πολύ μεγάλη συγκέντρωση πολυσακχαριτών, αλλά και τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα, ενώ πολύ καλά παραγωγικά και βιοδραστικά χαρακτηριστικά εμφάνισε και το *G. adspersum*.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ



A) Ανάπτυξη μανιταριών *Ganoderma* spp σε τρυβλία με PDA



B) Υγρές καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης



*G. resinaceum*

*G. applanatum*

*G. adspersum*

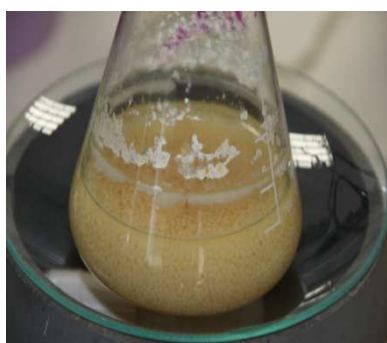




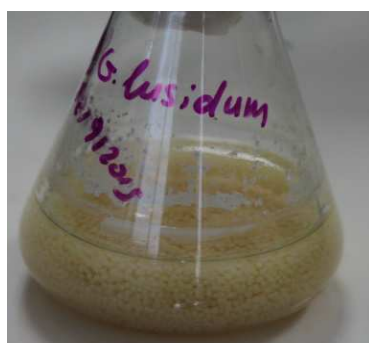
*G. lucidum* 330



*G. lucidum* 331



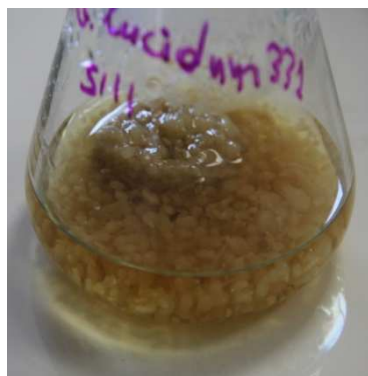
*G. lucidum* 331



*G. lucidum* 331



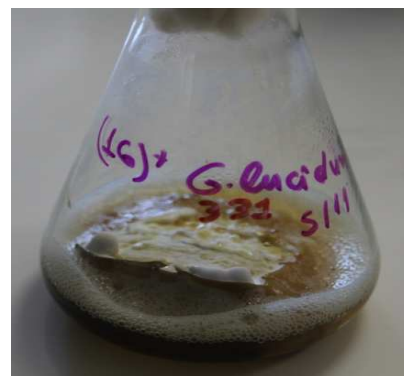
*G. lucidum* 331



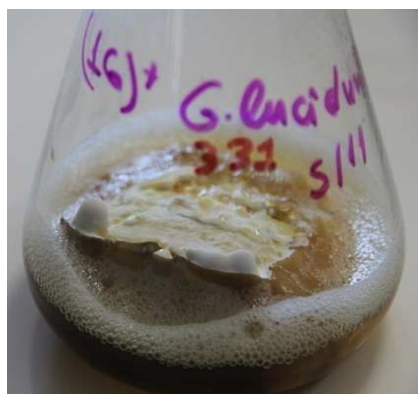
*G. lucidum* 331



*G. lucidum* 331



*G. lucidum* 331



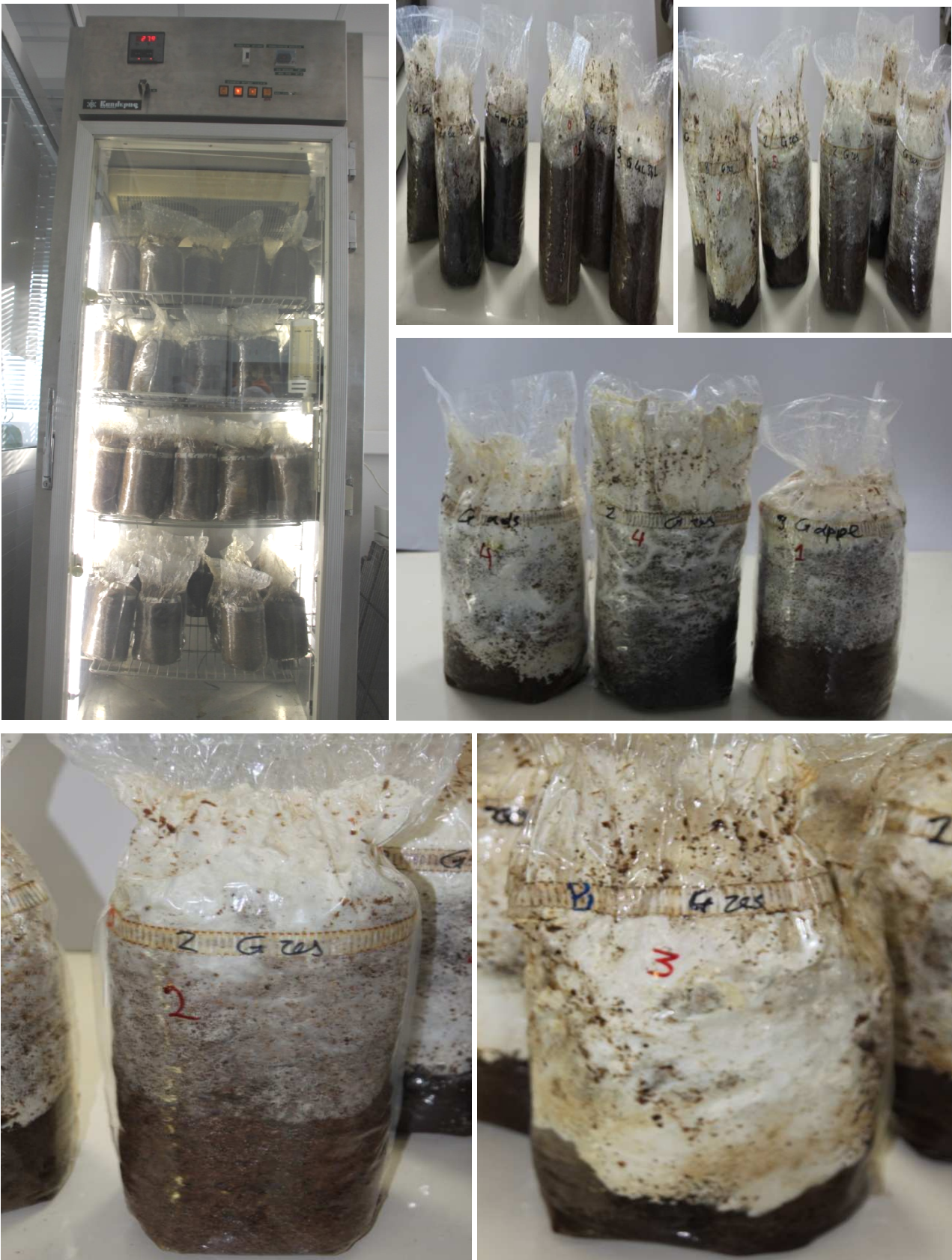
*G. lucidum* 331



*G. lucidum* 331

Γ) Ζύμωση στερεάς κατάστασης σε αποστειρωμένους σάκους

Ανάπτυξη μανιταριών σε στερεό υπόστρωμα





## Επώαση-αποικισμός υποστρώματος

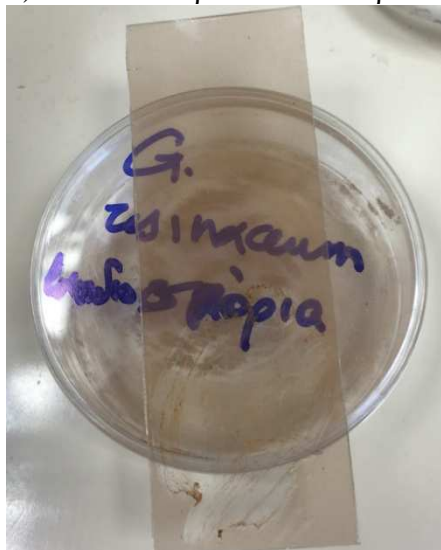
1<sup>ο</sup> κύμα καρποφορίας



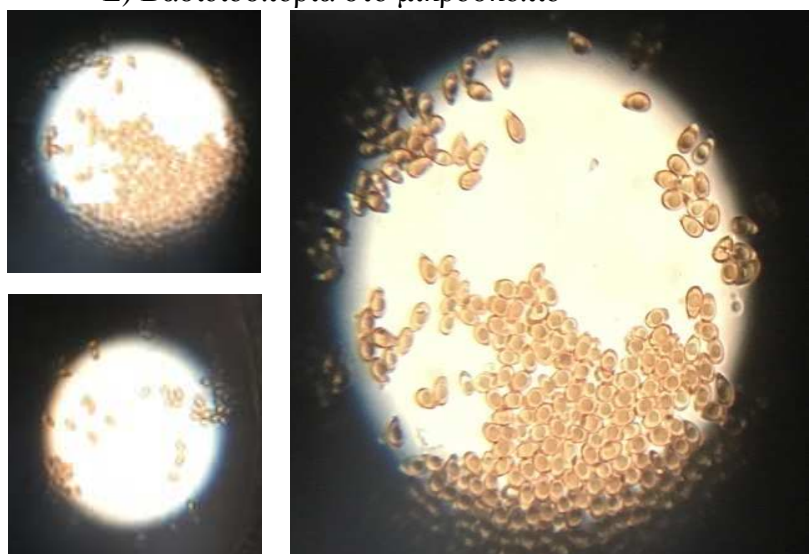




Δ) Βασιδιοσπόρια σε καλυπτρίδα



Ε) Βασιδιοσπόρια στο μικροσκόπιο



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abugri** D.A. and McElhenney W.H. (2013). Extraction of total phenolic and flavonoids from edible wild and cultivated medicinal mushrooms as affected by different solvents. *Journal of Natural Product and Plant Resources* 3 (3): 37-42.
- Adejumo** T.O., Coker M.E. and Akinmoladun V.O. (2015). Identification and evaluation of nutritional status of some edible and medicinal mushrooms in Akoko Area, Ondo State, Nigeria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4 (4): 1011-1028.
- Aggelis** G., Iconomou D., Christou M., Bokas M., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V. and Papanikolaou S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research* 37 (16): 3897-3904.
- Aida** F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M. and Maaruf A.G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20 (11-12): 567-575.
- Alalan** L., AL-Shammaa I. and Al-nouri A. S. (2016). Isolation and identification of six terpenes extracted from leaves of *Inula viscosa* (L.) grown in Syria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8 (1): 27-31.
- Alispahić**, A., Šapčanin, A., Salihović, M., Ramić, E., Dedić, A. and Pazalja M. (2015). Phenolic content and antioxidant activity of mushroom extracts from Bosnian market. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* 44: 5-8.
- André A.**, Diamantopoulou P., Philippoussis A., Sarris D., Komaitis M., Papanikolaou S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products* 31 (2): 407-416.
- Babu** P.D. and Subhasree R.S. (2008). The sacred mushroom “Reishi”. *American-Eurasian Journal of Botany* 1 (3): 107-110.
- Bano** S. (2007). Chemistry of natural products, Terpenoids. *National Science Digital Library at Nisclair* 3:1-21
- Benzie** I.F.F. and Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.
- Bishop** K.S., Kao C. H.J., Xu Y., Glucina M.P., Russell R., Paterson M. and Ferguson L.R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry* 114: 56–65.
- Boh** B., Berovic M., Zhang J. and Zhi-Bin L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology annual review* 13: 265-301
- Bommarius** A.S. and Riebel B.R. (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. *Wiley-VCH* 1: 7.
- Campbell** W.G. (1932). The chemistry of the white rots of wood. The effect on wood substance of *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Fomes fomentarius* (Linn.) Fr., *Polyporus adustus* (Willd.) Fr., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Fr., *Armillaria mellea* (Vahl.) Fr., *Trametes pini* (Brot.) Fr., and *Polystictus abietinus*(Dicks.) Fr. *Biochemical Journal* 26 (6): 1829-38.
- Chan** G.C.-F., Chan W.K. and Sze D.M.-Y. (2009). The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2: 25.
- Chang** M.Y., Tsai G.J. and Houng J.Y. (2006). Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 407–14.
- Chang** S.-T. Training manual on mushroom cultivation technology. United Nations - Nations Unies Economic and Social Commission for Asia and the Pacific Asian and Pacific Centre for Agricultural Engineering and Machinery (APCAEM) A-7/F, China International Science and Technology Convention Centre No. 12: 1-65.
- Chen** A.W. (2002). Natural-log cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma Lucidum* (Reishi) The Mushroom Growers’ Newsletter USA:1-5.
- Chen** A.W. (2004). Mushrooms for the tropics growing *Ganoderma* mushrooms. Oyster mushroom cultivation, Part III. *Mushrooms Worldwide* 11: 1-11.
- Chen** Y.-F., Yang C.-H., Chang M.-S., Ciou Y.-P. and Huang Y.-C. (2010). Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 4417-4425.
- Cheung** P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 35: 292–299.
- Chien** Y.L., Ho C.T., Chiang B.H. and Hwang L.S. (2011). Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium. *Food Chemistry* 126: 1586–1592.
- Chien** R.-C., Yen M.-T., Tseng Y.-H. and Mau J.-L. (2015). Chemical characteristics and anti-proliferation activities of *Ganoderma tsugae* polysaccharides. *Carbohydrate. Polymers* 128: 90–98
- Chin** T. C. (1997-2000). Studies on the medicinal properties of local *Ganoderma* sp. Universiti Putra Malaysia Institutional Repository Agricultural Sciences, Research Report, 2 (2): 69-72.



- Davis** E.M. and Croteau R., (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry, Biosynthesis* 209: 53-95.
- Deepalakshmi** K. and Mirunalini S.(2011). Therapeutic properties and current medical usage of medical mushroom *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2 (8): 1922-1929.
- Diamantopoulou** P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G. and Philippoussis A. (2012). Mushroom Polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied biochemistry and biotechnology* 167 (3): 536–551.
- Diamantopoulou** P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G. and Philippoussis A. (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 37 (7): 1385-1400.
- Diamantopoulou** P., Papanikolaou S., Aggelis G. and Philippoussis A. (2016). Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food Chemistry* 196: 272–280.
- Dill** I. and Kraepelin G. (1986). Palo Podrido: Model for Extensive Delignification of Wood by *Ganoderma applanatum*. *Applied and environmental microbiology* 52 (6): 1305-1312.
- Dubois** M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., and Smith F. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350- 356.
- Elissetche** J.-P, Ferraz A., Freer J. and Rodríguez J. (2007). Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:429–434.
- Erkel** E.I. (2009). The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7 (3&4): 84 –844.
- Esterbauer** H. and Ramos P. (1995). Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 127: 31-64.
- Fan** J.-P., and He C.-H. (2006). Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (3): 950–956.
- Fang**, Q.-H., and Zhong, J.-J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37 (7): 769–774.
- Fang** Q.H. and Zhong J.J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10 (1): 61–65.
- Fang** Q.-H. and Zhong J.-J. (2002). Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress* 18: 51-54.
- Feeney** M.J., Miller A.M. and Roupas P. (2014). Mushrooms-biologically distinct and nutritionally unique exploring a “third food kingdom”. *Nutrition Today* 49 (6): 301-307.
- Ferreira** I.C.F.R. Heleno S.A., Reis F.S., Stojkovic D., Queiroz M.J.R.P., Vasconcelos M.H. and Sokovic M. (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry* 114: 38–55.
- Fišerová** M., Opálená E. and Illa A. (2013). Comparative study of hemicelluloses extraction from beech and oak wood. *Wood research* 58 (4): 543-554.
- Folch** J., Lees M. and Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Fountoulakis** M.S., Dokianakis S.N., Kornaros M. E., Aggelis G.G. and Lyberatos G. (2002). Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36 (19): 4735-4744.
- Fraga** I., Coutinho J., Bezerra R. M., Dias A. A., Marques G., Nunes F.M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features. *Carbohydrate Polymers* 111: 936–946.
- Gale** T. (2006). Reishi mushroom. *Encyclopedia of Alternative. Medicine, eNotes.com*. Second edition 3: 1721-1722.
- Ghorai** N., Chakraborty S., Gucchait S., Saha S.K. and Biswas S. (2012). Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. *American Society of Plant Physiologists* 127: 1256-1265.
- Giavasis** I. (2013). Production of microbial polysaccharides for use in food. *Technological Educational Institute of Larissa, Greece* 16: 413-468.
- Gioxari** A., Kogiannou D.A.A., Kalogeropoulos N. and Kaliora A.C. Phenolic compounds: bioavailability and health effects. *Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health*: 339-345.
- Gurung** O.K., Budathoki U. and Parajuli G. (2012). Effect of different substrates on the production of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) Karst. *Our Nature*, 10 (1): 191-198.
- Ha** D.T., Loan L.T., Hung T.M., Han L.V.N., Khoi N.M., Dung L.V., Min B.S. and Nguyen N.P.D. (2015). An improved HPLC-DAD method for quantitative comparisons of triterpenes in *Ganoderma lucidum* and its five related species originating from Vietnam. *Molecules* 20 (1): 1059-1077.

- Han** J.R., An C.H. and Yuan J.M. (2005). Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. *Journal of Applied Microbiology* 99: 910–915.
- Heleno** S. A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Santos-Buelga C. and Ferreira I.C.F.R. (2012). Fruiting body, spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International* 46 (1): 135-140.
- Heleno** S.A., Martins A., Queiroz M.J.R.P. and Ferreira I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry* 173: 501–513.
- Heydarian** M., Hatamian A., Amoabediny G., Yazdian F. and Doryab A. (2015). Synergistic effect of elicitors in enhancement of ganoderic acid production: optimization and gene expression studies. *Applied Food Biotechnology* 2 (3): 57-62.
- Hiai** S., Oura H. and Nakajima T. (1976). Color Reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Research Institute for Wakan-Yaku (Oriental Drugs), Toyama University, Japan Planta medica* 29 (2): 116-122.
- Hsieh** C. and Yang F.-C. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology* 91 (1), 105–109.
- Hsieh** C., Hsu T.H. and Yang F.C. (2005). Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochemistry* 40 (2): 909–16.
- Hsieh** C, Tseng M.H. and Liu C.J. (2006). Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC36041) under limitations of nutrients. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1-2): 109–17.
- Huang** C.-T. (2000). Microbiology, microbial metabolism II, Catabolism & Anabolism, διαφάνειες.
- Huie** C.W. and Di X. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B* 812 (1-2): 241–257.
- Hyde** K.D., Bahkali A.H. and Moslem M.A. (2008). Fungi—an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity*, 43 (1): 2010.
- Israilides** C., Kletsas D., Arapoglou D., Philippoussis A., Pratsinis H., Ebringerová A., Hříbalová V. and Harding S.E. (2008). In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine* 15 (6-7): 512–519.
- Jayasinghe** C., Intiaj A., Hur H., Lee G.W., Lee T.S. and Lee U.Y. (2008). Favorable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *Ganoderma lucidum*. *Mycobiology* 36(1): 28-33.
- Kaliora** A.C., Dedoussis G.V.Z., Schmidt H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187 (1): 1-17.
- Kalogeropoulou** N., Yanni A. E., Koutrotsios G. and Aloupi M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece *Food and Chemical Toxicology* 55: 378-385.
- Ke** L., Wu Q. and Zhang D. (2011). Bioconversion of rape straw into a nutritionally enriched substrate by *Ganoderma lucidum* and yeast. *African Journal of Biotechnology* 10 (29): 5648-5653.
- Khoddami** A., Wilkes M.A. and Roberts T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18 (2): 2328-2375.
- Kim** M.H., Kim S.W., Hwang H.J, Park M.K, Mahmoud Y.A.-G., Choi J.W., and Yun J.W. (2006). Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (8): 1240–1247.
- Kim** M.Y., Seguin P., Ahn J.-K, Kim J.-J., Chun S.-C, Kim E.-H. , Seo S.-H., Kang E.-Y., Kim S.-L, Park Y.-J., Ro and Chung I.-M. (2008). Phenolic Compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 56 (16): 7265–7270.
- Kim** S.W., Hwang H.J., Park J.P., Cho Y.J., Song C.H. and Yun J.W. (2002). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 34 (1): 56-61.
- Kues** U., Liu Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54 (2): 141-152.
- Lakhtar** H., Ismaili-Alaoui M., Philippoussis A., Perraud-Gaime I. and Roussos S. (2010). Screening of strains of *Lentinula edodes* grown on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64 (3): 167-172.
- Lange** B. M., Rujan T., Martin W., and Croteau R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (24): 13172–13177.
- Latgé** J.-P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66 (2): 279–290.

- Lee** W.Y., Park Y., Ahn J.K., Hyeon K. and Park S.Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2): 249–254.
- Li** M., Chen T., Gao T., Miao Z., Jiang A., Shi L., Ren A. and Zhao M.. (2015). UDP-glucose pyrophosphorylase influences polysaccharide synthesis, cell wall components, and hyphal branching in *Ganoderma lucidum* via regulation of the balance between glucose-1-phosphate and UDP glucose. *Fungal Genetics and Biology* 82: 251–263.
- Li** Y., Zhao (Kent) Z., Bai F.(2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (3): 312–317.
- Li** Y., Wang J. and Zhong J.-J. (2013). Enhanced recovery of four antitumor ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* mycelia by a novel process of simultaneous extraction and hydrolysis. *Process Biochemistry* 48 (2): 331–339.
- Liang** Y., Sarkany N., Cui Y. and Blackburn J.W. (2010). Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology* 101 (17): 6745–6750.
- Liu** X., Xu S.-P., Wang J-H, Yuan J.-P., Guo L.-X., Li X. and Huang X.-N. (2007). Characterization of ganoderma spore lipid by stable carbon isotope analysis: implications for authentication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (3): 723–731.
- Lindequist** U., Niedermeyer T.H.J. and Julich W.-D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2 (3):285–299.
- Lomberh** M.L., Solomko E.F., Buchalo A.S. and Kirchoff B. (2002). Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. *Mushroom Biology and Mushroom Products*.
- Lv** G-p. , Zhao J., Duan J-a. , Tang Y-p and Li S-p. (2012). Comparison of sterols and fatty acids in two species of *Ganoderma*. *Chemistry Central Journal* 6:10.
- Madland** E. (2013). Extraction, isolation and structure elucidation of saponins from *Herniaria incana*. Norwegian University of Science and Technology Department of Chemistry. Institutt for kjemi: 82.
- Magday** J.J.C, Bungihan M.E, and Dulay R.M.R. (2014). Optimization of mycelial growth and cultivation of fruiting body of Philippine wild strain of *Ganoderma lucidum*. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 4 (2): 162–172.
- Manpreet** S., Sachin S, and Banerjee S. (2005). Influence of Process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology* 1 (2): 1-9.
- Martinez** A.T., Barrasa J.M., Prieto A. and Blanco M.N. (1991). Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycological Research* 95 (7): 782-784.
- Martins** S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C. N. and Teixeira J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29 (3): 365–373.
- Mau** J.-L., Lin H.-C. and Chen C.-C. (2002). Antioxidant properties of medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 6072–6077.
- Mehboob** N., Asad M.J., Imran M., Gulfranz M., Wattoo F.H., Hadri S.H. and Asghar M. (2011). Production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* using solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* 10 (48): 9880-9887
- Mudge** K. and Matthews A., Waterman B. (2013): Best Management practices for log-based shiitake cultivation in the northeastern United States. N.Y. Cornell University: 1-57.
- Narkprasom** N., Guo J.-H., Huang T.-C. and Guo Y.-K. (2012). The Kinetic for biomass and extracellular polysaccharide of *Ganoderma tsugae*, *APCBEE Procedia* 2: 7–11.
- Nes** W. D., Zhou W.(2001).Terpenoids: Higher, *Encyclopedia Of Life Sciences*.
- Niemelä** T. and Miettinen O. (2008). The identity of *Ganoderma applanatum* (*Basidiomycota*) *Taxon* 57 (3): 963–966.
- Ntougias** S., Baldrian P., Ehaliotis C., Nerud F., Antoniou T., Merhautová V. and Zervakis G. I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88 (5): 620-626.
- Padda** MS and Picha D H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Journal of Food Science* 72 (7): 412-6.
- Pandey** A. (2003). Solid-state fermentation *Biochemical Engineering Journal* 13 (2-3): 81–84.
- Pang** G., Xie J. and Chen Q., Hu Z., (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness* 1 (1): 26–60.
- Papanikolaou** S. and Aggelis G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (8):1031–1051.

- Papaspyridi L.-M.**, Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E. and Christakopoulos P. (2011). Growth and biomass production with enhanced  $\beta$ -glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences* 11 (1): 65–74.
- Pedneault K.**, Angers P., Gosselin A. and Tweddell R.J. (2008). Fatty acid profiles of polar and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern. Canada mycological research 112 (12): 1428-1434.
- Peksen A.** and Yakupoglu G. (2009). Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (4):611–618.
- Petre M.**, Teodorescu A., Ţuluca E., Bejan C., and Ronescu A. (2010). Biotechnology of Mushroom Pellets Producing by Controlled Submerged Fermentation. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (2): 50-55.
- Pointing S. B.** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (1): 20–33.
- Roupas P.**, Keogh J., Noakes M. and Margetts C. and Taylor P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods* 4 (4): 687-709.
- Russell R.** and Paterson M. (2006). *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67(18): 1985–2001.
- Saltarelli R.**, Ceccaroli P., Iotti M., Zambonelli A., Buffalini M., Casadei L., Vallorani L. and Stocchi V. (2009). Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food Chemistry* 116 (1): 143–151.
- Sanodiya B. S.**, Thakur G. S., Baghel R. K., Prasad G.B.K.S. and Bisen P.S. (2009). *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10 (8): 717-742.
- Shah Z. A.**, Ashraf M. and Ishtiaq M. (2004). Comparative study on cultivation and yield performance of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates (wheat straw, leaves, sawdust). *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3): 158-160.
- Shi M.**, Zhang Z. and Yang Y. (2013). Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers* 95 (1): 200–206.
- Shiau I.-L.**, Shih T.-L., Wang Y.-N., Chen H.-T., Lan H.-F., Lin H. C., Yang B.-Y., Ko C.-H. and Murase Y. (2009). Quantification for saponin from a soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn) in cleaning products by a chromatographic and two colorimetric assays. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 54 (1): 215–221.
- Singh S.**, Harsh N.S.K. and Gupta P.K. (2014). A novel method of economical cultivation of medicinally important mushroom, *Ganoderma lucidum* *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5 (5): 2033-2037.
- Simonić J.**, Stajić M, Glamočlija J Vukojević J Duletić-Laušević S and Brčeski I. (2008). Optimization of submerged cultivation conditions for extra- and intracellular polysaccharide production by medicinal ling zhi or reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10 (4): 351–360.
- Simonic J.Lj.**, Vukojevic J.B., Stajic M.M. and Glamoclija, J.M. (2009). Effect of cultivation conditions on ligninolytic enzyme production by *Ganoderma carnosum*. *Proc Nat Sci Matica Srpska Novi Sad* 116: 289-295.
- Schwarze F.W.M.R.** and Ferner D. (2003). *Ganoderma* on Trees - Differentiation of species and studies of invasiveness. *Professur für Forstbotanik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg* 27 (1): 1-21
- Skalicka-Woźniak K.**, Szypowski J., Łoś R., Siwulski M., Sobieralski K., Głowniak K. and Malm A. (2012). Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 81 (1): 17-21.
- D'Souza T. M.**, Merritt C.S. and Reddy C.A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental microbiology* 65 (12): 5307–5313.
- Stajić, M.**, Glamočlija, J., Maksimović, V., Vukojević, J., Simonić, J., and Zervakis, G. (2011). A comparative study of the potential of polysaccharide production and intracellular sugar composition within Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13 (2): 153–158.
- Smiderle, F.R.**, Carbonero, E.R., Mellinger, C.G., Sasaki, G.L. and Iacomini, G.M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a  $\beta$ -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry* 67 (19): 2189-2196.
- Szczepkowski A.**, Nicewicz D. and Koczon P. (2007). The relationship between tree health and chemical composition of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) wood of polish provenances, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria* 6 (3): 77-88.
- Tan W.-C.**, Kuppasamy U.R., Phan C.-W., Tan Y.-S., Raman J., Anuar A. M. and Sabaratnam V. (2015). *Ganoderma neo-aponicum* Imazeki revisited: Domestication study and antioxidant properties of its basidiocarps and mycelia. *Scientific Reports* 27 (5): 12515.



- Tang**, Y.-J., and Zhong, J.-J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (1-2): 20–28.
- Tang** Y.-J. and Zhong J.-J. (2003). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (3-4): 478–484.
- Tang**, Y.-J., Zhang, W., Liu, R.-S., Zhu, L.-W., and Zhong, J.-J. (2011). Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. *Process Biochemistry* 46 (1): 404–408.
- Tang** Y., Li Y.-Y., Li H.-M., Wan D.-J. and Tang Y.-J. (2011). Comparison of lipid content and fatty acid composition between tuber fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (9): 4736–4742.
- Tholl** D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 148: 63–106.
- Trigos** Á. and Medellín J.S. (2011). Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. *Revista Mexicana De Micología* 34: 63–83
- Tseng** Y.-H., Lee Y.-L., Li R.-C. and Mau J.-L. (2005). Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 90 (3): 409–415.
- Tsiapali** E., Whaley S., Kalbfleisch J., Ensley H.E., Browder I.W., and Williams D.L. (2001). Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology and Medicine* 30(4): 393–402.
- Tsioulpas** A., Dimou D., Iconomou D. and Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity *Bioresource Technology* 84 (3): 251-257.
- Ueitele** I.S.C., Kadhila-Muanding, N.P. and Matundu N. (2014). Evaluating the production of *Ganoderma* mushroom on corn cobs. *African Journal of Biotechnology* 13 (22): 2215-2219.
- Valverde** M. E., Hernández-Pérez T., and Paredes-López O. (2015). Edible Mushrooms: improving human health and promoting quality life. Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Microbiology*: 1-14.
- Wagner** R., Mitchell D.A., Sasaki G.L., Amazonas M.A.L. and Berovi M. (2003). Current techniques for the cultivation of *ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides: submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Food Technology and Biotechnology* 41(4): 371-382.
- Wanachiwanawin** D., Piankijagum A., Chairprasert A., Lertlaituan P., Tungtrongchitr A. and Chinabutr P. (2006). *Ganoderma lucidum*: a cause of pseudoparasitosis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine And Publichealth*. 37 (6): 1099-102.
- Wang** Y., Xu B. (2014 ). Distribution of antioxidant activities and total phenolic contents in acetone, ethanol, water and hot water extracts from 20 edible mushrooms via sequential extraction. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* 2 (1): 1-5.
- Wasser** S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3): 258–274.
- Wasser** S.P. (2005). Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). Institute of Evolution, University of Haifa, Mount Carmel, Haifa, Israel: 603-622
- Wawrzyn** G.T., Bloch S.E. and Schmidt-Dannert C. (2012). Discovery and characterization of terpenoid biosynthetic pathways of fungi. *Methods in Enzymology* 5 (515): 83-105
- Wesenberg** D., Kyriakides I., and Agathos S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22 (1-2): 161–187.
- Wakchaure** G.C. (2011 ). Production and Marketing of mushrooms: global and national scenario. *Mushrooms-cultivation, marketing and consumption, India*:15-22.
- Yang**, F.-C. and Liao C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry* 33(5): 547–553.
- Yang** F.-C. and Liao C.B. (1998). Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Engineering* 19 (3): 233- 236.
- Yang** F.-C., Ke Y.-F. and Kuo S.-S. (2000). Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 27 (3-5): 295–301.
- Yang** F.-C., Hsieh C. and Chen H.-M. (2003). Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 39 (1): 21- 26.
- Yang** Q., Wang S.W., Xie Y.H., Sun J.Y. and Wang J.B. (2010). HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2): 167–172.
- Yadav** N., Yadav R., Goyal A. (2014). Chemistry of terpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 27 (2), 45: 272-278.

- Zervakis G. I** and Polemis H.(2013). Identification and sustainable exploitation of wild edible mushrooms in rural areas”. Διαφάνειες πιλοτικού μαθήματος, Ενότητα 1 (βασισμένο στα περιεχόμενα του Chapter 1 - Mycoticon’s Textbook, εισαγωγή σταμανιτάρια.
- Zhong J.-J.** and Tang Y.-J. (2004). Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Biomanufacturing* 87: 25-59.
- Zhou L.-W.,** Cao Y., Wu S.-H., Vlasak J., Li D.-W., Li M.-J. and Dai Y.-C. (2015). Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. *Phytochemistry* 114, 7–15.

### Βιβλία

- Bathaie S.Z.** and Tamanoi F. (2014).The enzymes, natural products and cancer signaling: isoprenoids, polyphenols and flavonoids, Academic Press.
- Berg J. M.,** Tymoczko J.L., Stryer L. (2007). Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος I, Κεφ.12.
- Chang S-T** and Miles P.G. (2004). Mushrooms, cultivation, nutritional value, medicinal effect and environment impact, CRC Press, 2<sup>nd</sup> edition.
- Christias C.** (1999). Μυκητολογία, Εκδόσεις Αγρότυπος, Κεφ. 5.
- Diamantopoulou P.** (2012). Κινητικές μελέτες βιοσύνθεσης πολυσακχαριών και λιπιδίων κατά την καλλιέργεια μακρομυκήτων. PhD, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Hsu Ching-yu.** (2013).Evaluation of antioxidant properties of some commercially available culinary and medicinal mushrooms from Taiwan. School of Agriculture, Food and Rural Development Faculty of Science, Agriculture and Engineering, Newcastle University Newcastle upon Tyne, NE1 7RU United Kingdom.
- Kück U.,** Frankenberg-Dinkel N. (2015). Biotechnology, Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Madanis G.** (2003). Διδακτικές σημειώσεις, Δομή & Ιδιότητες Ξύλου Μέρος II. Ιδιότητες.
- Madigan M. T.,** Martinko J.M., Parker J. (2007). Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Τόμος 1, σελ 5.
- Ratledge C.A.** and Kristiansen B.A.(2001 ). Basic Biotechnology.
- Ren L.** (2014). Anticancer Ability of mushroom polysaccharides. School of Chemical Sciences. The University of Auckland Symonds Street. New Zealand.
- Stefanakis K.Z.** (1995). Ταμανιτάρια. Εκδόσεις Α. Σταμούλη.
- Stametes P.,** Chilton J. S. (1983).The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushroom at home. Agarikon Press, Olympia, Washington.

### Διαδικτυακοί ιστότοποι

<http://www.first-nature.com/fungi/ganoderma-resinaceum.php>