

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:**

«Μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος καλλιέργειας του εδώδιμου μύκητα *Agrocybe aegerita* στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των καρποσωμάτων του»



**ΜΑΡΙΑ Χ. ΡΟΝΤΟΥ**  
**ΑΘΗΝΑ 2017**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:**

«Μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος καλλιέργειας του εδώδιμου μύκητα *Agrocybe aegerita* στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των καρποσωμάτων του»



**ΜΑΡΙΑ Χ. ΡΟΝΤΟΥ**  
**ΑΘΗΝΑ 2017**  
**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:**

«Μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος καλλιέργειας του εδώδιμου μύκητα *Agrocybe aegerita* στην αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των καρποσωμάτων του»

**ΜΑΡΙΑ Χ. ΡΟΝΤΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ**

**ΧΡΥΣΑΥΓΗ ΓΑΡΔΕΛΗ**

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΔΡΟΣΙΝΟΣ**

**ΣΑΝΤΗ ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΥ**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος και του στελέχους στο χρόνο ολοκλήρωσης αποικισμού, στην ταχύτητα της μυκηλιακής αύξησης (βλαστική φάση του μύκητα), στο χρόνο ολοκλήρωσης της επώασης, στην πρωιμότητα παραγωγής καρποσωμάτων, στο συνολικό βάρος των καρποσωμάτων και στη βιολογική αποδοτικότητα (BA %), (παραγωγική φάση του μύκητα).

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα άχυρο και φασόλι και τα στελέχη *Agroclybe aegerita* AMRL 101, 103 και 104 για τις αντίστοιχες μετρήσεις. Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος, του στελέχους και του κύματος καρποφορίας στα ολικά φαινολικά που μετρήθηκαν με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και στις αντιοξειδωτικές ικανότητες που μετρήθηκαν με τις μεθόδους DPPH και FRAP αντίστοιχα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη βιβλιογραφία.

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη βλαστική φάση του μύκητα έδειξαν παρόμοιες τιμές για τα διαφορετικά υποστρώματα και στελέχη. Οι παρούσες τιμές της γραμμικής αύξησης ήταν παραπλήσιες με την ταχύτητα αύξησης που καταγράφηκε για τον *Agroclybe aegerita* σε παλαιότερα πειράματα στο υπόστρωμα του αχύρου (Philippousis et al., 2001).

Όσον αφορά την παραγωγική φάση του μύκητα, γρηγορότερη επώαση είχαν τα στελέχη 103 και 104 τόσο στο άχυρο όσο και στο φασόλι, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ του αχύρου και του φασολιού. Σε ό, τι αφορά την πρωιμότητα, στο φασόλι εμφανίστηκαν οι πρώτες καρποφορίες λίγο νωρίτερα απ'ότι στο άχυρο, με τα στελέχη 103 και 104 να δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα και το στέλεχος 103 να είναι λίγο γρηγορότερο από το 104. Στο άχυρο, υπήρχε αδυναμία καρποφορίας του στελέχους 101 και μικρότερος αριθμός καρποσωμάτων του στελέχους 103, όπως επίσης και μικρότερο μέσο βάρος των 103 και 104. Η BA% στο φασόλι ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτήν στο άχυρο για τα στελέχη 103 και 104.

Οι τιμές των ολικών φαινολικών (Folin), φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα ανάπτυξης, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα A στο κύμα B, και από το στέλεχος, αφενός σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι, με αύξηση από το στέλεχος 103 στο 104, αφετέρου σε μανιτάρια του κύματος A, με αύξηση από το στέλεχος 103 στο 104.

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας DPPH, φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα A στο κύμα B, και από το στέλεχος σε μανιτάρια του κύματος A, με μείωση από το στέλεχος 103 στο 104.

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας FRAP, φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα A στο κύμα B, και από το στέλεχος σε μανιτάρια του κύματος A, με μείωση από το στέλεχος 103 στο 104.

Δε βρέθηκε στη βιβλιογραφία μελέτη της επίδρασης του κύματος, του υποστρώματος και του στελέχους στα ολικά φαινολικά και στην αντιοξειδωτική ικανότητα μανιταριών. Στην παρούσα μελέτη, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο υπολογίστηκε χαμηλό σε σχέση με αυτό που μέτρησαν οι S.-J Huang et al., (2016) και οι K. M. Lo ,P.C.K. Cheung (2005).

## ABSTRACT

In this survey we examined the effect of the substrate and the strain in relation to five parameters; firstly, in relation to the completion time of the expansion, secondly in relation to the speed of the micellar growth (the germinal phase of the fungus), thirdly in relation to the completion time of the incubation, fourthly in relation to the precocious growth and the weight of the fruiting body, and lastly, in relation to the biological efficiency (BA %), (generative phase of the fungus).

For that reason, straw and bean substrates and *Agrocybe aegerita* AMRL 101,103 and 104 strains were subjected to the above measurements. Besides, the effect of the substrate, the strain and the wave were examined in relation to the overall phenolics and the antioxidant capacities. The overall phenolics were measured under the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacities were measured under the DPPH and FRAP methods respectively. Besides, the results were compared to the relevant bibliography.

The results concerning the germinal phase of the fungus displayed similar measurements for the different substrates and strains. Furthermore, the present measurements of the linear growth were similar to the speed of the *Agrocybe aegerita* growth which was exhibited in previous laboratory tests. The direct concern of these laboratory tests were the straw substrate ( Philippousis et al.,2001). As regards the growing phase of the fungus, our survey displayed that the strains 103 and 104 in both the straw and the bean had a faster incubation without significant dissimilarities between them.

As regards the precocity parameter, we had different results between the straw and the bean. Specifically, the bean had an earlier fruit-bearing in relation to the strain. To explain in more details, the strains 103 and 104 of the bean showed great capability. However, the strain 103 had a more drastic impact than the strain 104. In contrast, the strain 101 of the straw was incapable of fruit-bearing, while the strain 103 had fewer fruiting bodies and also both the strains 103 and 104 had a lower weight. The BA % of the bean was significantly higher than the BA% of the straw regarding the strains 103 and 104.

In addition, the measurements of the overall phenolics were obviously affected by the growth substrate. Specifically, the bean showed higher measurements than the straw, the wave of the fungi of the strain 104 which had an increase from the wave A to wave B, and the strain. In relation to the strain, there was a difference, on the one part, in fungi which were grown in a bean with an increase from strain 103 to strain 104 and on the other part, in fungi of the wave A with an increase from strain 103 to strain 104.

The measurements of the antioxidant efficiency DPPH were affected by the substrate. More specifically, the bean had higher measurements than the straw, the wave of the fungi of the strain 104, which showed an increase from the wave A to wave B, and the strain of fungi in wave A, which in turn had a decrease from the strain 103 to strain 104.

As regards the measurements of the antioxidant efficiency FRAP, the survey displayed that they were similarly affected by the substrate. The bean had higher measurements than the straw, the wave of fungi of the strain 104, which showed an increase from wave A to wave B, and the strain of fungi of wave A, which had a decrease from the strain 103 to the strain 104.

It is worth mentioning that in the bibliography we used there is no relevant survey in relation to the effect of the wave, the substrate and the strain on the overall phenolics and the antioxidant efficiency of the fungi.

In this survey, the overall phenolic content was lower than the overall phenolic content measured by S.-J Huang et al., ( 2016) and K. M. Lo, P. C. K. Cheung ( 2005).

## **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**KEYWORDS:** *Agrocybe aegerita*, Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP, Fruiting bodies, mycellar growth

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:** καρποσώματα, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αντιοξειδωτική ικανότητα, μυκηλιακή αύξηση, παραγωγικότητα

## Περιεχόμενα

<b>1</b>	<b>Ο μακρομύκητας (μανιτάρι) <i>Agrocybe aegerita</i></b>	<b>1</b>
1.1	Γενική παρουσίαση	1
1.2	Μορφολογία	1
1.3	Βιολογικός κύκλος του <i>Agrocybe aegerita</i>	2
1.4	Συνθήκες ανάπτυξης	3
1.5	Καλλιέργεια	4
1.6	Διατροφικές ιδιότητες των εδώδιμων μανιταριών και του <i>A. aegerita</i>	5
1.7	Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών <i>Agrocybe</i> και η εφαρμογή τους στην ιατρική	6
<b>2</b>	<b>Φαινολικές ενώσεις</b>	<b>7</b>
2.1	Εισαγωγή	7
2.1.1	Απλές φαινόλες	9
2.1.2	Φαινολικά οξέα	10
2.1.3	Κουμαρίνες	12
2.1.4	Φαινολικές ενώσεις με δύο αρωματικούς δακτυλίους	13
2.1.5	Φαινολικές ενώσεις με τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους	15
2.2	Οι φαινολικές ενώσεις στα μανιτάρια	16
2.3	Απομόνωση φαινολικών συστατικών	19
2.3.1	Εκχύλιση με διαβροχή με διαλύτη (maceration)	20
2.3.2	Εκχύλιση με υπερήχους (sonication)	20
2.3.3	Διαλύτες Εκχύλισης και Υδρόλυση	20
2.3.4	Απομόνωση φαινολικών συστατικών από μανιτάρια	20
2.4	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών	21
<b>3</b>	<b>Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών</b>	<b>22</b>
3.1	Σχέσεις δομής-αντιοξειδωτικής δράσης	22
3.2	Μέθοδος δέσμευσης ελευθέρων ριζών με χρήση της ρίζας DPPH	24
3.3	Δοκιμασία αναγωγής σιδήρου - FRAP assay (Ferric Anion Reducing Antioxidant Power)	26
<b>4</b>	<b>Σκοπός και Αντικείμενο της μελέτης</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Πειραματικό Μέρος</b>	<b>28</b>
5.1	Γενική παρουσίαση	28
5.2	Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων	28
5.3	Παρασκευή υποστρωμάτων	29
5.4	Προσδιορισμός της ταχύτητας του μυκηλίου και παραγωγή καρποσωμάτων	29
5.5	Προσδιορισμός pH	30
5.6	Λυοφυλίωση και λειοτριβήση καρποσωμάτων	30

5.7	Απομόνωση φαινολικών συστατικών .....	30
5.8	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών .....	30
5.8.1	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος .....	30
5.8.2	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού κλάσματος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	31
5.9	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH .....	31
5.10	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP .....	32
<b>6</b>	<b>Αποτελέσματα</b> .....	<b>33</b>
6.1	Αξιολόγηση ταχύτητας αύξησης ειδών <i>Agrocybe</i> spp σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα κατά τη ζύμωση γεωργικών υπολειμμάτων σε σωλίνες .....	33
6.2	Αξιολόγηση παραγωγής καρποσωμάτων των ειδών <i>Agrocybe</i> spp.....	34
6.3	Αξιολόγηση ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικής δράσης των μανιταριών <i>Agrocybe aegerita</i> .....	35
6.3.1	Folin - <i>AgrocybeAegerita</i> 104.....	36
6.3.2	DPPH - <i>Agrocybeaegerita</i> 104 .....	37
6.3.3	FRAP - <i>Agrocybeaegerita</i> 104.....	38
6.3.4	Folin- Φασόλι.....	39
6.3.5	DPPH - Φασόλι.....	40
6.3.6	FRAP - Φασόλι .....	41
6.3.7	Folin - Κύμα Α.....	42
6.3.8	DPPH - Κύμα Α .....	43
6.3.9	FRAP - Κύμα Α .....	44
6.3.10	Στέλεχος 103 - Φασόλι .....	46
6.3.11	Στέλεχος 104 - Φασόλι .....	46
6.3.12	Στέλεχος 103 – Κύμα Α .....	47
6.3.13	Στέλεχος 104 - Άχυρο .....	48
6.3.14	Φασόλι – Κύμα Α .....	48
6.3.15	Συσχέτιση μεθόδων.....	50
<b>7</b>	<b>Συζήτηση αποτελεσμάτων</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>54</b>

# 1 Ο μακρομύκητας (μανιτάρι) *Agrocybe aegerita*

## 1.1 Γενική παρουσίαση

### Γενικά στοιχεία - Ταξινόμηση

**ΒΑΣΙΛΕΙΟ:** *Μύκητες*

**ΦΥΛΟ:** *Basidiomycota*

**ΚΛΑΣΗ:** *Agaricomycetes*

**ΤΑΞΗ:** *Agaricales*

**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** *Strophariaceae*

**ΓΕΝΟΣ:** *Agrocybe*

**ΕΙΔΟΣ:** *A.aegerita*

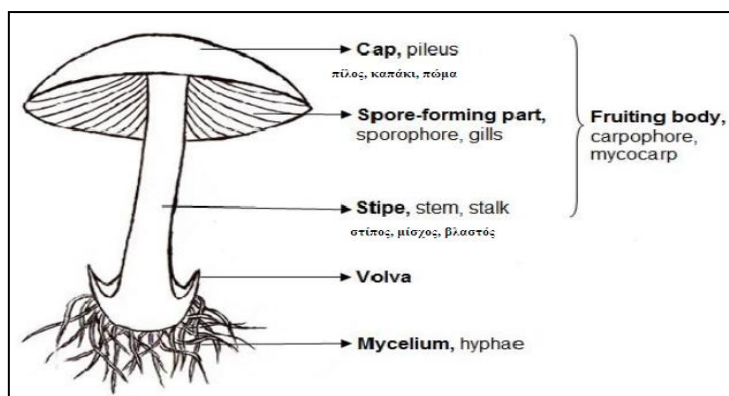
Ο μακρομύκητας *A. aegerita* (V. Brig.) Singer – συνώνυμος με τον *A. cylindracea* (DC.) Maire ανήκει στην τάξη Agaricales, οικογένεια Strophariaceae. Το όνομα του προέρχεται από την ελληνική λέξη «αιγείτης» που φανερώνει ότι το μανιτάρι αυτό ευδοκίμει και αναπτύσσεται πάνω σε μαύρη λεύκα (black poplar mushroom) (Delmas, 1989). Άρχισε να συλλέγεται από τους αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους πριν την τρούφα και φύτεται σε Νότια Αμερική, Ευρώπη και Ασία. Σήμερα καλλιεργείται και καταναλώνεται κυρίως σε Κορέα, Ιαπωνία, Κίνα, Ταϊβάν και Αυστραλία, αλλά και στην Ιταλία (εμπορική ονομασία Pioppino).

Με βάση τα οικο-φυσιολογικά του χαρακτηριστικά που αφορούν στην ικανότητα αποδόμησης της λιγνοκυτταρίνης, καθώς και στα περιορισμένα λιγνολυτικά του ένζυμα (διαθέτει μόνο Lac, ενώ κάποια στελέχη έδειξαν και παραγωγή MnP αλλά με πολύ χαμηλή ενεργότητα) κατηγοριοποιείται μεταξύ μυκήτων λευκής σήψης και αποδόμησης οργανικής ύλης με μεγαλύτερη προσέγγιση προς στη δεύτερη κατηγορία (Steffen, 2003).

## 1.2 Μορφολογία

Το μανιτάρι *A. aegerita* έχει ημισφαιρικό πύλο (γενικά κυρτό, αμβλύ, με διάμετρο 5 – 14 cm), ο οποίος στο νεαρό στάδιο έχει χρώμα ώχρας προς τις άκρες και καφέ ή απαλό κοκκινωπό προς το κέντρο. Μερικές φορές το κεντρικό μέρος αποκτά καστανόμαυρο χρωματισμό. Με την πάροδο του χρόνου σχηματίζονται χρώματα σε απαλότερους τόνους μέχρι και άσπρο. Αρχικά η επιφάνεια είναι λεία και μεταξένια αλλά αργότερα ψιλοραγίζει και ρυτιδώνεται. Ο στύπος είναι συμπαγής και ψιλόλιγνος, αρχικά με λευκό χρωματισμό, αργότερα ωχρό και με το χρόνο γίνεται καστανός. Κατά την ωρίμανση του εμφανίζει στο ανώτερο μέρος του έναν δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί το υπόλοιπο του καλύμματος που καλύπτει τα ελάσματα. Τα ελάσματα είναι λεπτά, πεπλατυσμένα, σφιγμένα, τεντωμένα, συμφυόμενα με χρωματισμό παρόμοιο με εκείνον των σπορίων (από λευκό γίνεται γκριζωπό, ωχρό και καταλήγει στο καφέ ανοιχτό). Τέλος, η σάρκα του πύλου είναι τρυφερή, αναδύει ένα ευχάριστο άρωμα και μία γεύση φουντουκιού (Stamets, 2000). Η γενικευμένη απεικόνιση του σώματος των μανιταριών δίνεται παρακάτω (Εικόνα 1.1):





**Εικόνα 1.1:** Γενικευμένη απεικόνιση σώματος μανιταριού (Ren, 2014)

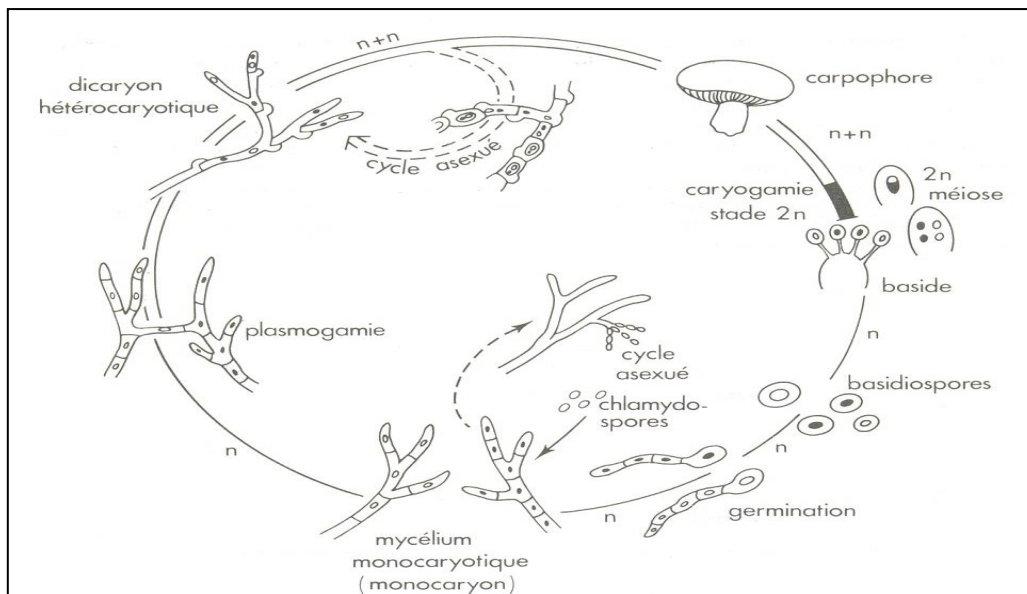
### 1.3 Βιολογικός κύκλος του *Agrocybe aegerita*

Ο βιολογικός κύκλος του μακρομύκητα *A. aegerita* ακολουθεί αυτόν των Βασιδιομυκήτων. Παρακάτω περιγράφεται και απεικονίζεται (Εικόνα 1.2) ο βιολογικός κύκλος ενός τυπικού βασιδιομύκητα της τάξης των Agaricales (Delmas, 1989).

Ως σημείο εκκίνησης του βιολογικού κύκλου θεωρείται το βασιδιοσπόριο το οποίο είναι μονοκύτταρο και απλοειδές (η χρωμοσώματα). Το βασιδιοσπόριο βλασταίνοντας στη φύση δίνει γένεση σε ένα μυκήλιο απλοειδές (σε κάθε “κύτταρο” των υφών υπάρχει ένας απλοειδής πυρήνας και για αυτό ονομάζεται και μονοκάρυο μυκήλιο). Το μυκήλιο αυτό είναι άγονο (δεν σχηματίζει μανιτάρια), έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής στη φύση και σύντομα εκφυλίζεται και πεθαίνει. Αν όμως έλθει σε επαφή με ένα άλλο μονοκάρυο μυκήλιο αντίθετου φύλου του ίδιου μύκητα (τα μονοκάρυα διαφορετικού φύλου δεν διαφοροποιούνται μορφολογικά) τότε αναστομώνονται οι υφές στα σημεία επαφής και πραγματοποιείται πλασμογαμία (ένωση πρωτοπλάσμάτων). Οι απλοειδείς πυρήνες αντίθετου φύλου πλησιάζουν μεταξύ τους αλλά δεν συγχωνεύονται σε ένα διπλοειδή-ζυγωτό πυρήνα. Από το σημείο αυτό και μετά αναπτύσσονται υφές οι οποίες σε κάθε “κυτταρικό” διαμέρισμα έχουν ένα ζεύγος πυρήνων αντίθετου φύλου και για αυτό το μυκήλιο ονομάζεται δικάρυο. Δικαρυώση ενός μονοκαρύου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ειδικά μικρά σπόρια από μονοκάρυο αντίθετου φύλου τα οποία ονομάζονται σπερμάτια. Το δικάρυο μυκήλιο είναι αυτό που σχηματίζει μανιτάρια και θεωρητικά είναι αθάνατο αφού μπορεί να επεκτείνεται συνεχώς. Καθώς αυξάνεται μία δικάρυα υφή το ζεύγος των πυρήνων του ακραίου κυττάρου διαιρείται ταυτόχρονα μιτωτικά δίνοντας ένα νέο ζεύγος το οποίο προχωρεί προς το αυξανόμενο άκρο ενώ βαθμιαία δημιουργείται ένα νέο εγκάρσιο διάφραγμα πίσω τους. Σε πολλούς βασιδιομύκητες, οι δικάρυες υφές, στα σημεία των εγκαρσίων διαφραγμάτων φέρουν χαρακτηριστικά εξαρτήματα που γεφυρώνουν τα γειτονικά “κύτταρα” και για αυτό ονομάζονται κρίκοι. Οι κρίκοι σχηματίζονται ταυτόχρονα με το εγκάρσιο διάφραγμα και σχετίζονται με τη συζυγή διαίρεση του ζεύγους των πυρήνων.

Στην κατάλληλη για κάθε είδος βασιδιομύκητα εποχή, το δικάρυο μυκήλιο αρχίζει σε κάποια σημεία του να σχηματίζει από ψευδοϊστό τις καταβολές (αρχέγονα) των βασιδιοκαρπίων που έχουν μέγεθος κεφαλής καρφίτσας. Οι καταβολές αυτές μεγαλώνουν σε μέγεθος και ταυτόχρονα διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τα διάφορα τμήματα του βασιδιοκαρπίου. Ένα πλήρως αναπτυγμένο τυπικό καρπόσωμα των μυκήτων της τάξης των Agaricales αποτελείται από τον πύλο (καπέλο) και το στύπο (πόδι). Στο κάτω μέρος του πύλου, τοποθετημένα κατακόρυφα και

ακτινοειδώς γύρω από το στύπο, υπάρχουν τα βασίδια είναι κύτταρα ροπαλοειδή ή κυλινδρικά. Ολόκληρο το βασιδιοκάρπιο (μανιτάρι) είναι κατασκευασμένο από δικάρυες υφές (ψευδοϊστό).



**Εικόνα 1.2:** Ο βιολογικός κύκλος των Βασιδιομυκήτων (Delmas, 1989).

Μέσα στο βασίδιο οι δύο πυρήνες αντίθετου φύλου ενώνονται σε ένα διπλοειδή (ζυγωτό) πυρήνα. Ακολουθεί αμέσως μείωση του πυρήνα (ύστερα από διπλασιασμό των χρωματίδων του πυρήνα) που καταλήγει στη δημιουργία 4 νέων απλοειδών πυρήνων ( $n$  χρωμοσώματα ο καθένας), ανά δύο αντίθετου φύλου. Ταυτόχρονα στην κορυφή του βασιδίου σχηματίζονται 4 προεξοχές, τα στηρίγματα. Κάθε ένας από τους πυρήνες μετακινείται στην άκρη ενός στηρίγματος το οποίο (άκρο) με χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος και με την εισροή πρωτοπλάσματος βαθμιαία διογκώνεται. Τελικά με το σχηματισμό ενός εγκάρσιου διαφράγματος αποκόπτεται στην άκρη κάθε στηρίγματος ένα απλοειδές κύτταρο που είναι το βασισπόριο. Κάθε βασίδιο σχηματίζει 4 βασιδιοσπόρια απλοειδή και ανά δύο αντίθετου φύλου. Όταν ωριμάσουν τα βασιδιοσπόρια εκτινάσσονται από τα στηρίγματά τους, διασπείρονται, και όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα βλασταίνουν δίνοντας μονοκάρυα απλοειδή μυκήλια. Τέλος, σε πολλά είδη μανιταριών μεταξύ των βασιδίων υπάρχουν χαρακτηριστικά άγονα στοιχεία τα οποία ονομάζονται κυστίδια και των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι πολύ χρήσιμα στην ταξινόμηση.

#### 1.4 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του μυκηλίου βρίσκονται στους  $20 - 22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο κίνδυνος ανάπτυξης ανταγωνιστικών μικροοργανισμών αυξάνεται. Η καρποφορία αναπτύσσεται φυσιολογικά μέχρι ενός ποσοστού  $\text{CO}_2$  (περίπου  $0,25\%$ ). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις  $\text{CO}_2$  αυξάνουν την ποσότητα των παραγόμενων μανιταριών, αλλά η ποιότητα τους είναι κατώτερη (Stamets, 2000). Ιδανικό pH υποστρώματος για την ανάπτυξη του μύκητα είναι  $5,7 - 6,0$ , αν και σύμφωνα με τον Zadrazil (1994) ο σχηματισμός των καρποφοριών δεν επηρεάζεται από το pH (έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη καρποφορίας σε pH που κυμαίνεται από  $3,5$  έως  $7,0$ ).

## 1.5 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια μανιταριών αποτελεί σήμερα την πλέον βιομηχανοποιημένη μορφή γεωργικής εκμετάλλευσης στην οποία εφαρμόζεται η μικροβιακή τεχνολογία για την επικερδή βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων υπολειμμάτων και αποβλήτων της γεωργίας ή της δασοκομίας σε προϊόντα υψηλής διαιτητικής και προστιθέμενης αξίας. Τα γεωργικά υπολείμματα είναι πλούσια σε κυτταρίνη και λιγνίνη και η βιο-αποδόμησή τους από τα καλλιεργούμενα μανιτάρια βασίζεται στην ικανότητά τους να παράγουν τα αντίστοιχα ένζυμα (κυτταρινάσες, λακκάσες, υπεροξειδάση της λιγνίνης, υπεροξειδάση του μαγγανίου κ.α.). Οι μύκητες λευκής σήψης (βασιδιομύκητες), στους οποίους ανήκει και ο *A. aegerita*, είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να αποδομήσουν αμφότερες την κυτταρίνη και τη λιγνίνη, ενώ σε πολύ μεγάλο ποσοστό το συγκεκριμένο μανιτάρι αποδομεί την οργανική ύλη.

Η παραδοσιακή καλλιέργεια του μανιταριού *A. aegerita* γίνεται στο ύπαιθρο σε ξύλο φυλλωδών (λεύκας). Τον Μάρτιο κόβονται οι λεύκες, πριν το άνοιγμα των μπουμπουκιών τους. Τον Μάιο οι κορμοί τεμαχίζονται σε κομμάτια 20 – 25 cm. Στη συνέχεια ανοίγεται λάκκος, τα κομμάτια λεύκας εμβολιάζονται με την καθαρή καλλιέργεια και τοποθετούνται σε ομάδες 4 - 5 κομματιών το ένα πάνω στο άλλο. Η καθαρή καλλιέργεια εμβολιάζεται μεταξύ 2 τεμαχίων κάθε φορά. Έπειτα αυτά σκεπάζονται με ένα λεπτό στρώμα από ξύλο και όλα μαζί καλύπτονται με ένα πλαστικό φιλμ και μετά με χώμα. Ο συγκεκριμένος λάκκος ονομάζεται λάκκος «επάσης». Αυτή η φάση διαρκεί 3 μήνες (ή και περισσότερο). Το Σεπτέμβριο οι κορμοί τοποθετούνται κάθετα μέσα στο έδαφος. Ένα ελαφρύ στρώμα εδάφους τους καλύπτει και ποτίζονται με πολύ νερό. Είναι καλύτερο η καλλιέργεια να γίνει υπό σκιά και να είναι προστατευμένη από τον άνεμο, κάτω από φυλλώδη δέντρα, σε έδαφος σχετικά υγρό και πλούσιο σε οργανική ουσία. Οι καρποφορίες σχηματίζονται πάνω στον κορμό, στην επιφάνεια του εδάφους, όταν η θερμοκρασία είναι περίπου 20 °C σε υγρή περίοδο. Η συγκομιδή γίνεται από το φθινόπωρο ως την άνοιξη (Stamets, 2000).

Η εντατική καλλιέργεια του μανιταριού *A. aegerita* αποτελεί σήμερα αντικείμενο μελέτης, καθώς ο μύκητας παρουσιάζει αργή ανάπτυξη και ευαισθησία στους ανταγωνιστές, γεγονός που προϋποθέτει αποστείρωση των υποστρωμάτων. Η καλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ελεγχόμενες συνθήκες μαζικά σε κιβώτια ή πλαστικές σακούλες και κυρίως σε αποστειρωμένα κατεργασμένα υποστρώματα. Συνήθως καλλιεργείται σε αζύμωτο ή ελάχιστα ζυμωμένο υπόστρωμα από εμπλουτισμένα πριονίδια και ροκανίδια ιτιάς, λεύκας, σφενδάμου κ.α. που τεμαχίζονται, διαβρέχονται, αποστειρώνονται (στους 121 °C, για 2 ώρες) και εμβολιάζονται με τον μύκητα. Ωστόσο, ο μύκητας έδειξε καλή ανάπτυξη και στα εμπλουτισμένα με πίτυρο υποστρώματα από άχυρο σίτου, υπολείμματα εκκοκκισμένου βαμβακιού, ρυζιού, καλαμποκιού, ηλίανθου κ.α. (Zadrzil, 1993, Philippoussis et al., 2001; Zervakis et al., 2001; Φιλιππούσης και Διαμαντοπούλου, 2001). Ακολουθεί επάση για τρεις εβδομάδες σε θερμοκρασία 23 – 27 °C, με υψηλή συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία 95 – 98%. Οι καρποφορίες (Εικόνα 1.3) εμφανίζονται μετά 1 - 2 εβδομάδες στις ακόλουθες συνθήκες: καλός αερισμός (4 - 8 αλλαγές αέρα/ ώρα, CO<sub>2</sub><2.000 ppm), φωτισμός 300 - 700 lux/ 12 ώρες, θερμοκρασία 10 – 16 °C και σχετική υγρασία 90 – 95%. Συλλέγονται δύο κύματα καρποφοριών με μεσοδιάστημα 10 - 14 ημέρες (Stamets, 2000). Συνήθως συλλέγονται 1-3 κύματα με μεσοδιάστημα 10 - 14 ημέρες με συνολική απόδοση που κυμαίνεται από 10-15% του βάρους του υποστρώματος, ενώ ο συνολικός κύκλος καλλιέργειας διαρκεί ~100-120 ημέρες.



**Εικόνα 1.3.:** Καρποφορία του μανιταριού *Agrocybe aegerita*

### 1.6 Διατροφικές ιδιότητες των εδώδιμων μανιταριών και του *A. aegerita*

Υπάρχουν πάρα πολλά είδη μανιταριών εδώδιμα, δηλητηριώδη ή και θανατηφόρα και πάρα πολλά χωρίς καμία γαστρονομική αξία. Τα πιο γνωστά είδη από τα εδώδιμα και τα δηλητηριώδη μανιτάρια είναι:

- **Εδώδιμα:** *Agaricus bisporus*, *A. bitorquis*, *A. arvensis*, *A. campestris*, *A. hortensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Flamulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Boletus edulis*, *Marasmius oreades*, *Cantharellus cibarius*, *Pholiota mutabilis*, *Agrocybe aegerita* και *Morchella rodunda*.
- **Δηλητηριώδη:** *Amanita phalloides*, *A. verna*, *A. virosa*, *A. muscaria*, *A. pantherina*, *Hypholoma fasciculata*, *Boletus satanas*, *B. feleus*, *B. calopus*, *Russula emetica*, *Clavaria formosa* και *Rhodophilus lividus*.

Τα μανιτάρια αποτελούν εδώ και αιώνες τρόφιμο, αλλά χρησιμοποιούνται και ως καρύκευμα σε σούπες και σάλτσες χάρη στη μοναδική και εκλεπτυσμένη γεύση τους. Το μανιτάρι *A. aegerita* θεωρείται ότι έχει καλύτερη υφή από το πλευρωτό μανιτάρι (*Pleurotus* spp.) και είναι πιο νόστιμο από το shiitake (*Lentinula edodes*). Η μεγάλη προτίμηση των σύγχρονων καταναλωτών για τα μανιτάρια οφείλεται όχι μόνο στη γεύση, στην εμφάνιση και στο άρωμα που προσδίδουν, αλλά κυρίως στη θρεπτική τους αξία. Τα εδώδιμα μανιτάρια διαθέτουν πρωτεΐνες υψηλής θρεπτικής αξίας, οι οποίες μπορούν να συγκριθούν με τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης, καθώς επίσης και πολλά από τα απαραίτητα αμινοξέα. Ακόμα, αποτελούν τροφή χαμηλής περιεκτικότητας λιπίδια (1,5-8,0%, κ.β.), χαμηλή σε κορεσμένα λίπη και με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να κατέχουν τη μεγαλύτερη αναλογία στο σύνολο των ολικών λιπαρών οξέων (72-85%κ.β.; Chang and Miles, 2004). Ιδιαίτερα πλούσια είναι τα μανιτάρια σε σίδηρο, φώσφορο, κάλιο, μαγνήσιο, χαλκό, ψευδάργυρο και σελήνιο, βιταμίνη B5 (Racz et al., 1996; Ouzouni et al., 2007). Το μανιτάρι *Agrocybe aegerita* περιέχει επίσης σε σημαντικές ποσότητες παλμιτικό και λινελαϊκό οξύ, εργοστερόλη, μαννιτόλη και τρεχαλόζη (Zang et al., 2003), ασβέστιο, φολικό οξύ, βιοτίνη, νιασίνη (B3), σελίνιο, κάλιο, ριβοφλαβίνη (B2). Το ποσοστό υγρασίας των φρέσκων μανιταριών κυμαίνεται στο 70–95% αναλόγως την περίοδο συγκομιδής και τις συνθήκες ανάπτυξης, ενώ στα αποξηραμένα μανιτάρια βρίσκεται στο 10-13%. Η περιεχόμενη τέφρα αντίστοιχα που αντιπροσωπεύει το 60% της σύστασης του ξηρού δείγματος αποτελείται από οξειδία του καλίου και του φωσφόρου (Mattila et al., 2002). Τέλος, σε ό,τι αφορά τους υδατάνθρακες (3-28%, κ.β.) τα μανιτάρια περιέχουν κυρίως χιτίνη και β-

γλυκάνες. Οι παραπάνω ιδιότητες είναι κάποιοι από τους βασικούς λόγους για τους οποίους τα μανιτάρια έχουν χαρακτηριστεί από την παράδοση ως «υγιεινά» τρόφιμα.

### 1.7 Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών *Agrocybe* και η εφαρμογή τους στην ιατρική

Τουλάχιστον σε 700 είδη βασιδιομυκήτων που αντιπροσωπεύουν 182 γένη βασιδιομυκήτων, έχουν εντοπισθεί βιοδραστικές ουσίες οι οποίες απομονώνονται από τα καρποσώματα, το μυκήλιο ή το υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (Wasser and Weis, 1999; Lull et al., 2005). Σήμερα έχουν απομονωθεί από πολλά είδη φαρμακευτικών μακρομυκήτων, όπως *Lentinula edodes*, *Auricularia auricula-judae*, *Cordyceps sinense*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Tremella fuciformis*, *Agaricus bisporus*, *Hericium erinaceus*, *Flammulina velutipes*, *Trametes versicolor*, *Agaricus blazei*, *Schizophyllum commune*, *Coprinus comatus*, *Volvariella volvacea* κ.α. πολλές ουσίες με αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση καθώς και δράσεις κατά των ιών, πλασμοδίων, πρωτόζωων, μυκήτων, βακτηριδίων, οι οποίες δοκιμάζονται από την ιατρική ως φάρμακα. Όπως φαίνεται και από τον παρακάτω Πίνακα 1.1, το μανιτάρι *A. aegerita* διαθέτει αντιμυκητιακή, αντικαρκινική δράση, μπορεί να τονώσει το νευρικό σύστημα και να μειώσει την χοληστερίνη και το λίπος και να περιορίσει καρκινικούς όγκους. Επίσης, δύο παράγωγα του ινδολίου, απομονωμένα από μεθανολικά εκχυλίσματα του μανιταριού, ανέστειλαν υπεροξειδωση των λιπιδίων σε μικροσώματα του συκωτιού ποντικών (Kim et al., 1997), πολυσακχαρίτες του εμφάνισαν υπογλυκαιμική δράση (Tadashi et al., 1994) και το πεπτίδιο *agrocybin* έδειξε αντιμυκητιακή δράση (Ngai et al., 2005). Ωστόσο, λίγα στοιχεία υπάρχουν για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των μανιταριών *Agrocybe*.

**Πίνακας 1.1: Φαρμακευτικές δράσεις βασιδιομυκήτων (Wasser and Weis, 1999)**

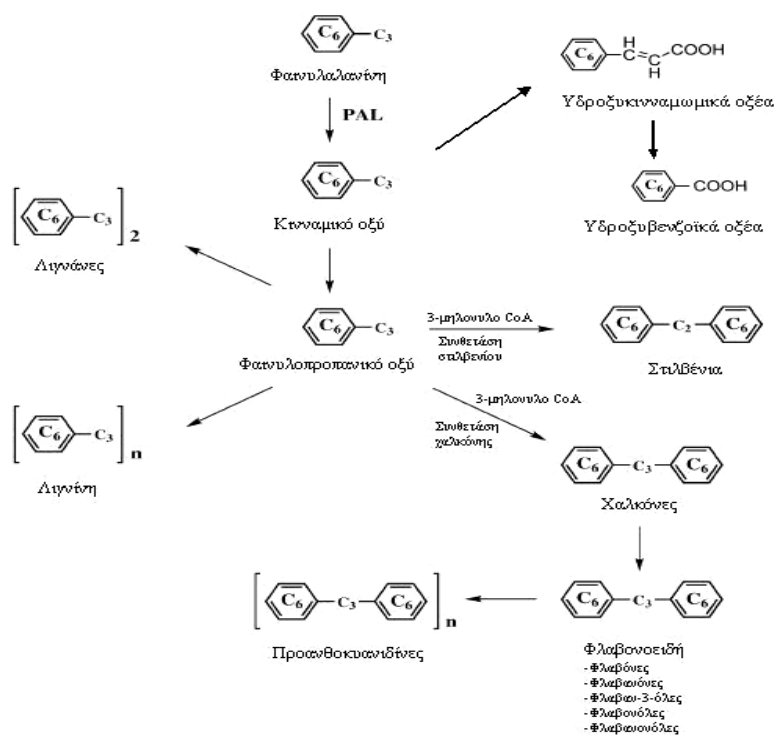
Θεραπευτικά αποτελέσματα / Μακρομύκητες	Αντιμυκητιασικά	Αντιφλεγμονώδη	Αντικαρκινικά	Κατά των ιών, π.χ. AIDS	Αντιβακτηριακά & Αντιπαρασιτικά	Ρύθμιση της πίεσης του αίματος	Καρδιαγγειακές διαταραχές	Υπερχοληστερολαιμία	Τονωτικό νεφρών	Κατά της ηπατίτιδας	Τονωτικό νεύρων	Σεξουαλική ενίσχυση	Χρόνια βρογχίτιδα	Αντιδιαβητικά
<i>Auricularia auricula-judae</i>			x			x	*	*						*
<i>Ganoderma lucidum</i>		*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
<i>Ganoderma applanatum</i>			x	x	x									
<i>Lentinula edodes</i>		*	*	*	*	*		*	*	*		*		*
<i>Pleurotus ostreatus</i>			x	x	x			*			*			
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	x		x					x						
<i>Flammulina velutipes</i>	x	*	*	x										
<i>Volvariella volvacea</i>			x	x	x			x						
<i>Agrocybe aegerita</i>	x		x					x			x			

\* Αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού (συμπλήρωμα διατροφής), x - Μη αναγνωρισμένο εμπορικό προϊόν μανιταριού

## 2 Φαινολικές ενώσεις

### 2.1 Εισαγωγή

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι συνθέτονται κυρίως από τα φυτά κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξής τους (Christie *et al.*, 1994) όταν αυτά βρεθούν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (θρεπτικό ή θερμοκρασιακό στρες, υπεριώδης ακτινοβολία) (Li *et al.*, 1993; Bennet & Wallsgrave, 1994) ή ακόμη και όταν τραυματιστούν τα εξωτερικά τους κυτταρικά τοιχώματα (Robbins 2003). Στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών συμπεριλαμβάνονται επίσης τα τερπενοειδή και τα αλκαλοειδή. Η φαινυλαλανίνη, η οποία σχηματίζεται από το χορισμικό οξύ (chorismate acid), το τελευταίο προϊόν της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος (Maga 1978), θα δώσει μετά από ένα πλήθος ενζυμικών και μη αντιδράσεων τα περισσότερα φυτικά φαινολικά συστατικά (Σχήμα 2.1) (Christie *et al.*, 1994; Αλεξάνδρου και Βάρβογλη, 1996).



PAL: Λύση της φαινυλαλανίνης

**Εικόνα 2.1.** Διάγραμμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινολικών συστατικών των φυτών.

Από χημική άποψη, είναι ενώσεις που περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο, στον οποίο υπάρχουν θέσεις για ένα ή περισσότερα προς αντικατάσταση υδροξύλια, συμπεριλαμβανομένων και των παραγώγων τους (εστέρων, μεθυλεστέρων, γλυκοζιτών). Οι περισσότερες φαινόλες έχουν δύο ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίων και ως εκ τούτου είναι δραστικές ουσίες.

Στα φαινολικά συστατικά συγκαταλέγονται πάνω από 8.000 ενώσεις (Beckman 2000). Είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και απαντώνται συνήθως ως γλυκοζίτες ενωμένες με σάκχαρα στο χυμοτόπιο των φυτικών κυττάρων (Bengoechea 1997; Wallace & Fry 1994). Αρκετές

φορές εμφανίζονται ως αδιάλυτα συστατικά στα κυτταρικά τοιχώματα των ριζών, φύλλων, καρπών και λουλουδιών, συμβάλλοντας ενεργά στη μηχανική τους αντοχή (Baucher 1998). Επίσης, σημαντικός είναι ο ρόλος τους στην ανάπτυξη του φυτού καθώς και στους μηχανισμούς άμυνας υπό συνθήκες στρες ή παθογένειας (Strack 1997).

Προσφάτως έχει εκδηλωθεί ενδιαφέρον για τη μελέτη δευτερογενώς παραγόμενων φυτικών ουσιών με αντικαρκινικές, αντιοικές, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται από τα φυτά όταν τα προσβάλλουν παθογόνοι μικροοργανισμοί και έχουν ως σκοπό να αναχαιτίσουν την εξάπλωσή τους, έχουν δηλαδή μυκητοστατική δράση. Αυτές καλούνται “φυτοαλεξίνες” (phytoalexins) και αναφέρεται ότι οι περισσότερες προέρχονται από την οικογένεια των φαινολικών ουσιών (Maga 1978).

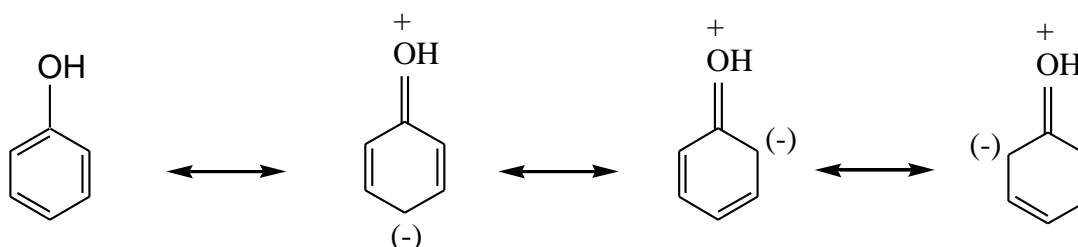
Επιπροσθέτως, η επίδραση των φαινολικών ουσιών στην ποιότητα των τροφίμων, οδηγεί την επιστημονική κοινότητα σε βαθύτερη μελέτη τους, με σκοπό την ευρεία χρήση τους όχι μόνο ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα (Brenes-Balbuena *et al.*, 1992), αλλά και ως παράγοντες βελτίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών νωπών και επεξεργασμένων τροφίμων (Tan 2000 ; Robbins 2003).

Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση ομαδοποιεί τα φαινολικά συστατικά σε σχέση με το βασικό ανθρακικό τους σκελετό, δηλαδή με τον αριθμό των βενζολικών τους δακτυλίων (Λαναρίδης 2000). Έτσι προκύπτουν οι εξής κατηγορίες:

1. Οι απλές φαινόλες, που περιλαμβάνουν στο μόριο τους έναν αρωματικό δακτύλιο (π.χ. απλές φαινόλες, ακετοφαινόλες, βενζοφαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες).
2. Οι πολυφαινόλες με δυο αρωματικούς δακτυλίους (π.χ. φλαβονοειδή, στιλβένια, λιγνάνες)
3. Οι πολυφαινόλες με τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, που συνήθως προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα (π.χ. λιγνίνες, ταννίνες).

Η δραστηριότητα των ενώσεων αυτών οφείλεται αφενός μεν στην παρουσία της φαινυλομάδας, η οποία λόγω ευκινησίας του ατόμου υδρογόνου εμφανίζει όξινο χαρακτήρα, αφετέρου δε στο βενζολικό πυρήνα που μπορεί να υποστεί ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις (Gorinstein *et al.*, 2001).

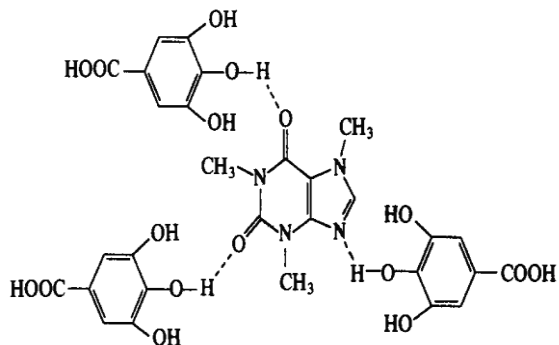
Πιο συγκεκριμένα, ο όξινος χαρακτήρας οφείλεται στο φαινόμενο του συντονισμού, δηλαδή στη μετατόπιση των ηλεκτρονίων των τριών διπλών δεσμών του βενζολικού πυρήνα και των δύο ζευγών ηλεκτρονίων του οξυγόνου. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικού φορτίου επί του οξυγόνου (άρα ευκολότερη απόσπαση του υδρογόνου ως πρωτονίου) και ενός αρνητικού φορτίου σε κάποια κορυφή του δακτυλίου (όρθο ή πάρα) (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2.** Το φαινόμενο του συντονισμού στον αρωματικό δακτύλιο.

Το σχηματιζόμενο αρνητικά φορτισμένο ιόν του φαινολοξειδίου παρουσιάζει αυξημένη διαλυτότητα, κυρίως υπό την παρουσία απλών μεταλλοκατιόντων, π.χ. νατρίου ή αμμωνίου. Η κίνηση του αρνητικού φορτίου σε άτομο άνθρακα και όχι σε άτομο οξυγόνου ευνοεί το σχηματισμό

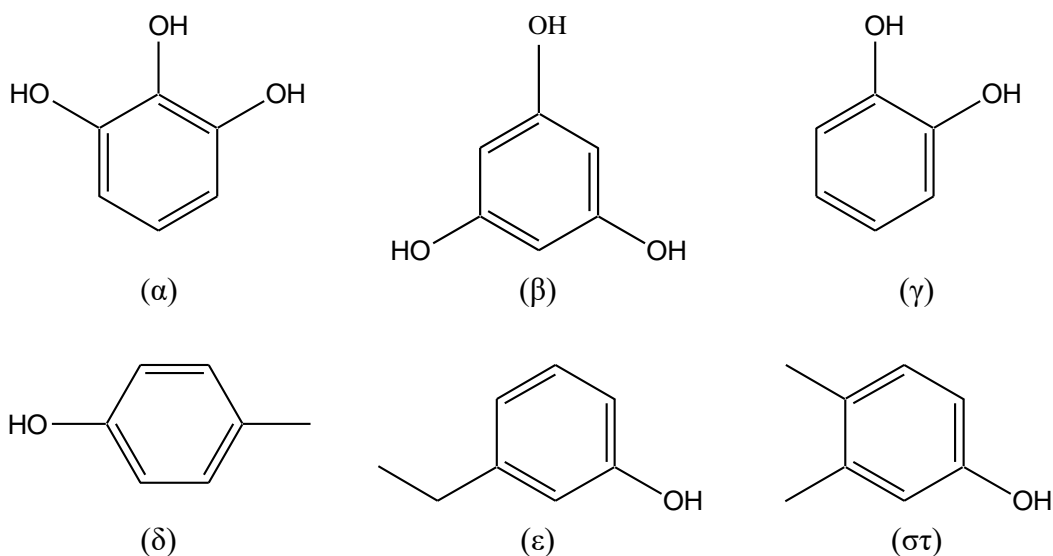
ημικινονικών ανιόντων που έλκουν θετικά φορτισμένες (ηλεκτρονιόφιλες) αλκυλικές ομάδες. Επιπλέον, το όξινο (θετικά φορτισμένο) υδρογόνο του φαινολικού δακτυλίου αλληλεπιδρά με βασικές (αρνητικά φορτισμένες) ομάδες σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση μεταξύ καφεΐνης και τριών μορίων γαλλικού οξέος (Εικόνα 2.3).



**Εικόνα 2.3.** Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ καφεΐνης και τριών μορίων γαλλικού οξέος.

### 2.1.1 Απλές φαινόλες

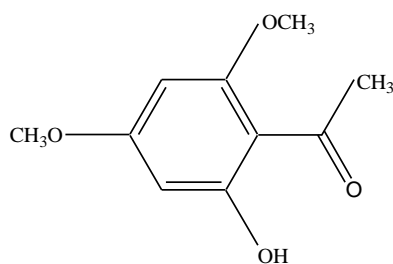
Οι απλές φαινόλες περιέχουν στο μόριό τους έναν αρωματικό δακτύλιο. Μπορεί να είναι δι- ή τρι-υδροξυ-ενώσεις, όπως η πυρογαλλόλη, η φλωρογλυκινόλη και η κατεχόλη (Εικόνα 2.4) (Καραουλιάνης 1996).



**Εικόνα 2.4.** Οι απλές φαινόλες πυρογαλλόλη (α), φλωρογλυκινόλη (β) κατεχόλη (γ), π-κρεσόλη (δ), 3-αιθυλοφαινόλη (ε) και 3,4-διμεθυλοφαινόλη (στ).

Οι ακετοφαινόλες συναντώνται λιγότερο σε σχέση με τις απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ξανθοξυλίνη (Εικόνα 2.5).





**Εικόνα 2.5.** Η ξανθοξυλίνη.

### 2.1.2 Φαινολικά οξέα

Αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων και περιλαμβάνουν τα παράγωγα του κινναμωμικού και του βενζοϊκού οξέος. Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται σε μικρό ποσοστό ως ελεύθερα οξέα, αρκετά συχνά ως γλυκοζίτες (ενωμένες με σάκχαρα) και στο μεγαλύτερο ποσοστό τους υπό τη μορφή εστέρων. Επίσης βρίσκονται δεσμευμένες με δομικά στοιχεία του φυτού, όπως πρωτεΐνες, λιγνίνη, οργανικά οξέα ή τερπένια (Schuster&Herrmann 1985; Herrmann 1989). Απαντώνται σε όλα τα μέρη του φυτού όπως φύλλα, άνθη, σπόρους και βλαστούς.

Εκτός από την παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου στο μόριό τους, τα φαινολικά οξέα έχουν, είτε ένα καρβοξυλικό οξύ ως πλευρική αλυσίδα (παράγωγα βενζοϊκού οξέος με σκελετό C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), είτε ένα προπενικό οξύ (παράγωγα κινναμωμικού οξέος με σκελετό C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) είτε μια αλδεϋδομάδα (Πίνακας 2.1).

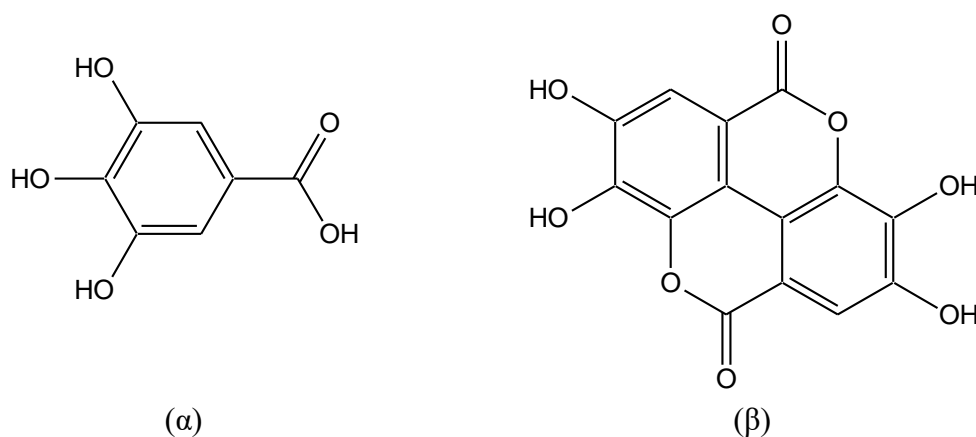
**Πίνακας 2.1.** Τα κυριότερα φυτικά φαινολικά (υδροξυκινναμωμικά και υδροξυβενζοϊκά) οξέα, καθώς και ενώσεις της αλδεϋδης που κατατάσσονται σε αυτά.

<i>R</i> <sub>2</sub>	<i>R</i> <sub>3</sub>	<i>R</i> <sub>4</sub>	<i>R</i> <sub>5</sub>	<i>X</i>	Φαινολικά οξέα
H	H	H	H	a	Κινναμωμικό οξύ
-OH	H	H	H	a	ο-Κουμαρικό οξύ
H	H	-OH	H	a	π-Κουμαρικό οξύ
H	-OH	H	H	a	μ-Κουμαρικό οξύ
H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	H	a	Φερουλικό οξύ

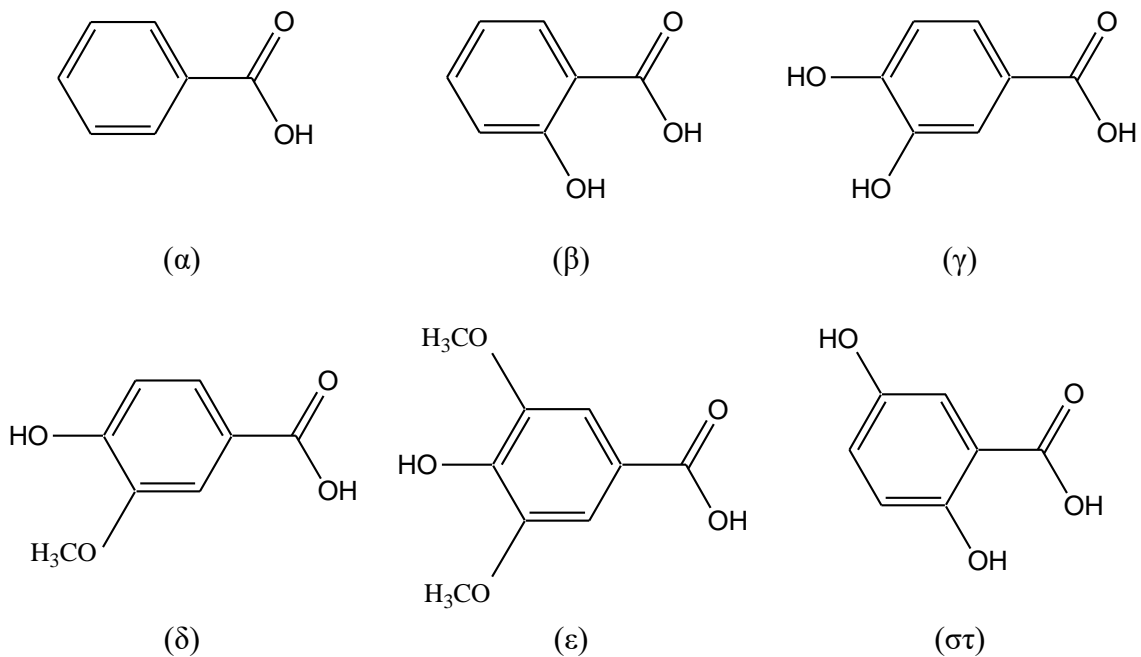
H	-OCH3	-OH	-OCH3	a	Σιναπικό οξύ
H	-OH	-OH	H	a	Καφεϊκό οξύ
H	H	H	H	b	Βενζοϊκό οξύ
-OH	H	H	H	b	Σαλικυλικό οξύ
H	H	-OH	H	b	π-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ
H	-OCH3	-OH	H	b	Βανιλλικό οξύ
H	-OCH3	-OH	-OCH3	b	Συριγγικό οξύ
H	-OH	-OH	H	b	Πρωτοκατεχουϊκό οξύ
-OH	H	H	-OH	b	Γεντισικό οξύ
-OH	-OH	-OH	-OH	b	Γαλλικό οξύ
H	-OCH3	-OCH3	H	b	Βερατρικό οξύ
H	-OCH3	-OH	-OCH3	c	Συριγγική αλδεϋδη
H	-OCH3	-OH	H	c	Βανιλίνη

### Υδροξοβενζοϊκά παράγωγα

Η διαφοροποίηση στη δομή στην οποία υπόκειται η συγκεκριμένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων οφείλεται στις υδροξυλίωσεις και μεθυλίωσεις του αρωματικού δακτυλίου. Το γαλλικό οξύ είναι ο κυριότερος αντιπρόσωπος των υδροξοβενζοϊκών οξέων. Μαζί με τη διμερή του μορφή, το ελλαγικό οξύ (Wallace&Fry 1994; Rice-Evans1997), αποτελεί τη δομική μονάδα των υδρολυόμενων ταννινών (Εικόνα2.6) (Strack, 1997). Άλλα οξέα της κατηγορίας αυτής είναι το βενζοϊκό, το σαλικυλικό, το πρωτοκατεχουϊκό, το βανιλλικό, το συριγγικό και το γεντισικό (Εικόνα 2.7).

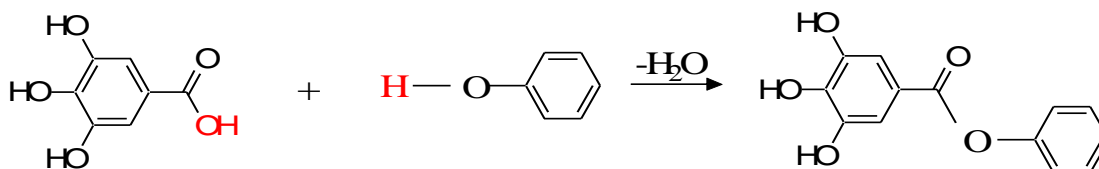


**Εικόνα 2.6.** Το γαλλικό οξύ (α) και η διμερής του μορφή, το ελλαγικό οξύ (β).



**Εικόνα 2.7.** Τα κυριότερα υδροξυβενζοϊκά οξέα, βενζοϊκό (α), σαλικυλικό (β), πρωτοκατεχουϊκό (γ), βανιλϊκό (δ), συρινγκϊκό (ε) και γεντισϊκό (στ).

Επιπροσθέτως, το π-κουμαρϊκό, το φερουλικό, το καφεϊκό και το σιναπϊκό οξύ αποτελούν τα πιο συνηθισμένα υδροξυκινναμωμϊκά οξέα. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι οι εστέρες που σχηματίζονται παρουσία των φαινολικών οξέων, αποτελούν ένωση μεταξύ της όξινης ομάδας του φαινολικού οξέος και της υδροξυλομάδας ενός άλλου μορίου. Άρα το φαινολικό οξύ δεν υπεισέρχεται στον εστερϊκό δεσμό με τα φαινολϊκά του υδροξύλια (Εικόνα 2.8).



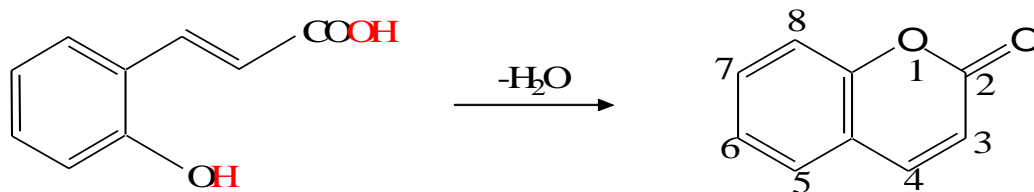
**Εικόνα 2.8.** Σχηματισμός εστερϊκού δεσμού μεταξύ φαινολικού οξέος και φαινόλης.

### 2.1.3 Κουμαρίνες

Είναι ενώσεις με έναν βενζολϊκό δακτύλιο, στον οποίο προσκολλάται ένας εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος οξυγόνου. Οι κουμαρίνες αποτελούν λακτόνες του ο-υδροξυκινναμωμϊκού οξέος. Η κουμαρίνη είναι η μητρϊκή ένωση της οικογένειας των κουμαρινών. Ο σχηματισμός της λαμβάνει χώρα ως εξής:

- οξειδωση του κινναμωμϊκού οξέος, σε ο-θέση ως προς την πλευρϊκή αλυσίδα και το σχηματισμό ο-υδροξυκινναμωμϊκού οξέος.
- με αποβολή ενός μορίου νερού από το σχηματισθέν ο-υδροξυκινναμωμϊκό οξύ (Εικόνα 2.9).

Σχεδόν όλες οι γνωστές κουμαρίνες είναι υποκατεστημένες από ένα υδροξύλιο στη θέση 7. Η υποκατάσταση μπορεί να γίνει και στις θέσεις 6 και 8. Οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνται ως διορθωτικά οσμής και γεύσης στα τρόφιμα.

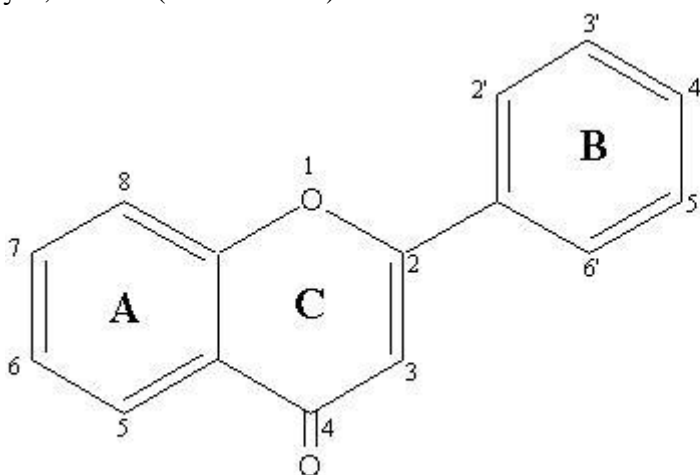


**Εικόνα 2.9.** Η κουμαρίνη ως παράγωγο του ο-υδροξυκινναμωμικού οξέος.

#### 2.1.4 Φαινολικές ενώσεις με δύο αρωματικούς δακτυλίους

Κύριος αντιπρόσωπος της κατηγορίας αυτής αποτελούν τα φλαβονοειδή. Είναι ενώσεις που χαρακτηρίζονται από έναν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα και μορφή  $C_6-C_3-C_6$ .

Τα φλαβονοειδή θεωρούνται παράγωγα της 2-φαινυλο-βενζοπυρόνης (φλαβάνιο). Αποτελούνται από δύο βενζολικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους με έναν κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο οξυγόνου. Φέρουν αρκετές υδροξυλομάδες, οι οποίες είναι ενωμένες με τους δακτυλίους Α, Β και C (Εικόνα 2.10).



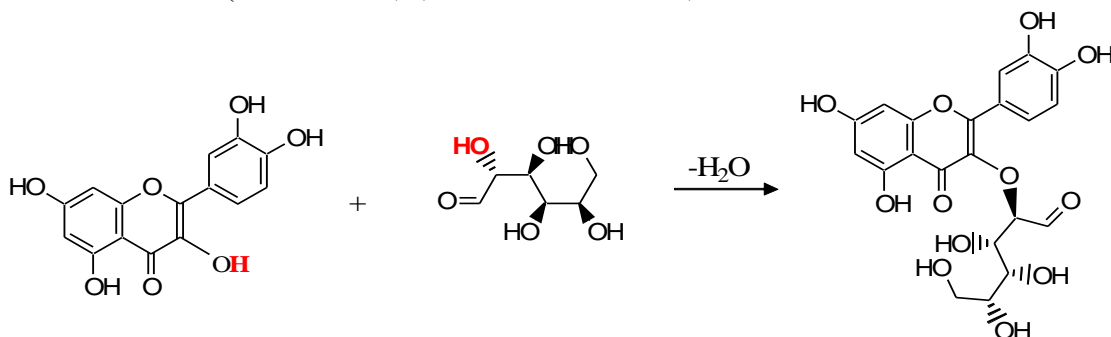
**Εικόνα 2.10.** Η βασική δομή και ο τρόπος αρίθμησης του φλαβονοειδούς πυρήνα.

Ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου και τη θέση των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων στους δακτυλίους, τα φλαβονοειδή διακρίνονται στις εξής κατηγορίες (Sakihama et al., 2002):

- Φλαβονόλες, π.χ. κερκετίνη (3,5,7,3',4'-πενταυδροξυφλαβονόλη), κεμφερόλη (3,5,7,4'-τετραυδροξυφλαβονόλη).
- Φλαβόνες, π.χ. απιγενίνη (5,7,4'-τριυδροξυφλαβόνη), στις οποίες δεν εμφανίζεται υδροξυλομάδα στη θέση 3.
- Φλαβανόνες, π.χ. ναριγκενίνη (5,7,4'-τριυδροξυφλαβανόνη), στις οποίες λείπει ο 2,3 διπλός δεσμός και η υδροξυλομάδα στη θέση 3.

- Φλαβαν-3-όλες, π.χ. κατεχίνη, στις οποίες λείπει ο 2,3 διπλός δεσμός και το καρβονυλικό οξύ στην θέση 4.
- Ισοφλαβόνες, π.χ. γενιστεΐνη.
- Άλατα του κατιόντος φλαβυλίου, π.χ. ανθοκυανιδίνες.

Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες (Πίνακας 2.2) που βασίζονται πρωτογενώς στο βαθμό οξειδωσης των ατόμων του άνθρακα της γέφυρας και τη θέση των υποκατεστημένων υδροξυλομάδων στους δακτυλίους. Ο δακτύλιος Α είναι συνήθως υποκατεστημένος στις θέσεις 5 ή/και 7 και ο Β στις θέσεις 3' ή και 4'. Απαντούν συνηθέστερα υπό μορφή γλυκοζιτών, ενωμένα δηλαδή με διάφορα σάκχαρα, όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και ξυλόζη. Επίσης αντιδρούν και με δισακχαρίτες, όπως είναι η ρουτινόζη. Οι συνηθέστερες θέσεις για τον σχηματισμό αιθερικών-γλυκοζιτικών δεσμών είναι στο 7<sup>ο</sup> υδροξύλιο των φλαβονών και ισοφλαβονών, στο 3<sup>ο</sup> και 7<sup>ο</sup> των φλαβονολών και στο 3<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> των ανθοκυανιδινών (Εικόνα 2.11) (Sakihama *et al.*, 2002).

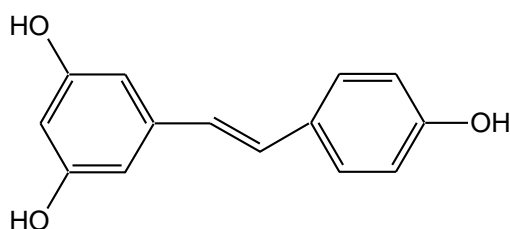


**Εικόνα 2.11.** Σχηματισμός αιθερικού-γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ της κερκετίνης και της γλυκόζης. Η κερκετίνη (ως φλαβονόλη) σχηματίζει το δεσμό στη θέση 3 του δακτυλίου της.

**Πίνακας 2.2.** Τα κυριότερα φυτικά φλαβονοειδή (ταξινόμηση & δομή) (Heim *et al.*, 2002)

Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinose 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
Flavanone (dihydroflavon)		myricetin tamarixetin naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe 5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinose
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

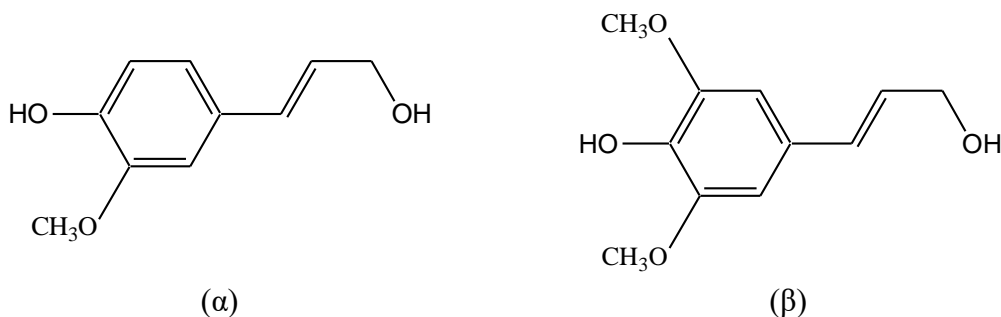
Τα στιλβένια είναι ενώσεις αποτελούμενες από δύο βενζολικούς δακτυλίους και με βασικό σκελετό της μορφής  $C_6-C_2-C_6$ . Ένας από τους σπουδαιότερους αντιπροσώπους αποτελεί η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο). Η ρεσβερατρόλη (Εικόνα 2.12) απαντάται στους φλοιούς της ώριμης σταφυλής και φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην αντίσταση των σταφυλιών, όταν αυτά προσβάλλονται από κρυπτογαμικές ασθένειες (Gorinstein *et al.*, 2001). Αποτελεί ασπίδα του ανθρώπινου οργανισμού ενάντια στην αρτηριοσκλήρυνση και στη στεφανιαία νόσο, ενώ παρουσιάζει και αντικαρκινική δράση, δεδομένου ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η προστατευτική της δράση είναι πιο ισχυρή από αυτή των άλλων πολυφαινολικών ενώσεων (Ozo & Caygill 1986). Τέλος, οι λιγνάνες είναι διμερή της μορφής  $[C_6-C_3]_2$  και δεν πρέπει να συγχέονται με τη λιγνίνη. Προέρχονται από το διμερισμό ενώσεων της σειράς των φαινυλοπροπανίων ή φαινυλοπροπενίων.



**Εικόνα 2.12.** Η ρεσβερατρόλη.

### 2.1.5 Φαινολικές ενώσεις με τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους

Δύο από τους σημαντικότερους αντιπροσώπους της κατηγορίας αυτής είναι η λιγνίνη και οι ταννίνες. Η λιγνίνη είναι μεγαλομοριακή ένωση και αποτελεί συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των ξυλωδών φυτών. Οι δομικές μονάδες από τις οποίες σχηματίζεται είναι φαινόλες και φαινολαιθέρες, κυρίως η κονιφερυλοαλκοόλη και η σιναπυλική αλκοόλη (Εικόνα 2.13).



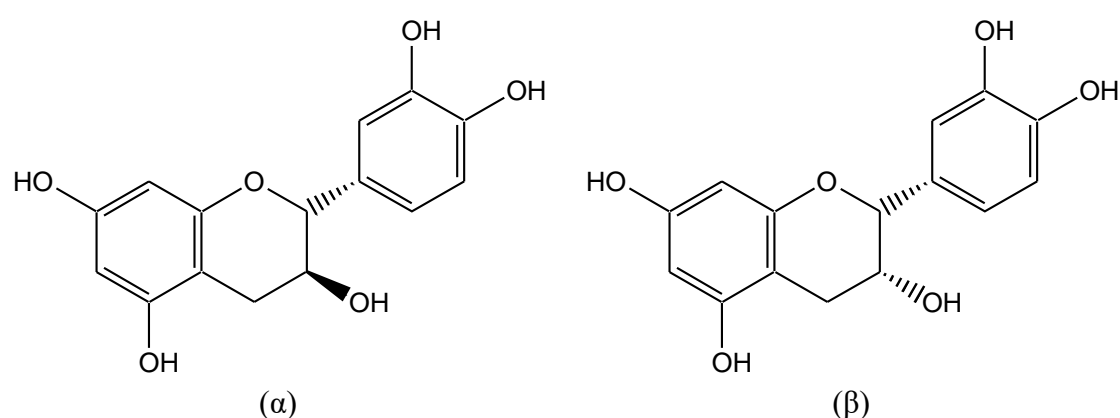
**Εικόνα 2.13.** Η κονιφερυλοαλκοόλη (α) και η σιναπυλική αλκοόλη (β).

Η λιγνίνη δεν έχει καθορισμένη δομή και διαφέρει από φυτό σε φυτό, γιατί τα τελικά στάδια σχηματισμού της είναι αντιδράσεις οξειδώσεως – συζεύξεως που δεν ελέγχονται από ένζυμα, είναι δηλαδή τυχαίες αντιδράσεις. Τελευταία έχει προταθεί ένας σχεδόν πλήρης συντακτικός τύπος για ένα είδος λιγνίνης, μοριακού βάρους ~ 5.000, ο οποίος αποτελείται από δέκα διαφορετικές οργανικές ομάδες (καρβοξύλιο, φορμύλιο, τετραϋδροφουρανικός δακτύλιος κλπ.) (Καραουλάνης, 1996).

Οι ταννίνες είναι σχετικά ογκώδη μόρια με φαινολικούς δακτυλίους, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων, περιέχοντα φαινολική ομάδα. Είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες θα πρέπει να είναι αρκούντως ογκώδεις, όχι όμως υπερβολικά, γιατί σε αυτή την περίπτωση ενδέχεται να μην μπορούν να πλησιάσουν τις δραστικές ομάδες των πρωτεϊνών για να αντιδράσουν. Το μοριακό βάρος των δραστικών ταννινών κυμαίνεται από 600 έως 3.500 Da (Αλεξάνδρου&Βάρβογλη,1996).

Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες ταννίνες ή ταννίνες της κατεχίνης και σε υδρολύομενες ταννίνες ή ταννίνες του γαλλικού οξέος, με δομική μονάδα το γαλλικό οξύ (Gorinstein *et al.*, 2001).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή των φλαβον-3-ολών (ή κατεχινών) και συγκεκριμένα της (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης (Εικόνα 2.14).



**Εικόνα 2.14.** Οι πρόδρομες ενώσεις των συμπυκνωμένων ταννινών, (+)-κατεχίνη (α) & (-)-επικατεχίνη (β).

## 2.2 Οι φαινολικές ενώσεις στα μανιτάρια

Το φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών χαρακτηρίζεται κυρίως από την παρουσία φαινολικών οξέων και των παραγώγων τους αλκοολών και αλδεϋδών όπως τυροσόλη, βανιλίνη και συριγγαλδεϋδη (Πίνακας 2.3). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, συρριγγικό οξύ, βανιλλικό οξύ) είναι παρόντα σε μεγάλες ποσότητες στα κόκκινα φρούτα, μαύρα ραπανάκια και κρεμμύδια. Το τσάι είναι μια σημαντική πηγή γαλλικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα μπορούν επίσης να βρεθούν ως συστατικά σύνθετων δομών όπως οι υδρογονωμένες ταννίνες (γαλοταννίνες σε μάνγκο και ελλαγιτανίνες σε κόκκινα φρούτα όπως φράουλες και σμέουρα) (Herrero *et al.*, 2012).

Τα υδροξυκινναμικά οξέα ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτά. Οξέα όπως το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, το φερούλικό, και το σιναπικό απαντώνται και με τη μορφή γλυκοζιτών ή ως εστέρες του κινικού οξέος (π.χ. το χλωρογενικό οξύ, το οποίο είναι εστέρας του καφεϊκού οξέος με το κινικό οξύ και απαντάται σε πολλά φρούτα και τον καφέ), του σικιμικού οξέος και του τρυγικού οξέος. Το καφεϊκό οξύ είναι το πιο άφθονο φαινολικό οξύ στα περισσότερα φρούτα (κυρίως στο εξωτερικό μέρος των ώριμων φρούτων). Τέλος το φερούλικό οξύ βρίσκεται σε αφθονία στους κόκκους δημητριακών.

Στα εκχυλίσματα των μανιταριών έχουν ανευρεθεί οι 5 από τις 6 υποκατηγορίες των φλαβονοειδών: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες και φλαβανόλες. Οι φλαβανόλες υπάρχουν στη μονομερή μορφή τους (κατεχίνες) ενώ ανευρίσκονται και οι εστέρες τους με γαλλικό οξύ. Οι κατεχίνες βρίσκονται σε πολλά είδη φρούτων αλλά κυρίως στο πράσινο τσάι, το κόκκινο κρασί και από τη σοκολάτα. Σε αντίθεση με τα άλλα φλαβονοειδή, οι φλαβανόλες δεν απαντώνται στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή στα τρόφιμα. Οιοφλαβονόλες απαντώνται επίσης στο κόκκινο κρασί και το τσάι, κυρίως με τη μορφή γλυκοζιτών της γλυκόζης και της ραμνόζης. Η ρουτίνη είναι γλυκοζιτη της κερκετίνης με το δισακχαρίτη ρουτινόζη.

Επιπλέον στο φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών έχει ανευρεθεί η ρεσβερατρόλη (3,5,40-τριυδροξυ-τρανς-στιλβένιο). Ανήκει στην κατηγορία των στιλβενίων τα οποία βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στα διάφορα τρόφιμα. Στην ρεσβερατρόλη έχουν αποδοθεί αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι κυριότερες διαιτητικές πηγές ρεσβερατρόλης είναι τα σταφύλια, το κρασί και τα φιστίκια.

Τέλος στα φαινολικά εκχυλίσματα μανιταριών έχουν ταυτοποιηθεί τερπενικά οξέα: ελεανοϊκό οξύ και ουρσολικό οξύ καθώς και προϊόντα υδρόλυσης ταννινών: ελλαγικό και ταννικό οξύ.

Στη βιβλιογραφία το φαινολικό εκχύλισμα του *Agrocybeaegerita* βρέθηκε να αποτελείται κυρίως από: πρωτοκατεχουικό οξύ, γαλλικό οξύ (546,32 ± 112,69 μg/γξηρού δείγματος), 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (329,67 ± 77,24 μg/γξηρού δείγματος), π-κουμαρικό οξύ, γεντισικό οξύ και συριγγαλδεΐδη.

**Πίνακας 2.3:** Φαινολικές ενώσεις στα μανιτάρια

Φαινολικά οξέα και παράγωγά τους	Είδος μανιταριού	Βιβλιογραφική αναφορά
<b>Παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος</b>		
π-υδροξυβενζοϊκό	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i> , <i>Aleurodiscus vitellinus</i> , <i>Hydropus dusenii</i> , <i>Fistulina Antarctica</i> , <i>Grifola gargal</i> , <i>Ramaria patagonica</i> , <i>Lentinus squarrosulus</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), C.V. Toledo et al., (2016), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
π-υδροξυφαινυλοξικό	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i> , <i>Pleurotus eryngii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lin J-T et al. (2014)
3-4-δι-υδροξυφαινυλοξικό	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013),
πρωτοκατεχουικό	<i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Suillus bellinii</i> , <i>Lentinus squarrosulus</i> <b><i>Agrocybeaegerita</i></b>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
γαλλικό	<i>Cortinarius hariotii</i> , <i>Fistulina Antarctica</i> , <i>Fistulina endoxhanta</i> , <i>Grifola gargal</i> , <i>Ramaria patagonica</i> , <i>Agaricus subrufescens</i> <i>Lentinus squarrosulus</i> <i>Inonotus obliquus</i> <b><i>Agrocybeaegerita</i></b>	C.V. Toledo et al., (2016), T. Islam et al., (2016), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) X. Xu et al., (2016), Islam, T. et al., (2016)
συριγγικό	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Suillus bellinii</i> , <i>Pleurotus eryngii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lin J-T et al. (2014),
βανιλικό	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lactarius sanguifluus</i> , <i>Lactarius semisanguifluus</i> , <i>Russula</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)



	<i>delica, Suillus bellinii, Lentinus squarrosulus, Pleurotus eryngii</i>	Lin J-T et al. (2014)
<b>Παράγωγα του υδροξυκιναμωμικού οξέος</b>		
καφεϊκό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii, Lentinus squarrosulus Lentinus edodes, Pleurotus eryngii, Pleurotus cystidiosus Agrocybe aegerita</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Li, N. et al., (2013) Islam, T. et al., (2016)
κινναμωμικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii, Ramaria patagonica Lentinus squarrosulus,</i>	Kalogeropoulos, N. et al., 2013, C.V. Toledo et al., (2016), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
χλωρογενικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii Lentinus squarrosulus Pleurotus eryngii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Lin J-T et al. (2014)
φερουλικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii Lentinus squarrosulus Inonotus obliquus Pleurotus eryngii,</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Xu, X. et al., (2016), Lin J-T et al. (2014),
ο-κουμαρικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii Lentinus squarrosulus</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
π-κουμαρικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii, Ramaria patagonica Lentinus squarrosulus, Agrocybeaegerita</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), C.V. Toledo et al., (2016), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Islam, T. et al., (2016),
σιναπικό	<i>Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Suillus bellinii, Pleurotus eryngii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lin J-T et al. (2014),
βανιλλικό	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii, Lentinus squarrosulus, Pleurotus eryngii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Lin J-T et al. (2014),
γεντισικό	<i>Agaricus subrufescens, Agrocybeaegerita</i>	Islam, T. et al., (2016),
<b>Παράγωγα: αλκοόλες, αλδεΐδες</b>		
Τυροσόλη (phenethyl alcohol)	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013),
Βανιλίνη (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013)
συριγγαλδεΐδη	<i>Agrocybeaegerita</i>	Islam, T. et al., (2016),
<b>Φλαβονοειδή</b>		
<b>Φλαβανόλες</b>		
κατεχίνη	<i>Lentinus squarrosulus, Pleurotus eryngii</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017), Lin J-T et al. (2014),
επικατεχίνη	<i>Lentinus squarrosulus, Pleurotus eryngii</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017), Lin J-T et al. (2014),

γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης	<i>Inonotus obliquus</i>	X. Xu et al., (2016),
γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης.	<i>Inonotus obliquus</i>	X. Xu et al., (2016),
<b>Φλαβόνες</b>		
χρυσίνη	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013),
<b>Ισοφλαβόνες</b>		
γεντιστεΐνη	<i>Lactarius sanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013),
<b>Φλαβονόλες</b>		
καμπερόλη	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Suillus bellinii, Lentinus squarrosulus</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013), Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
μυρικετίνη	<i>Pleurotus eryngii</i>	Lin J-T et al. (2014),
κερκετίνη	<i>Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii, Pleurotus eryngii, Lentinus squarrosulus,</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Lin J-T et al. (2014),
ρουτίνη ( γλυκοζίτης)	<i>Lentinus squarrosulus Pleurotus eryngii</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017) Lin J-T et al. (2014),
<b>Φλαβανόνες</b>		
εριοδικτυόλη	<i>Lentinus squarrosulus</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
ναριγκίνη	<i>Inonotus obliquus</i>	X. Xu et al., (2016)
εσπεριδίνη	<i>Pleurotus eryngii</i>	Lin J-T et al. (2014)
<b>Στιλβένια</b>		
ρεσβερατρόλη	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013)
<b>Τερπενικά οξέα</b>		
ελαιανοϊκό οξύ	<i>Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013)
Ουρσολικό οξύ	<i>Russula delica, Suillus bellinii</i>	Kalogeropoulos, N. et al., (2013)
<b>Προϊόντα υδρόλυσης ταννινών</b>		
ελλαγικό οξύ	<i>Lentinus squarrosulus</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)
ταννικό οξύ	<i>Lentinus squarrosulus</i>	Lau, B. F. & Abdullah, N. (2017)

Στοιχείος *Agrocybe aegerita* έχουν αποδοθεί πολλές θεραπευτικές ιδιότητες. Τα θεραπευτικά του αποτελέσματα εστιάζονται στην αντικαρκινική, αντιμυκητιακή και αντιοξειδωτική του δράση, ενώ έχει βρεθεί ότι δρα και ως τονωτικό των νεύρων και κατά της υπερχοληστερολαιμίας και υπερλιπιδαιμίας.

### 2.3 Απομόνωση φαινολικών συστατικών

Η εκχύλιση με διαλύτη (*solvent extraction*) αποτελεί μία από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές παραλαβής βιοδραστικών συστατικών. Πρόκειται για μία διαδικασία κατά την οποία λαμβάνουν χώρα τα φαινόμενα **α) της διόγκωσης και ενυδάτωσης** (*swelling & hydration*) του υποστρώματος κατά την εμφάνισή του στο διαλύτη και **β) της μεταφοράς μάζας** (*mass transfer*) των ευδιάλυτων

συστατικών του υποστρώματος στο διαλύτη μέσω των διαδικασιών διάχυσης και όσμωσης (*diffusion & osmosis*) (Vinatoru, 2001). Ανάμεσα στις πλέον κλασσικές και ευρέως εφαρμοζόμενες μεθόδους εκχύλισης φαινολικών συστατικών είναι εκείνη με χρήση κάθετου ψυκτήρα (*reflux*), η διαβροχή με διαλύτη (*maceration*) και η εκχύλιση με υδρατμούς (*steam distillation*). Η ανάγκη όμως ελαχιστοποίησης της χρήσης οργανικών διαλυτών για λόγους υγιεινής, ασφάλειας και προστασίας του περιβάλλοντος οδήγησε στην καθιέρωση και εφαρμογή μιας σειράς εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης, της ίδιας ή σχεδόν της ίδιας απόδοσης, όπως είναι η εκχύλιση με υπερήχους (*sonication extraction*), με μικροκύματα (*microwave extraction*), με υπερκρίσιμα ρευστά (*supercritical fluid extraction*) κ.ά. (Tsao *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Εκχύλιση με διαβροχή με διαλύτη (*maceration*)

Σε αυτού του είδους την εκχύλιση το δείγμα τοποθετείται σε έναν κατάλληλο περιέκτη ο οποίος περιέχει τον διαλύτη εκχύλισης και αφήνεται σε επαφή με αυτόν για ορισμένο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την διείσδυση του στην κυτταρική δομή του υποστρώματος προς διαλυτοποίηση των φαινολικών του συστατικών (Silva *et al.*, 1998). Η απόδοση της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί με περιοδική ανακίνηση του περιέκτη ή με μηχανική ή μαγνητική ανάδευση του διαλύματος.

### 2.3.2 Εκχύλιση με υπερήχους (*sonication*)

Η εκχύλιση με υπερήχους συνίσταται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς (Wang *et al.*, 2006). Κατά την εκχύλιση υλικών με υπερήχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων (*έμμεση μέθοδος εκχύλισης*). Ενώ, εξαιτίας, συχνά, της μη επαρκούς απόδοσης, η εκχύλιση συνήθως πραγματοποιείται αρκετές φορές και επομένως η σχετική κατανάλωση οργανικών διαλυτών είναι μεγάλη (Nyiredy *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Διαλύτες Εκχύλισης και Υδρόλυση

Δεδομένου ότι τα φαινολικά συστατικά είναι μια κατηγορία μεγάλης και σχετικά διαφορετικής πολικότητας, το μίγμα εκχύλισης πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να καθιστά δυνατή την παραλαβή του μεγαλύτερου ποσοστού των υπό μελέτη φαινολικών συστατικών από τα υποστρώματα. Γενικά, οργανικοί διαλύτες, όπως μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, διαιθυλαιθέρας, ακετόνη, εξάνιο ή συνδυασμός αυτών, χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην απομόνωση και παραλαβή των φαινολικών συστατικών (Tsao *et al.*, 2004). Η εκχύλιση των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών με χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας αποδίδει τα πιο υδρόφοβα συστατικά, ενώ οι αλκοόλες απομονώνουν ένα πιο ευρύ φάσμα πολικών και μη πολικών συστατικών από το φυτικό υλικό. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η χρονική διάρκεια της εκχύλισης, η οποία συνήθως κυμαίνεται από ένα λεπτό έως και 24 ώρες, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι μεγαλύτεροι χρόνοι αυξάνουν την πιθανότητα οξείδωσης των φαινολικών συστατικών (Naczka *et al.*, 2004).

### 2.3.4 Απομόνωση φαινολικών συστατικών από μανιτάρια

Η εκχύλιση με διαβροχή με διαλύτη (*maceration*) εφαρμόζεται και στην παραλαβή φαινολικών συστατικών από μανιτάρια (Toledo *et al.*, 2016). Πιο συγκεκριμένα για το μανιτάρι

*Agrocybe aegerita* έχει χρησιμοποιηθεί εκχύλιση με ζεστό ή κρύο νερό, μίγμα ακετόνης/νερού/οξικού οξέος (70:29,5:0,5, v/v/v) σε διάφορους χρόνους με ή χωρίς ανάδευση (Hsu Ching-Yu et al., 2013; Islam et al., 2016).

Επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις με διαβροχή με κάποιους από τους επόμενους διαλύτες: μεθανόλη (80-100%), αιθανόλη (95-100%), ακετόνη (60%), ζεστό νερό, κρύο νερό **και ανάδευση** εφαρμόστηκε στα μανιτάρια: *Ganoderma tsugae* (Mau et al., 2005a; Mau et al., 2005b), *Hypsizigus marmoratus* (Lee et al., 2007a), *Pleurotus citrinopileatus* (Lee et al., 2007b), *Pleurotus ferulae* (Alam et al., 2012), *Ramaria largentii* (Marr & D. E. Stuntz (Aprotosoaie et al., 2017), *Agaricus bisporus* (άσπρο), *Agaricus bisporus* (καφέ), *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes* (Reis et al., 2012), *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-caju* (Finnimundy et al., 2013), *Inonotus obliquus* (Hu et al., 2009), *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Russula delica*, *Suillus bellini* (Kalogeropoulos et al., 2013), *Agrocybe cylindracea* (Huan et al., 2006), *Clitocybe maxima*, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus ostreatus* (Tsaie et al., 2009),

Οι Guo et al. (2011) εκχύλισαν δείγματα του μανιταριού *Tuber indicum* Cooke & Massee με 55% αιθανόλη για 2 ώρες στους 60°C (διαδικασία που επαναλήφθηκε 2 φορές) και στη συνέχεια το αιθανολικό εκχύλισμα επανεκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και *n*-βουτανόλη. Εκχύλιση με μεθανόλη και θέρμανση στους 60°C χωρίς ανάδευση εφάρμοσαν και οι Samchai et al. (2011) ενώ εκχύλιση με ζεστό νερό εφάρμοσαν οι Tsaie et al. (2006), στο μανιτάρι *Agrocybe cylindracea*. Τέλος οι Philippe & Rose (2005) παρέλαβαν φαινολικά εκχυλίσματα με χρήση διαλύτη 80% αιθανόλη και διαβροχή για 1 ώρα στους 60°C.

Διαδοχικές εκχυλίσεις με μεθανόλη εφάρμοσαν οι Tel-Cayan et al. (2015), για την παραλαβή του φαινολικού κλάσματος από το μανιτάρι *Ganoderma adspersum*. Οι Li et al. (2013) εφάρμοσαν την ίδια μέθοδο με μίγμα μεθανόλης / 0,2 mol/L HCl σε πολλά είδη μανιταριών μεταξύ των οποίων και στο είδος *Agrocybe aegerita*.

Η εκχύλιση με υπέρηχους και χρήση διαλυτών όπως μεθανόλη, 95% μεθανόλη, 70% υδατική ακετόνη, ακετόνη/νερό/οξικό οξύ (70:29,5:0,5, v/v/v), μεθανόλη:νερό (80:20, v/v), 95% αιθανόλη, νερό και διάλυμα 1% υδροχλωρικού οξέος, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή φαινολικών εκχυλισμάτων από διάφορα είδη μανιταριών (Bai et al., 2013; Xu et al., 2016; Yahia et al., 2017; Reis et al., 2013; Kaewnarinet al., 2016).

Επιπλέον στην βιβλιογραφία η παραλαβή του φαινολικού κλάσματος έχει επιτευχθεί με εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet με διαλύτη μεθανόλη ή αιθανόλη και διάρκεια εκχύλισης από 11 έως 24 ώρες τόσο για την ποικιλία *Agrocybe aegerita* var. *alba* (Lo et al., 2005), όσο και για άλλα είδη μανιταριών (Akata et al., 2012; Panthong et al., 2016).

Τέλος οι Bhattacharya et al., (2014), εφάρμοσαν εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (διοξείδιο του άνθρακα) και συνδιαλύτη αιθανόλη στο μανιτάρι *Pleurotus ostreatus*.

Η αναλογία δείγμα/διαλύτη κυμαίνεται από 1:20 w/v (Hsu Ching-Yu et al., 2013; Kalogeropoulos et al., 2013), έως 1:5 w/v (Wong, Chye 2009).

#### 2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

Τα τρόφιμα που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική ικανότητα περιέχουν σε ένα σημαντικό ποσοστό τους φαινολικές ενώσεις. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων αυτών δίνει ένα μέγεθος για το κατά πόσο αυτές συμβάλλουν στο αντιοξειδωτικό δυναμικό μιας ουσίας ή ενός τροφίμου.

Η μέθοδος των *Folin-Denis* αποτέλεσε την καλύτερη τεχνική για τον παραπάνω προσδιορισμό και συγκαταλέχθηκε στις επίσημες μεθόδους της ΑΟΑC. Αν και αρχικά η συγκεκριμένη μέθοδος σχεδιάστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων τυροσίνη και θρυπτοφάνη σε πρωτεϊνούχα δείγματα, τελικά χρησιμοποιείται ευρύτατα στον ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών συστατικών σε διάφορα δείγματα.

Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης των φαινολικών υδροξυλομάδων που βρίσκονται στα υπό ανάλυση εκχυλίσματα. Ως εκ τούτου προκύπτει ότι η μέθοδος δεν προσδιορίζει μόνο τα εκχυλιζόμενα φαινολικά συστατικά, αλλά και μεγαλομοριακές ενώσεις (π.χ. πρωτεΐνες) που περιέχουν στο μόριό τους φαινολική υδροξυλομάδα.

Η χημική πορεία της αντίδρασης δεν είναι πλήρως γνωστή: το φαινολικό ιόν οξειδώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον, με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού συμπλόκου του αντιδραστηρίου (το διάλυμα χρωματίζεται από ανοιχτό κίτρινο σε κυανό). Το εξασθενές σύμπλοκο παρουσιάζει τις ακόλουθες δομές:  $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 13\text{WO}_3\cdot 5\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$  και  $3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 14\text{WO}_3\cdot 4\text{MoO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Peterson, 1979).

Το σχηματιζόμενο χρωμοφόρο περιέχει τα δύο μέταλλα (μολυβδαίνιο και βολφράμιο) με ελαττωμένο σθένος και μετρείται η απορρόφησή του στα 765 nm. Μια βελτιωμένη μορφή της μεθόδου Folin-Denis αποτελεί η μέθοδος Folin-Ciocalteu.

Σύμφωνα με τους ερευνητές *Singleton* και *Rossi*, η μέθοδος Folin-Ciocalteu δίνει 30 % περισσότερο χρώμα και καλύτερη ανάκτηση, ενώ μη φαινολικά συστατικά δεν παρεμβαίνουν στην αντίδραση. Να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως σε τιμές ισοδύναμες με αυτές κάποιας πρότυπης ουσίας, συνήθως του γαλλικού ή του καφεϊκού οξέος. Έτσι εξασφαλίζεται η γραμμικότητα με βάση το νόμο των *Lambert-Beer* και υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων.

Τέλος, από τη συγκεκριμένη μέθοδο δίδεται μόνο μια απλή εικόνα για το ολικό ποσό των φαινολικών συστατικών σε ένα εκχύλισμα και δεν μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για συγκεκριμένα επιμέρους φαινολικά συστατικά. Παρόλα ταύτα, η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιείται ευρύτατα στις χημικές αναλύσεις.

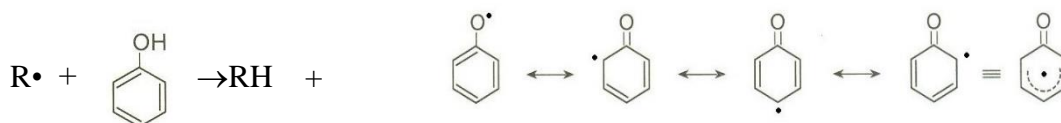
### 3 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών

#### 3.1 Σχέσεις δομής-αντιοξειδωτικής δράσης

Οι αναγωγικές ιδιότητες που εμφανίζουν οι φαινολικές ενώσεις τις καθιστούν ιδανικούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Η δραστηριότητα ενός αντιοξειδωτικού προσδιορίζεται από τα εξής (Rice-Evans *et al.*, 1997):

1. Από την ικανότητά του ως δότη πρωτονίων ή ηλεκτρονίων.
2. Από την ικανότητά της να σταθεροποιεί το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (οπότε δεν προκαλεί οξείδωση).
3. Από την αντίδραση με άλλα αντιοξειδωτικά.
4. Από τη δυνατότητα να δρα ως χηλικός παράγοντας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών γενικά αποδίδεται στην αντίδρασή τους με οξειδωτικούς παράγοντες (δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες). Οι φαινολικές ενώσεις παρέχουν φαινοξυ-ρίζες οι οποίες σταθεροποιούνται μέσω συντονισμού, λόγω του ακόρεστου συζυγιακού συστήματος:



Αυτή η δραστηριότητα εντείνεται από την παρουσία και δεύτερης υδροξυλομάδας, όπως στο καφεϊκό οξύ, ίσως λόγω της δημιουργίας ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Επίσης, η προσθήκη μιας ή δύο μεθοξυ-ομάδων (-OCH<sub>3</sub>) σε θέση *όρθο* ως προς την ομάδα -OH (π.χ. σιναπικό οξύ) αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα, λόγω περαιτέρω σταθεροποίησης της φαινοξυ-ρίζας (Natellaetal., 1999).

Επιπλέον, οι υδροξυλομάδες προκαλούν μείωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, πράγμα που σημαίνει ότι η προσθήκη πολλών υδροξυλομάδων μετατρέπει μια ένωση σε ισχυρότερο αναγωγικό, άρα οξειδώνεται ευκολότερα. Αυτό σημαίνει ότι είναι ισχυρότερο αντιοξειδωτικό.

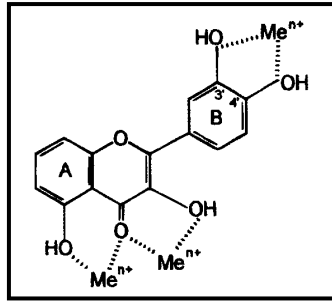
Μόνο η παρουσία δύο υδροξυλομάδων σε *όρθο* θέση μεταξύ τους είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκου Cu (II)-φαινολικού (π.χ. καφεϊκό οξύ). Η δυνατότητα ορισμένων φαινολικών ενώσεων να δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα που μπορούν να καταλύουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών όπως ο χαλκός ή ο σίδηρος, τα καθιστά ικανά αντιοξειδωτικά μόρια (Rice-Evansetal., 1997; Natellaetal., 1999).

Έχει αναφερθεί ότι το καφεϊκό οξύ μπορεί να δρα συνεργιστικά με την α-τοκοφερόλη, πρώτον καθυστερώντας την οξείδωσή της και δεύτερον, αναγεννώντας την από την α-τοκοφεροξυ-ρίζα (Natellaetal., 1999).

Τα παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος φαίνεται να έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος. Αυτό αποδίδεται στην προπενική πλάγια αλυσίδα που διαθέτουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα. Ο διπλός δεσμός στην πλάγια αλυσίδα έχει σταθεροποιητικό αποτέλεσμα στην φαινοξυ-ρίζα, λόγω συζυγιακού φαινομένου (Natellaetal., 1999).

Όσον αφορά στα φλαβονοειδή οι πιθανές σχέσεις δομής-αντιοξειδωτικής δράσης αποδίδονται στα εξής:

1. Στις 3',4' υδροξυλομάδες σε θέση *όρθο* μεταξύ τους, στον δακτύλιο B
2. Στις 5, 7 υδροξυλομάδες σε θέση *μέτα* μεταξύ τους, στον δακτύλιο A
3. Στον 2,3 διπλό δεσμό, σε συνδυασμό με την 4-κετομάδα, την 3-υδροξυλομάδα του δακτυλίου C και την *ο*-διϋδρόξυ ομάδα του δακτυλίου B.
4. Στις θέσεις συμπλοκοποίησης ιόντων μετάλλων που είναι οι 3',4'-διϋδρόξυ στον δακτύλιο B, οι 4-κέτο και 3-υδρόξυ στον δακτύλιο C ή οι 4-κέτο και 5-υδρόξυ θέσεις (Εικόνα 4.1.) (Rice-Evansetal., 1997).



**Εικόνα 4.1.** Θέσεις συμπλοκοποίησης ιόντων μετάλλων στα φλαβονοειδή

Σε σύγκριση πάντως με την υδροξυλίωση του δακτυλίου B, η επίδραση της διαμόρφωσης του δακτυλίου A στην αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να είναι αμφισβητούμενης σημασίας. Ο κλειστός δακτύλιος C δεν αποτελεί προϋπόθεση για την αντιοξειδωτική ικανότητα, δεδομένου ότι οι χαλκόνες, στις οποίες ο δακτύλιος C είναι ανοικτός, διατηρούν την δραστηριότητά τους.

Η δέσμευση των ελευθέρων ριζών από τα φλαβονοειδή εξαρτάται κατά πολύ από την παρουσία της 3-υδροξυλομάδας. Η κερκετίνη παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την λουτεολίνη, πράγμα που αποδίδεται στην ύπαρξη του 3-OH στο μόριο της κερκετίνης. Υποκατάσταση του 3-OH από μια μεθοξυ-ομάδα εξαλείφει την δραστηριότητα της κερκετίνης και της καμφερόλης (BurdaandOleszek, 2001). Γενικά, η μεθυλίωση και άλλων υδροξυλομάδων μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η γλυκοζυλίωση επίσης μειώνει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και τα καθιστά περισσότερο υδατοδιαλυτά (Heimetal., 2002).

Η παρουσία ενώσεων με αντιοξειδωτική ικανότητα επηρεάζει και καθορίζει τη διάρκεια ζωής, τη θρεπτική αξία και την ποιότητα των τροφίμων καθώς επιβραδύνει την υποβάθμισή τους λόγω οξείδωσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης φρεσκότητας και προέλευσης (Carocho and Ferreira 2013; Camilo and Denicol 2013).

Για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φυσικών προϊόντων σήμερα χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες (Christodouleasetal., 2015):

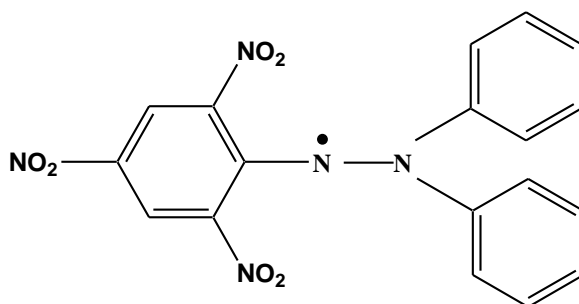
(i) σε εκείνες που βασίζονται στην εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ριζών των δειγμάτων (radical scavenging activity: RSA). Σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται οι μέθοδοι: DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλίο), η δοκιμασία ABTS (2,2'-αζινοδις (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος)), η δοκιμασία απορρόφησης ριζών οξυγόνου (oxygen radical absorbance capacity: ORAC), δοκιμασίες χημειοφωταύγειας και ii) σε εκείνες που βασίζονται στην εκτίμηση της αναγωγικής δραστηριότητας των δειγμάτων: δοκιμασία αναγωγής σιδήρου/αντιοξειδωτική δύναμη (δοκιμή FRAR), δοκιμασία μείωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (CUPRAC).

### 3.2 Μέθοδος δέσμευσης ελευθέρων ριζών με χρήση της ρίζας DPPH

Η μέθοδος DPPH αποτελεί μια από τις σημαντικότερες φασματοφωμετρικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της ικανότητας αντιοξειδωτικών συστατικών να δρουν ως δότες ατόμων υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Blois στα μέσα της δεκαετίας του '50.

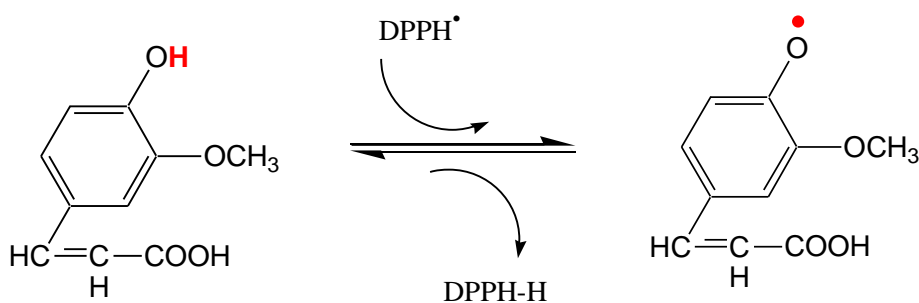
Είναι μια τεχνική απλή στην εφαρμογή της, γρήγορη και με χαμηλό κόστος. Χρησιμοποιείται σε στερεά ή υγρά δείγματα και προσδιορίζει τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος και όχι αυτήν των επιμέρους συστατικών του.

Η ρίζα DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) που χρησιμοποιείται, είναι ένα σταθερό μόριο με απεντοπισμένο το ελεύθερο ηλεκτρόνιό του (Εικόνα 4.2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην διμερίζεται, όπως συμβαίνει με άλλες ρίζες. Στον απεντοπισμό οφείλεται και το βαθύ ιώδες χρώμα των μεθανολικών διαλυμάτων της στα 517 nm.



**Εικόνα 4.2.** Η δομή της ρίζας DPPH·.

Όταν η ρίζα *DPPH* αντιδράσει με μια αντιοξειδωτική ένωση-δότη υδρογόνου (*AH*), παράγεται η ανηγμένη μορφή της ρίζας (*DPPH-H*) και μια νέα ελεύθερη ρίζα *A·*, με ταυτόχρονη μείωση της απορρόφησης. Η προκύπτουσα ρίζα *A·* είναι λιγότερο ενεργή και υπό αυτήν τη μορφή μπορεί να αναγεννηθεί και να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση (Natella *et al.*, 1999). Στο Εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η αντίδραση μεταξύ ενός αντιοξειδωτικού μορίου *AH* (φερουλικό οξύ) και μιας ρίζας *DPPH·*.



**Εικόνα 4.3.** Ο μηχανισμός δράσης μεταξύ του φερουλικού οξέος και της *DPPH·*.

Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας *DPPH·* υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 4.1:

$$\% \text{ Δέσμευσης της } DPPH = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Όπου:

$A_{\text{blank}}$  είναι η απορρόφηση του λευκού διαλύματος *DPPH·* στα 517 nm.

$A_{\text{sample}}$  είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm.



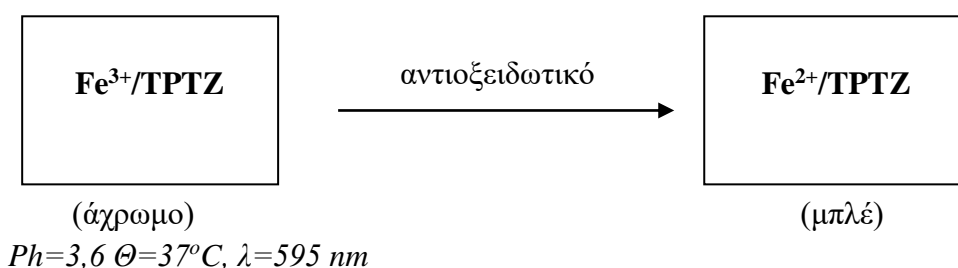
Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται συνήθως με το συντελεστή IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration) και αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση εκείνη του εκχυλίσματος, η οποία μειώνει την αρχική απορρόφηση του μεθανολικού διαλύματος DPPH· κατά 50 %.

Μελετώντας προσεχτικά την κινητική της αντίδρασης των αντιοξειδωτικών με τη ρίζα DPPH, βρέθηκε ότι μερικά από αυτά αντιδρούν πολύ γρήγορα με την DPPH, μειώνοντας τον αριθμό των μορίων της ρίζας αναλογικά με τις διαθέσιμες υδροξυλομάδες τους. Για την πλειοψηφία των αντιοξειδωτικών όμως, η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν αργή και ο μηχανισμός φαίνεται να είναι πιο περίπλοκος.

### 3.3 Δοκιμασία αναγωγής σιδήρου -FRAP assay (Ferric Anion Reducing Antioxidant Power)

Η μέθοδος σχεδιάστηκε το 1996 από τους Benzie and Strain με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ωστόσο σήμερα είναι αρκετά διαδεδομένη όχι μόνο για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) σε βιολογικά υγρά in vivo, αλλά και για τη μέτρηση της TAC in vitro σε φυτικά υλικά και σε τρόφιμα.

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην ικανότητα που έχει μια αντιοξειδωτική ουσία (φαινολικό συστατικό) να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο (Fe<sup>3+</sup>) σε δισθενή (Fe<sup>2+</sup>). Όταν αυτό πραγματοποιηθεί παρουσία τριαζίνης (2,4,6-tripyridyl - s- triazine, TPTZ), η αναγωγή συνοδεύεται από τη δημιουργία ενός έγχρωμου συμπλόκου (Fe<sup>2+</sup> / TPTZ), το οποίο προκαλεί αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm (Εικόνα 4.4).



**Εικόνα 4.4:** Μηχανισμός και συνθήκες της μεθόδου FRAP

Μεγαλύτερη απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος υποδηλώνει υψηλή αναγωγική ικανότητα του δείγματος και κατά συνέπεια υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα συνήθως εκφράζονται σε ισοδύναμα (Fe<sup>2+</sup>), αλλά μπορούν να εκφραστούν και σε ισοδύναμα γαλλικού, καφεϊκού ή ασκορβικού οξέος, ενώ η απορρόφηση μετράται στα 1, 4 και 30 λεπτά.

## 4 Σκοπός και Αντικείμενο της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εδώδιμου μανιταριού *Agrocybeaegerita* μετά από στερεή ζύμωσή του σε διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, στελέχη του μανιταριού *Agrocybeaegerita* θα υποβληθούν σε ζύμωση στερεάς κατάστασης σε υποστρώματα αχύρου και φασολιούκατά τη διάρκεια της οποίας θα συλλεχθούν τα αντίστοιχα καρποσώματα. Μετά την απομόνωση των φαινολικών συστατικών των καρποσωμάτων με εκχύλιση, θα προσδιορισθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων. Τα δεδομένα που θα προκύψουν θα συσχετισθούν με τα στελέχη και τις συνθήκες ανάπτυξης.

## 5 Πειραματικό Μέρος

### 5.1 Γενική παρουσίαση

Στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) πραγματοποιήθηκαν οι στερεές ζυμώσεις τριών στελεχών του μακρομύκητα *Agrocybe aegerita*, όπου πραγματοποιήθηκαν:

- Η μέτρηση της γραμμικής ταχύτητας αύξησης του μυκηλίου σε σωλήνες με υπόστρωμα άχυρο και φασόλι
- Ο προσδιορισμός του χρόνου επώασης και καρποφορίας τωνμανιταριών
- Ο προσδιορισμός του αριθμού, του βάρους των καρποφοριών και της βιολογικής απόδοσης (BA%) της καλλιέργειας

### 5.2 Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 3 στελέχη φαρμακευτικών μυκήτων *Agrocybe aegerita*, 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 5.1

**Πίνακας 5.1.:** Τα είδη μακρομυκήτων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

Συνομοταξία	Είδος μακρομύκητα	AMRL	Προέλευση
Βασιδιομύκητες	<i>Agrocybe aegerita</i>	101	ΑΥΤΟΦΥΕΣ ΚΙΝΑ
	<i>Agrocybe aegerita</i>	103	ΑΥΤΟΦΥΕΣ, ΕΛΛΑΔΑ
	<i>Agrocybe aegerita</i>	104	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΓΑΛΛΙΑ

Όλες οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών αυτών αναπτύχθηκαν σε PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt, Germany), έπειτα από επώαση 7-10 ημερών στους 26 °C.

**Πίνακας 5.2.:** Σύνθεση θρεπτικού μέσου καλλιέργειας μυκήτων *Agrocybespp.* 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%	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.

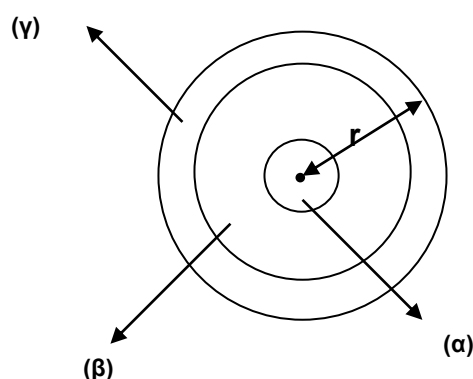
### 5.3 Παρασκευή υποστρωμάτων

Για τις καλλιέργειες των μυκήτων *Agrocybe* spp. σε ζύμωση στερεής κατάστασης, χρησιμοποιήθηκαν δυο λιγνοκυτταρινούχα υλικά: άχυρο σίτου (*Triticum aestivum*, wheatstraw - A) και υπολείμματα καλλιέργειας φασολιού (*Phaseolus vulgaris*, bean plant residues - Φ) που παρασκευάστηκαν σε αναλογία 80% γεωργικά υπολείμματα και 20% προσθετικά (12% πίτυρο σίτου, 7% σογιάλευρο, 1% CaCO<sub>3</sub> κ.β.) (Philippoussis et al., 2007). Ο τελικός λόγος C:N του υποστρώματος άχυρου διαμορφώθηκε στο 40 και του φασολιού στο 20.

Για την προετοιμασία των υποστρωμάτων, τα αγροτικά υπολείμματα, προ της ανάμιξης με προσθετικά, εμβαπτίστηκαν σε νερό για 3 ώρες και στη συνέχεια παρέμειναν για στράγγιση περίπου 4 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι σωλήνες 200x28mm, οι οποίοι πληρώθηκαν έως όγκου 80 ml (20 επαναλήψεις/υπόστρωμα/στέλεχος) και ακολούθησε αποστείρωσή στους 121 °C για 1,5 ώρες. Η υγρασία μετά το τέλος της αποστείρωσης ήταν 74,88 % για το A, 71,34 % για το Φ, ενώ το pH των υποστρωμάτων ήταν A: 5,45 και Φ: 5,55.

### 5.4 Προσδιορισμός της ταχύτητας του μυκηλίου και παραγωγή καρποσωμάτων

Μετά την αποστείρωσή των υποστρωμάτων ακολούθησε εμβολιασμός τους με δύο ροδέλες μυκηλίου 6 mm για κάθε μύκητα (από ανανεωμένη καλλιέργεια σε PDA) στο κέντρο της επιφάνειας των υποστρωμάτων. Στη συνέχεια οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και σχετικής υγρασίας 95%. Μετά την πάροδο οκτώ ημερών περίπου από την εμφάνιση του μυκηλίου, άρχισε η μέτρηση της αύξησής του (το μέτωπο της αποικίας είχε αύξηση μεγαλύτερη από 20 mm) έως τον ολικό αποικισμό του υποστρώματος από το μυκήλιο των μυκήτων. Η ταχύτητα αύξησης Kr (mm/ημ) υπολογίστηκε από τον μέσο όρο μετρήσεων σε 4 εκδιαμέτρου αντίθετες θέσεις κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα των σωλήνων, βάσει του τύπου  $r = r_0 + Kr \cdot t$ , όπου  $r_0$  και  $r$  είναι η ακτίνα της αποικίας σε χρόνους 0 και  $t$  αντίστοιχα.



**Εικόνα 5.1.:** Τυπική απεικόνιση της ζώνης αύξησης μυκηλιακής αποικίας, (α) περιοχή που αυτολύεται βαθμιαία, (β) τμήμα που δεν συμμετέχει ή συμμετέχει ελάχιστα στην αύξηση και (γ) περιφερειακή ζώνη όπου η μυκηλιακή μάζα αυξάνει εκθετικά,  $r$  = ακτίνα αποικίας.

Ακολούθησε μεταφορά των σωλήνων σε θάλαμο καρποφορίας για την επαγωγή καρποφοριών. Στο θάλαμο η θερμοκρασία ήταν  $17 \pm 1$  °C, η υγρασία 85%, με υδρονέφωση διάρκειας 1-3 min, 2 φορές ημερησίως ενώ υπήρχε και φωτισμός με λάμπες φθορισμού έντασης 350 lux. Η περίοδος καρποφορίας διήρκεσε έως 40 ημέρες, στο τέλος των οποίων καταγράφηκε το pH, ο

χρόνος (ημέρες) που απαιτήθηκε για επώαση και καρποφορία (πρωιμότητα) και το ποσοστό των επαναλήψεων (σωλήνων) που έδωσαν καρποσώματα.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της καρποφορίας καταγράφονταν ο αριθμός και το βάρος των παραγόμενων καρποφοριών (ζυγός δύο δεκαδικών ψηφίων, Bell Engineering, Italy) για τα δύο πρώτα κύματα παραγωγής μανιταριών και στο τέλος προσδιορίστηκε η βιολογική αποδοτικότητα (BA%) της καλλιέργειας, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$BA\% = \frac{\text{ΣυνολικόΝωπόΒάροςΚαρποφοριών}}{\text{ΞηρόΒάροςΥποστρώματος}} \times 100$$

$$\text{Μεσο Βάρος Καρποφοριών (g)} = \frac{\text{ΣυνολικόΒάροςΚαρποφοριών (g)}}{\text{Αριθμόκαρποφοριών}}$$

Στη συνέχεια, οι καρποφορίες των μανιταριών *Agrocybe* μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια, ζυγίστηκαν (ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (KernAGB, Darmstadt, Germany) και καταψύχθηκαν (-20 °C) προκειμένου να λυοφυλιοποιηθούν.

## 5.5 Προσδιορισμός pH

Ο προσδιορισμός του pH έγινε με τη συσκευή Jenway 3020 pH meter (Essex, UK).

## 5.6 Λυοφυλίωση και λειοτρίβηση καρποσωμάτων

Η ξήρανση με λυοφυλίωση επιλέχθηκε με γνώμονα τη διατήρηση της ποιότητας των μανιταριών, διότι με τη μέθοδο αυτή δεν υποβαθμίζεται η μυκηλιακή μάζα από την επίδραση της θερμότητας και διατηρούνται έτσι οι φυσικοχημικές ιδιότητες, το άρωμα, η γεύση, το χρώμα και η θρεπτική αξία των μανιταριών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο λυοφυλιοποιητής (HetoLyoLab 3000, Heto-Holten Als, Denmark). Μετά την λυοφυλίωση 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 αναλυτικό ζυγό.

## 5.7 Απομόνωση φαινολικών συστατικών

Αρχικά ζυγίζεται 0,1 g αλεσμένου λυοφυλιωμένου μανιταριού σε γυάλινο κωνικό σωλήνα (15 mL) με βιδωτό πώμα και προστίθενται 5 mL μεθανόλη. Ο σωλήνας πωματίζεται και τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (λειτουργία sweep) για 10 min. Η μεθανολική φάση διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm/min για 10 min και στη συνέχεια συλλέγεται αφού διηθηθεί σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τα διηθήματα συλλέγονται στην ίδια φιάλη. Ακολουθεί εξάτμιση της μεθανόλης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού στους 40°C. Το στερεό εκχύλισμα που απομένει στη φιάλη ζυγίζεται, επαναδιαλύεται σε 1 mL μεθανόλη, και φυλάσσεται στους -20°C μέχρι πέρασ των αναλύσεων.

## 5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

### 5.8.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος

Παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 2 g/L σε μεθανόλη, σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Από το μητρικό διάλυμα, παρασκευάζεται διάλυμα εργασίας

γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 0,5 g/L σε μεθανόλη. Από το διάλυμα εργασίας παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης βαθμονόμησης με μεταφορά σε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες 1, 2, 4, 6 και 7 mL και σε κάθε περίπτωση προστίθεται μεθανόλη, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 mL. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων αντιστοιχούν σε 50, 100, 200, 300 και 350 mg/L.

### 5.8.2 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού κλάσματος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Σε erpendorf προστίθενται 25 μL εκχυλίσματος μανιταριού ή πρότυπου διαλύματος, 775 μL απιονισμένου νερού και 50 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Το περιεχόμενο αναδεύεται σε κυκλοαναμικτήρα και μετά από 1 min προστίθενται 150 μL διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 % w/v. Το περιεχόμενο αναδεύεται σε κυκλοαναμικτήρα και αφήνονται στο σκοτάδι για 2 ώρες για την ανάπτυξη του χρώματος. Στη συνέχεια, μετρείται η απορρόφηση στα 750 nm σε φασματοφωτόμετρο UV/Vis διπλής δέσμης (JascoV-530). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται τυφλό το οποίο παρασκευάζεται όπως περιγράφηκε ανωτέρω χρησιμοποιώντας μεθανόλη αντί για εκχύλισμα. Σε κάθε δείγμα, η αναλυτική πορεία ακολουθείται δύο φορές και ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο μανιταριού.

Από τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD%, n=6), φαίνεται ότι η μέθοδος είναι επαναλήψιμη.

<b>Μέση τιμή</b>	2365μg GA eq/g mushroom
<b>Τυπική απόκλιση</b>	140μg GA eq/g mushroom
<b>RSD%</b>	6%

### 5.9 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Παρασκευάζεται μεθανολικό διάλυμα DPPH 100 μM και έπειτα 875 μL αυτού του αντιδραστηρίου αναμιγνύονται με 125 μL εκχυλίσματος σε Eppendorf, το περιεχόμενο αναδεύεται σε κυκλοαναμικτήρα και αφήνονται στο σκοτάδι για 30 min. Στη συνέχεια, μετρείται η απορρόφηση στα 515 nm σε φασματοφωτόμετρο UV/Vis (JascoV-530). Παράλληλα, μετρείται η απορρόφηση του διαλύματος ελέγχου (875 μLDPPH 100 μM + 125 μL μεθανόλη). Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται μεθανόλη. Παράλληλα με τον προσδιορισμό των δειγμάτων, εφαρμόζεται η ίδια πορεία σε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 5, 10, 15, 20 και 25 mg/L. Η ανάλυση εκτελείται εις διπλούν. Το ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ Δέσμευση DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Όπου:

$A_{\text{control}}$  η απορρόφηση του διαλύματος ελέγχου στα 515 nm.

$A_{\text{sample}}$  η απορρόφηση του δείγματος στα 515 nm.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης (% Δέσμευση DPPH συναρτήσεως συγκέντρωσης γαλλικού οξέος) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο μανιταριού.

Από τη σχετική τυπική απόκλιση(RSD%, n=6) φαίνεται ότι η μέθοδος είναι επαναλήψιμη.

<b>Μέση τιμή</b>	477 µg GA eq/g mushroom
<b>Τυπική απόκλιση</b>	31 µg GA eq/g mushroom
<b>RSD%</b>	6,5%

### 5.10 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP

Αρχικά παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  0,3M με pH 3,6
- Διάλυμα HCl 40 mM
- Διάλυμα τριπυριδυλ-τριαζίνης (TPTZ, 2,4,6-Tri(2-pirydil)-s-triazine, Fluka, Buchs, Switzerland) 10 mM σε 40 mM HCl στους 50°C
- Διάλυμα  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM  
(τα δύο τελευταία παρασκευάζονται την ημέρα της ανάλυσης)  
Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα FRAP, ως εξής: 10:1:1 ρυθμιστικό διάλυμα/TPTZ/ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 100 µL εκχύλισμα μανιταριού, 900 µL  $\text{H}_2\text{O}$  και 2 mL αντιδραστηρίου FRAP. Στη συνέχεια, οι σωλήνες αναδεύονται σε κυκλοαναμικήρα και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μετά την πάροδο 30 min, γίνεται μεταφορά σε κυβέτα και μετρείται η απορρόφηση στα 593 nm. Επιπλέον, παρασκευάζεται και τυφλό (blank) το οποίο περιέχει 2ml FRAP και 1ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Σε κάθε δείγμα, η αναλυτική πορεία ακολουθείται δύο φορές. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης (απορρόφηση στα 593nm συναρτήσεως συγκέντρωσης γαλλικού οξέος) και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε µg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο μανιταριού. Η καμπύλη ήταν γραμμική μεταξύ των 12 και 120 µM γαλλικού οξέος. Από τη σχετική τυπική απόκλιση(RSD%, n=6), φαίνεται ότι η μέθοδος είναι επαναλήψιμη.

<b>Μέση τιμή</b>	1,81 µg GA eq/g mushroom
<b>Τυπική απόκλιση</b>	0,11 µg GA eq/g mushroom
<b>RSD%</b>	5,81%

## 6 Αποτελέσματα

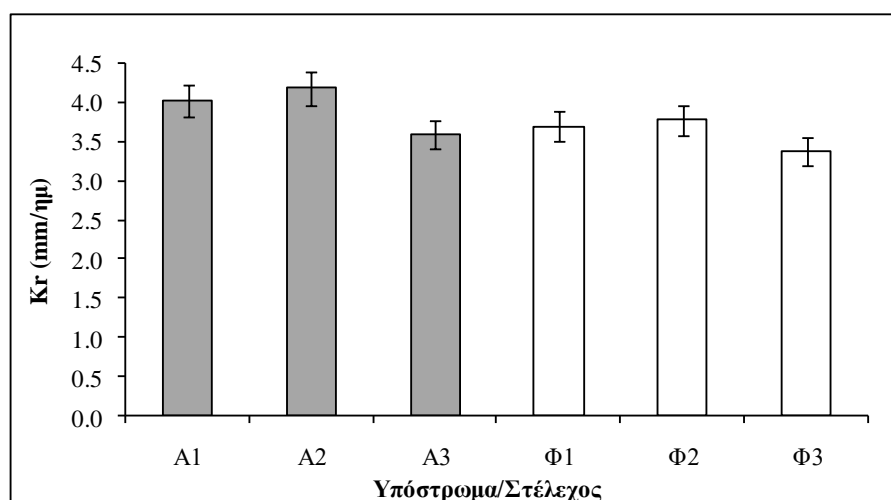
### 6.1 Αξιολόγηση ταχύτητας αύξησης ειδών *Agrocybespp* σε λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα κατά τη ζύμωση γεωργικών υπολειμμάτων σε σωλήνες

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 6.1., το υπόστρωμα του φασολιού ήταν αυτό που ευνόησε περισσότερο την αύξηση του μυκηλίου και των τριών στελεχών του γένους *Agrocybe*, καθώς ο αποικισμός του ολοκληρώθηκε γρηγορότερα (39 ημέρες) σε σχέση με αυτό του άχυρου (35 ημέρες).

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο χρόνο ολοκλήρωσης του αποικισμού σε ό,τι αφορά τα στελέχη του μακρομύκητα και στα δύο υποστρώματα. Τέλος, το pH στο τέλος της καλλιέργειας ήταν σχεδόν ουδέτερο, πιστοποιώντας την καλή πορεία της ζύμωσης των υποστρωμάτων από τα μανιτάρια.

**Πίνακας, Διάγραμμα 6.1:** Χρόνος αποικισμού, ταχύτητα γραμμικής αύξησης (Kr, mm/ημέρα) και pH των στελεχών *A. aegerita* AMRL 104, 103 και 101 (1, 2, 3 αντίστοιχα) υποστρώματα άχυρο σίτου (A) και υπολείμματα φασολιού (Φ). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των τιμών 3 επαναλήψεων. T= Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (P=0,05).

Υπόστρωμα	AMRL	Στέλεχος	Χρόνος (ημ)	Kr (mm/ημ)	pH
ΑΧΥΡΟ	104	A1	35	4.0	6.73
	103	A2	35	4.2	6.90
	101	A3	35	3.6	6.81
ΦΑΣΟΛΙ	104	Φ1	39	3.7	6.71
	103	Φ2	39	3.8	7.09
	101	Φ3	39	3.4	6.89



Σχετικά με την ταχύτητα γραμμικής αύξησης Kr (Πίνακας, Διάγραμμα 6.1. παίρνοντας υπόψη τις τιμές που καταγράφηκαν και στα τρία στελέχη *Agrocybe* φαίνεται καθαρά ότι το άχυρο ευνόησε την αύξηση του μυκηλίου (Kr: 3,60-4,0 mm/ημέρα) σε σχέση με το φασόλι (Kr: 3,4-3,7 mm/ημέρα), καθώς σε αυτά οι μύκητες είχαν τη μεγαλύτερη ταχύτητα αύξησης, χωρίς ωστόσο να



διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Γρηγορότερα αναδείχθηκαν ωστόσο τα στελέχη 104 και 103 και στα δύο υποστρώματα.

## 6.2 Αξιολόγηση παραγωγής καρποσωμάτων των ειδών *Agrocybespp*

Στον Πίνακα 6.2 δίνονται στοιχεία που αφορούν τις καλλιεργητικές παραμέτρους (χρόνος επώασης, χρόνος από επώαση έως 1<sup>η</sup> συγκομιδή-πρωιμότητα, έναρξη Β΄ κύματος) της στερεής ζύμωσης των μανιταριών *A.aegerita* στα υποστρώματα Άχυρο και Φασόλι.

**Πίνακας 6.2:** Επίδραση του υποστρώματος (άχυρο, φασόλι) και του στελέχους (101, 103, 104) στον χρόνο επώασης και στην πρωιμότητα του μανιταριού *A. aegerita*.

Υποστρ./ στέλεχος	Επώαση (ημ)			Πρωιμότητα/Α΄ κύμα (ημ)			Β΄ κύμα (ημ)		
	101 (3)	103 (2)	104 (1)	101 (3)	103 (2)	104 (1)	101	103	104
Άχυρο	65	57	53	-	65	69	-	86	84
Φασόλι	70	60	42	93	59	65	-	95	89

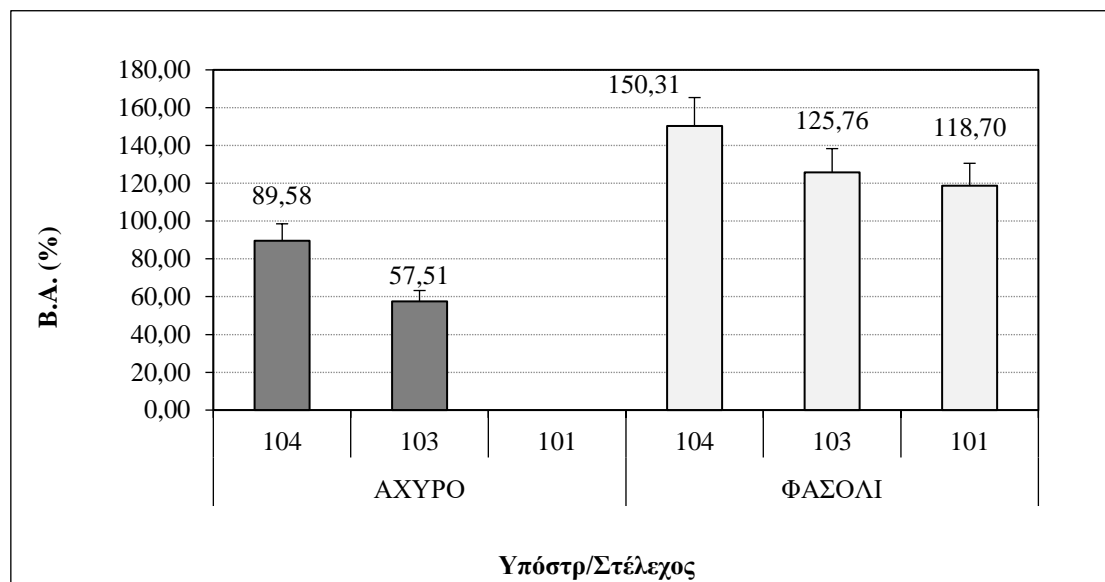
Αρχικά βλέπουμε ότι μανιτάρια *A.aegerita* ολοκλήρωσαν με επιτυχία τις καλλιεργητικές φάσεις της επώασης και της καρποφορίας και στα δυο υποστρώματα, εκτός από το στέλεχος AMRL 103 (1) που δεν έδωσε καταβολές στο υπόστρωμα του άχυρου. Τα στελέχη AMRL 103 και 104 ολοκλήρωσαν την επώαση σε λιγότερο χρόνο (53-57 ημέρες στο άχυρο και 42-60 στο φασόλι) από ό,τι το 101(65-70 ημέρες). Σε ό,τι αφορά την πρωιμότητα, στο φασόλι εμφανίστηκαν οι πρώτες καρποφορίες λίγο νωρίτερα από ό,τι στο άχυρο (59-65 ημέρες), με τα στελέχη 103 και 104 να δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα και το στέλεχος 103 να είναι λίγο γρηγορότερο από το 104. Ακόμα, η παραγωγή Β΄ κύματος μανιταριών πραγματοποιήθηκε μόνο για τα στελέχη 103 και 104, όπου το 104 ήταν γρηγορότερο από το 103 και το άχυρο ευνόησε την παραγωγή τους.

**Πίνακας 6.3.:** Ποσοτικά (αριθμός) και ποιοτικά (υγρασία, μέσο βάρος, υγρασία) χαρακτηριστικά των καρποφοριών κατά την καλλιέργεια τριών στελεχών *A. aegerita* σε υπόστρωμα Άχυρο (Α) και φασόλι (Φ).

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Αριθμός καρποφοριών	Συν. Βάρος καρποφοριών (g)	% Υγρασία νωπών καρποφοριών	Μέσο ν. β καρποφοριών (g)
101	Α	-	-	-	-
	Φ	17	32,86	89,94	1,93
103	Α	23	33,08	86,93	1,27
	Φ	50	98,42	85,87	1,97
104	Α	54	77,29	87,65	1,43
	Φ	53	104,01	87,96	1,96

Ακόμα, σύμφωνα με τον Πίνακα 6.3, το φασόλι ευνόησε την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού μανιταριών και στα τρία στελέχη, ενώ και το μέσο βάρος των καρποφοριών που παράχθηκαν στο φασόλι (~2g) ήταν μεγαλύτερο από ό,τι στο άχυρο, με τα στελέχη 103 και 104 να μην παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Στο άχυρο ωστόσο, καταγράφηκε σημαντικά

μεγαλύτερος αριθμός μανιταριών στο στέλεχος 104, με μικρότερο μέσο βάρος. Τέλος, παρατηρείται ότι η υγρασία των καρποφοριών *Agrocybe* ήταν υψηλή (>86%) και λίγο υψηλότερη στο υπόστρωμα του φασολιού από ό,τι του άχυρου.



**Διάγραμμα 6.2:** Βιολογική αποδοτικότητα (BA%) των στελεχών *A. aegerita* AMRL 104, 103 και 101 (1, 2, 3 αντίστοιχα) κατά την καλλιέργειά τους σε υποστρώματα άχυρο σίτου (Α) και υπολείμματα φασολιού (Φ). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος των τιμών 3 επαναλήψεων. T= Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (P=0,05).

Σε ό,τι αφορά την BA% της καλλιέργειας (Διάγραμμα 6.2), φαίνεται καθαρά ότι στο φασόλι τα στελέχη *Agrocybe* εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη αποδοτικότητα από ό,τι στο άχυρο, με το στέλεχος 104 να έχει την μέγιστη BA%=150,31% και τα 103 και 101 να έπονται χωρίς να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Στο άχυρο, επίσης το στέλεχος 104 είχε υψηλότερη BA% από το 103.

### 6.3 Αξιολόγηση ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικής δράσης των μανιταριών *Agrocybeaegerita*

Στον πίνακα 6.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μεθόδων Folin-Ciocalteu, DPPH και FRAP εκφρασμένα σε μg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά g λυοφιλιωμένου μανιταριού. Στα αποτελέσματα αυτά εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) προκειμένου να εντοπιστούν οι παράγοντες που επιδρούν σημαντικά στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) και την αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH - FRAP).

**Πίνακας 6.4:** Αποτελέσματα των μεθόδων Folin-Ciocalteu, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών

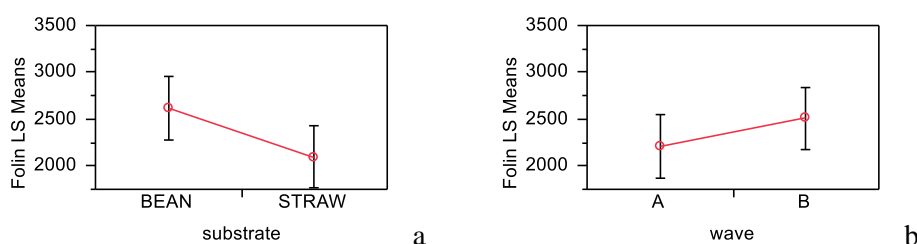
ΚΥΜΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	μg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (± sd)/g ξηρού μανιταριού*					
			FOLIN	DPPH		FRAP		
A	STRAW	104	1844 ± 15	352 ± 23	384 ± 10			
B	STRAW	104	2351 ± 197	528 ± 63	518 ± 57			
A	STRAW	103	1780 ± 153	608 ± 42	533 ± 12			
A	BEAN	104	2563 ± 147	639 ± 39	563 ± 36			
B	BEAN	104	2662 ± 675	700 ± 32	621 ± 18			
A	BEAN	103	1843 ± 150	623 ± 112	603 ± 19			
B	BEAN	103	1915 ± 81	587 ± 96	756 ± 258			
A	BEAN	101	2500 ± 587	663 ± 106	688 ± 108			

\* Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (3 βιολογικές x 2 αναλυτικές επαναλήψεις) σε κάθε συνδυασμό.

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση των παραγόντων «κύμα» και «υπόστρωμα» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *AgrocybeAegerita* 104.

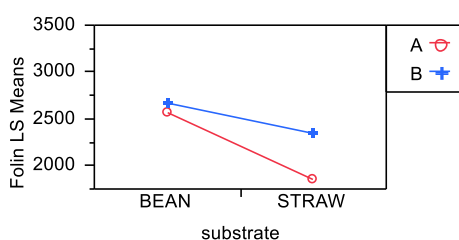
### 6.3.1 Folin - *AgrocybeAegerita* 104

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δίδρομης (two-way) ANOVA, προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «υπόστρωμα» ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0379$ ), ενώ η επίδραση του παράγοντα «κύμα» καθώς και η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,1825$  και  $p=0,3539$ , αντιστοίχως). Το διάγραμμα 6.3 παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για κάθε επίπεδο του παράγοντα (a) «υπόστρωμα» και (b) «κύμα» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε φασόλι (BEAN - 2612 μg/g) βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε άχυρο (STRAW - 2097 μg/g). Επίσης, φαίνεται ότι οι τιμές των φαινολικών συστατικών να αυξάνονται από το A (2203 μg/g) στο B (2506 μg/g) κύμα, ωστόσο η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική (διάγραμμα 6.3b).



**Διάγραμμα 6.3:** Επίδραση του παράγοντα υπόστρωμα (a) και κύμα (b) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *AgrocybeAegerita* 104.

Στο Διάγραμμα 6.4 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «υπόστρωμα». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Φαίνεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, η οποία όμως δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική ( $p=0,3539$ ). Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο και αφορούν το A κύμα καρποφορίας είναι σημαντικά μικρότερο από τα αντίστοιχα των υπόλοιπων συνδυασμών που μελετήθηκαν.



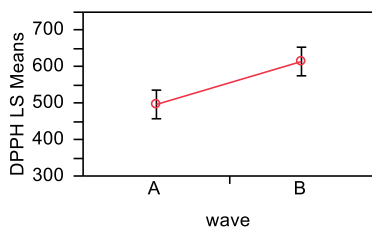
Level	Least Sq Mean
B,BEAN A	2661,6667
A,BEAN A	2563,0000
B,STRAW A B	2350,6667
A,STRAW B	1843,6667

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

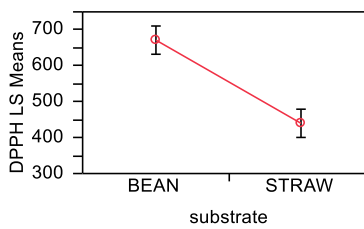
**Διάγραμμα 6.4:** Αλληλεπίδραση κύματος-υποστρώματος βάσει του ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *AgrocybeAegerita* 104.

### 6.3.2 DPPH - *Agrocybeaegerita* 104

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «κύμα» ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0012$ ), η επίδραση του παράγοντα «υπόστρωμα» ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ( $p<0,0001$ ) και η αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0452$ ). Το διάγραμμα 6.5 παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική δραστηριότητα που μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH, για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» (a) και «υπόστρωμα» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.



a



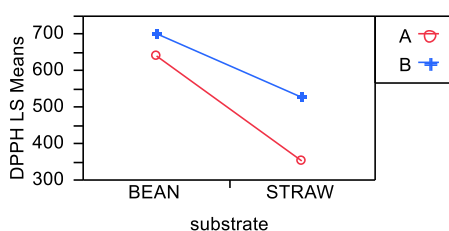
b

**Διάγραμμα 6.5:** Επίδραση του παράγοντα κύμα (a) και υπόστρωμα (b) στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *Agrocybeaegerita* 104.

Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα που μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH σε μανιτάρια του κύματος B βρέθηκε ίση με 614  $\mu\text{g}$  ισοδύναμων γαλλικού οξέος/g μανιταριού και ήταν στατιστικώς μεγαλύτερη από αυτήν του κύματος A, η οποία βρέθηκε 495  $\mu\text{g/g}$ . Ομοίως, η αντιοξειδωτική

δραστηριότητα στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι (670 μg/g) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο (440 μg/g).

Στο διάγραμμα 6.6 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «υπόστρωμα». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι και ήταν και των δύο κυμάτων καρποφορίας είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από των άλλων δύο συνδυασμών που μελετήθηκαν.



Level	Least Sq Mean
B,BEAN A	700,33333
A,BEAN A	638,66667
B,STRAW B	528,00000
A,STRAW C	351,66667

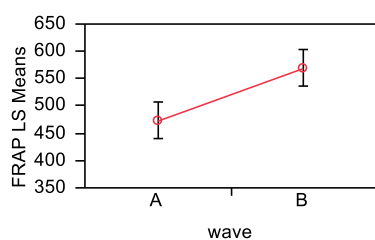
Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.6:** Αλληλεπίδραση κύματος-υποστρώματος βάσει της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *Agrocybeaeagerita*104.

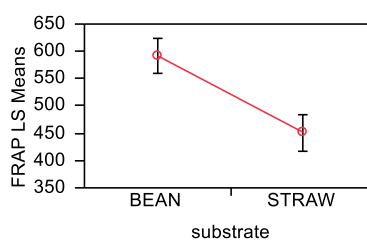
Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0452$ ).

### 6.3.3 FRAP - *Agrocybeaeagerita* 104

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «κύμα» ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0014$ ), η επίδραση του παράγοντα «υπόστρωμα» ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0001$ ), αλλά η αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0975$ ). Το διάγραμμα 6.7 παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική δραστηριότητα που μετρήθηκε με τη μέθοδο FRAP, για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» (a) και «υπόστρωμα» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.



a

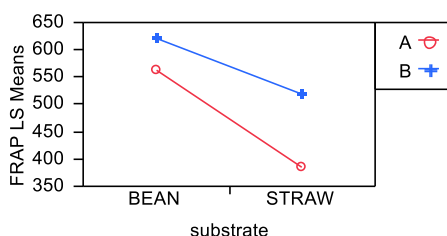


b

**Διάγραμμα 6.7:** επίδραση του παράγοντα «κύμα» (a) και «υπόστρωμα» (b) στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *Agrocybeaeagerita* 104.

Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα σε μανιτάρια του κύματος B βρέθηκε 570 μg/g, και ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν του κύματος A, η οποία βρέθηκε 473μg/g. Επίσης, σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι, βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη (592 μg/g) από ότι στο άχυρο (451 μg/g).

Στο διάγραμμα 6.8εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «υπόστρωμα». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντική. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι-κύμα B, ήταν η υψηλότερη από τους υπόλοιπους συνδυασμούς.



Level	Least Sq Mean
B,BEAN A	621,33333
A,BEAN A B	563,00000
B,STRAW B	518,00000
A,STRAW C	383,66667

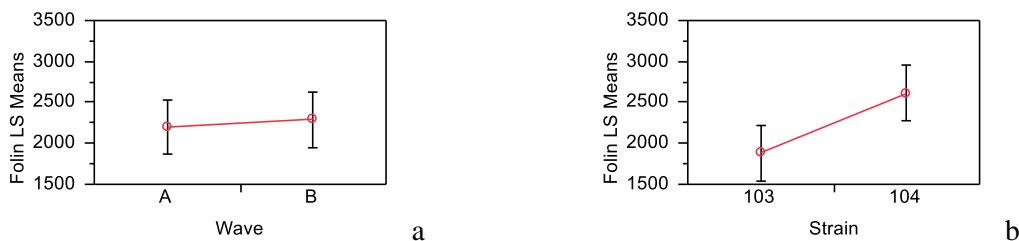
Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.8:** Αλληλεπίδραση κύματος-υποστρώματος βάσει της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους *Agrocybeaeagerita*104.

Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση των παραγόντων «κύμα» και «στέλεχος» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα φασόλι (BEAN).

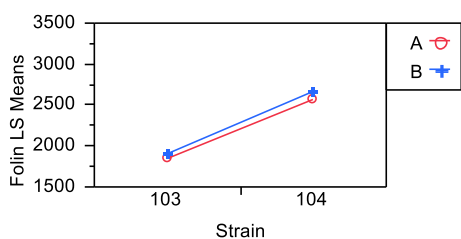
#### 6.3.4 Folin- Φασόλι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0073$ ), ενώ του παράγοντα «κύμα» καθώς και η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,6888$  και  $p=0,9498$ , αντιστοίχως). Το διάγραμμα 6.9 παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» (a) και «στέλεχος» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών του κύματος B (2288 μg/g) δε διαφέρει σημαντικά από το αντίστοιχο των μανιταριών του κύματος A (2202 μg/g). Επίσης φαίνεται ότι οι τιμές των ολικών φαινολικών να αυξάνονται στατιστικώς σημαντικά από το στέλεχος 103 (1879 μg/g) στο στέλεχος 104 (2612 μg/g).



**Διάγραμμα 6.9:** Επίδραση του παράγοντα «κύμα» (a) και «στέλεχος» (b) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

Στο διάγραμμα 6.10 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών του στελέχους 103 και του κύματος A είναι σημαντικά μικρότερο από τα αντίστοιχα των υπόλοιπων συνδυασμών που μελετήθηκαν.



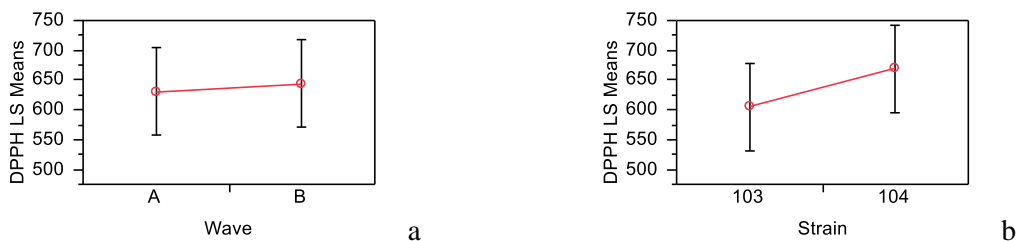
Level				Least Sq Mean
B,104	A			2661,6667
A,104	A	B		2563,0000
B,103		B	C	1914,6667
A,103			C	1842,6667

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.10:** Αλληλεπίδραση κύματος-στελέχους βάσει των ολικών φαινολικών συστατικών (Folin-Ciocalteu) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

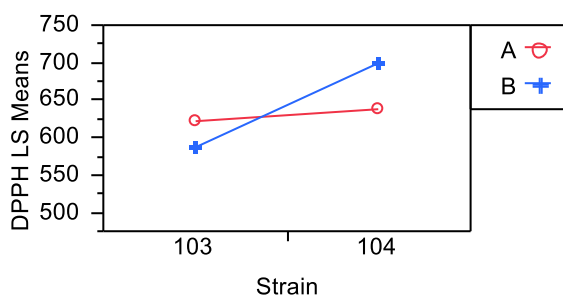
### 6.3.5 DPPH - Φασόλι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση των δύο παραγόντων (κύμα, στέλεχος) καθώς και η αλληλεπίδρασή τους δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ( $p=0,7805$ ,  $p=0,1896$ ,  $p=0,3121$ , αντιστοίχως). Το διάγραμμα 6.11 παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» (a) και «στέλεχος» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών του κύματος A (631  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη του κύματος B (644  $\mu\text{g/g}$ ). Επίσης, φαίνεται ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας να αυξάνονται από το στέλεχος 103 (605  $\mu\text{g/g}$ ) στο στέλεχος 104 (670  $\mu\text{g/g}$ ), ωστόσο αυτή η αύξηση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.



**Διάγραμμα 6.11:** Επίδραση του παράγοντα κύμα (a) και στέλεχος (b) στην αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

Στο διάγραμμα 6.12 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλους τους συνδυασμούς δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Level		Least Sq Mean
B,104	A	700,33333
A,104	A	638,66667
A,103	A	622,66667
B,103	A	587,00000

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

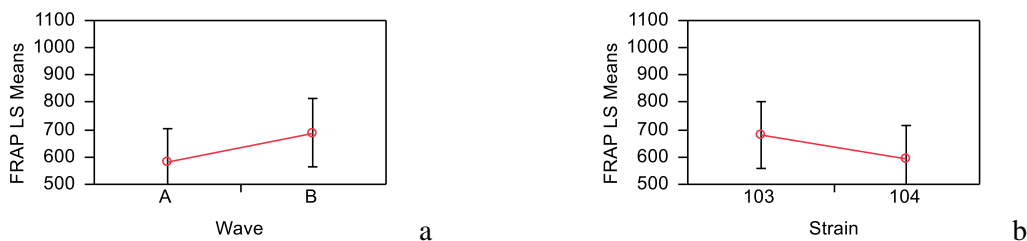
**Διάγραμμα 6.12:** Αλληλεπίδραση κύματος-στελέχους βάσει της αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση διότι οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, ωστόσο δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική.

### 6.3.6 FRAP - Φασόλι

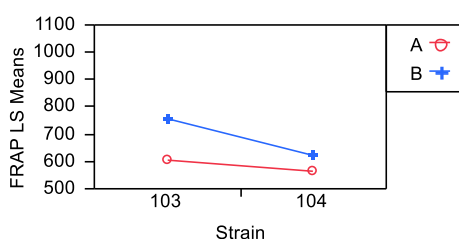
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση των παραγόντων «κύμα», «στέλεχος», καθώς και η αλληλεπίδρασή τους, δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές, με αντίστοιχες πιθανότητες (p) 0,2005, 0,2806 και 0,5501. Το διάγραμμα 6.13, παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική δραστηριότητα σύμφωνα με τη μέθοδο FRAP για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» (a) και «στέλεχος» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών αυξάνεται από το κύμα A (583 μg/g) στο κύμα B (689 μg/g), ωστόσο η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Επίσης, φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών να αυξάνεται από το στέλεχος 104 (592 μg/g) στο στέλεχος 103 (680 μg/g), ωστόσο αυτή η αύξηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική.





**Διάγραμμα 6.13:** επίδραση του παράγοντα κύμα (a) και στέλεχος (b) στην αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

Στο διάγραμμα 6.14 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «κύμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «κύμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα σε όλους τους συνδυασμούς δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Level	Least Sq Mean
B,103 A	756,00000
B,104 A	621,33333
A,103 A	603,33333
A,104 A	563,00000

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.14:** Αλληλεπίδραση κύματος-στελέχους βάσει της αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, γιατί οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, ωστόσο δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

Παρακάτω, εξετάστηκε η επίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα» και «στέλεχος» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών μόνο του κύματος A.

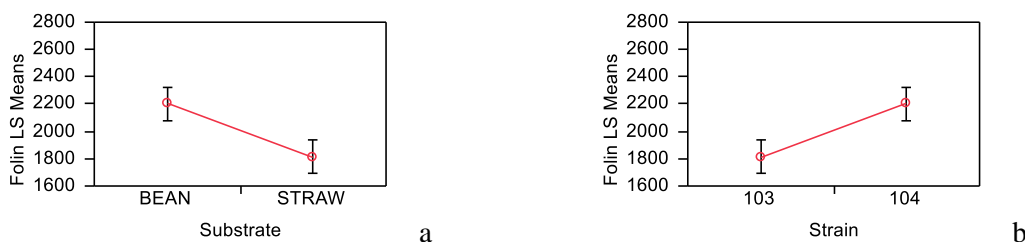
### 6.3.7 Folin - Κύμα A

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «υπόστρωμα» ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0008$ ), η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0008$ ), όπως επίσης και η αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων ( $p=0,0024$ ).

Το διάγραμμα 6.15, παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για κάθε επίπεδο του παράγοντα «υπόστρωμα» (a) και «στέλεχος» (b), καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων

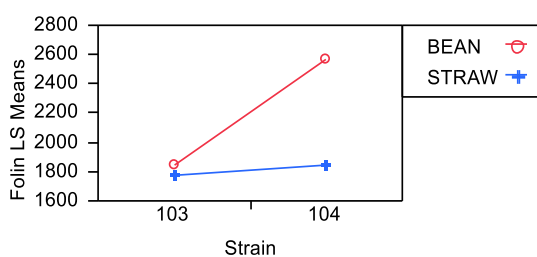
που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε φασόλι (2203 μg/g) βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε άχυρο (1812 μg/g). Επίσης, φαίνεται ότι οι τιμές των φαινολικών συστατικών αυξάνονται από το στέλεχος 103 (1812 μg/g) στο 104 (2203 μg/g), με στατιστικώς σημαντική αύξηση.



**Διάγραμμα 6.15:** Επίδραση του παράγοντα υπόστρωμα (a) και στέλεχος (b) στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A.

Στο διάγραμμα 6.16 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μανιταριών του στελέχους 104 που αναπτύχθηκαν σε φασόλι είναι σημαντικά μεγαλύτερο από τα αντίστοιχα των υπόλοιπων συνδυασμών που μελετήθηκαν.



Level		Least Sq Mean
BEAN,104	A	2563,0000
STRAW,104	B	1843,6667
BEAN,103	B	1842,6667
STRAW,103	B	1780,3333

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.16:** Αλληλεπίδραση στελέχους-υποστρώματος βάσει των ολικών φαινολικών (Folin-Ciocalteu) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A.

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, γιατί οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, η οποία είναι στατιστικώς σημαντική.

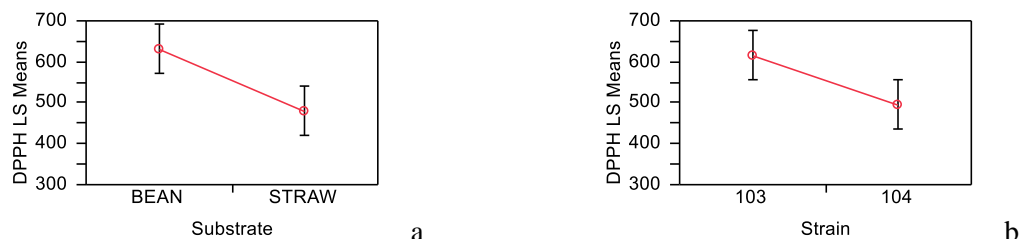
### 6.3.8 DPPH - Κύμα A

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα», «στέλεχος», καθώς και η αλληλεπίδρασή τους, ήταν στατιστικώς σημαντικές, με τις αντίστοιχες πιθανότητες p να είναι 0,0036, 0,0117 και 0,0062.

Το διάγραμμα 6.17, παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα για κάθε επίπεδο του παράγοντα «υπόστρωμα» (a) και «στέλεχος» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που

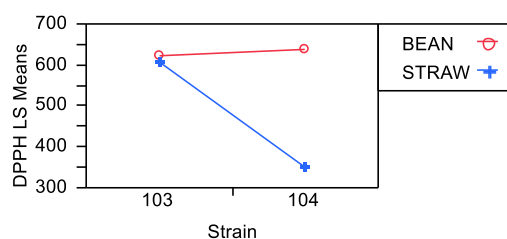
δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι (631 μg/g), είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο (480 μg/g). Επίσης, φαίνεται ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας αυξάνονται από το στέλεχος 104 (495 μg/g) στο στέλεχος 103 (616 μg/g).



**Διάγραμμα 6.17:** Επίδραση του παράγοντα υπόστρωμα (a) και στέλεχος (b) στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A.

Στο διάγραμμα 6.18 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα μανιταριών του στελέχους 104 που αναπτύχθηκαν σε άχυρο ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τις αντίστοιχες των υπόλοιπων συνδυασμών που μελετήθηκαν.



Level		Least Sq Mean
BEAN,104	A	638,66667
BEAN,103	A	622,66667
STRAW,103	A	608,33333
STRAW,104	B	351,66667

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.18:** Αλληλεπίδραση στελέχους-υποστρώματος βάσει της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (DPPH) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A.

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, γιατί οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, η οποία είναι στατιστικώς σημαντική.

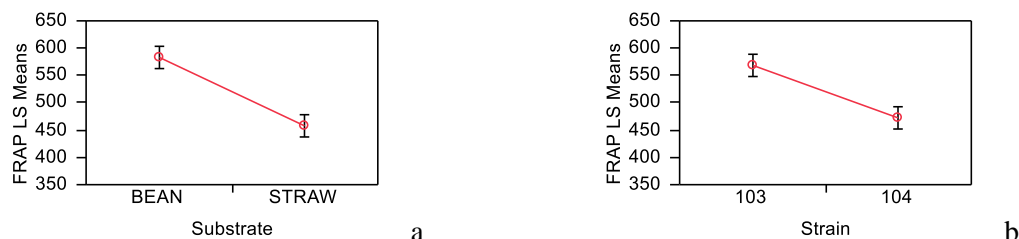
### 6.3.9 FRAP - Κύμα A

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (two-way), προέκυψε ότι η επίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα», «στέλεχος», καθώς και η αλληλεπίδρασή τους, ήταν στατιστικώς σημαντικές, με τις αντίστοιχες πιθανότητες να είναι  $p < 0,0001$ ,  $< 0,0001$  και  $0,0024$ .

Το διάγραμμα 6.19, παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα για κάθε επίπεδο του παράγοντα «υπόστρωμα» (a) και «στέλεχος» (b) καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που

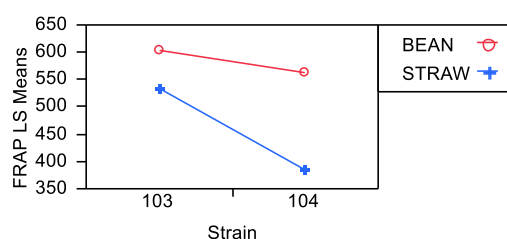
δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε φασόλι (583 μg/g) βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε άχυρο (459 μg/g). Επίσης, φαίνεται ότι οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυξάνονται στατιστικώς σημαντικά από το στέλεχος 104 (473 μg/g) στο 103 (568 μg/g).



**Διάγραμμα 6.19:** Επίδραση του παράγοντα υπόστρωμα (a) και στέλεχος (b) στην αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A.

Στο διάγραμμα 6.20 εξετάζεται η αλληλεπίδραση των παραγόντων «υπόστρωμα» και «στέλεχος». Οι δύο γραμμές αναπαριστούν τα δύο επίπεδα του παράγοντα «στέλεχος». Συνδέουν τις μέσες τιμές ελαχίστων τετραγώνων για τα δύο επίπεδα του παράγοντα «υπόστρωμα». Αν οι δύο παράγοντες δεν αλληλεπιδρούσαν καθόλου, τότε οι γραμμές θα ήταν παράλληλες. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα μανιταριών του στελέχους 104 που αναπτύχθηκαν σε άχυρο είναι σημαντικά μικρότερη από τις αντίστοιχες των υπόλοιπων συνδυασμών που μελετήθηκαν.



Level		Least Sq Mean
BEAN,103	A	603,33333
BEAN,104	A B	563,00000
STRAW,103	B	533,33333
STRAW,104	C	383,66667

Τα επίπεδα παραγόντων που δε συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

**Διάγραμμα 6.20:** Αλληλεπίδραση στελέχους-υποστρώματος βάσει της αντιοξειδωτικής ικανότητας (FRAP) σε εκχυλίσματα μανιταριών του κύματος A..

Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση, γιατί οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, η οποία είναι και στατιστικώς σημαντική.

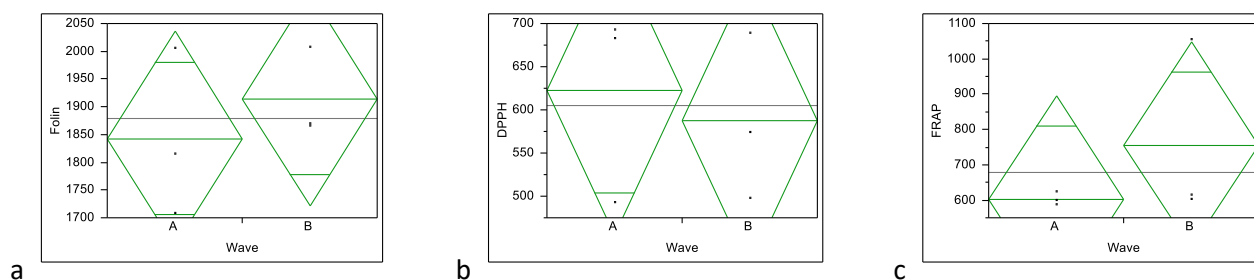
Στις επόμενες περιπτώσεις παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης με μονόδρομη (one-way) ANOVA. Σε διάγραμμα υπάρχει με πράσινες γραμμές γράφημα διαμαντιού, όπου η ενδιάμεση οριζόντια γραμμή αναπαριστά τη μέση τιμή και οι δύο άκρες του αναπαριστούν το άνω και κάτω όριο διαστήματος εμπιστοσύνης 95%. Επίσης, οι κουκίδες αναπαριστούν τις πειραματικές τιμές.

Παρακάτω, εξετάζεται η επίδραση του παράγοντα «κύμα» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους 103 που αναπτύχθηκαν σε φασόλι.

### 6.3.10 Στέλεχος 103 - Φασόλι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (one-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «κύμα» δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,5057$ ). Το διάγραμμα 6.21, παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (a) τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP (c) για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών του κύματος A (1843  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτό του κύματος B (1915  $\mu\text{g/g}$ ). Ομοίως, η αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH, b) των μανιταριών του κύματος A (623  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτήν του κύματος B (587  $\mu\text{g/g}$ ). Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP, c) των μανιταριών του κύματος A (603  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτή του κύματος B (756  $\mu\text{g/g}$ ).



**Διάγραμμα 6.21:** Επίδραση του παράγοντα κύμα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) (a), στην αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και FRAP (c) εκχυλισμάτων μανιταριού του στελέχους *Agrocybeaegerita* 103 που αναπτύχθηκε σε φασόλι.

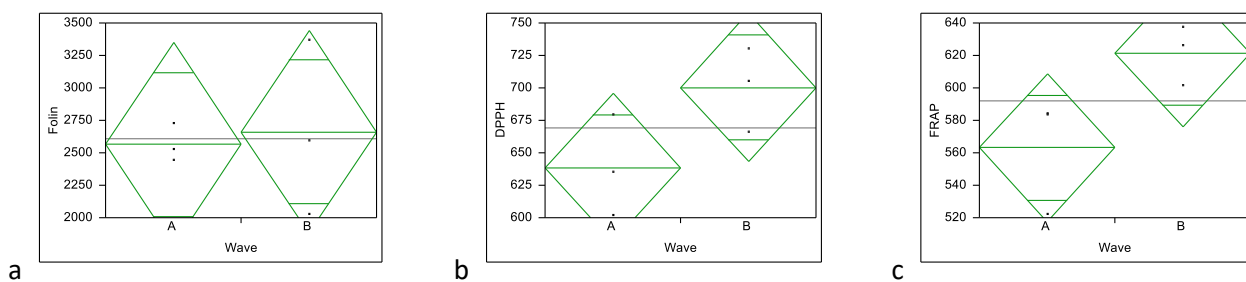
Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση του παράγοντα «κύμα» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι και ήταν του στελέχους 104.

### 6.3.11 Στέλεχος 104 - Φασόλι

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (one-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «κύμα» δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,8168$ ). Το διάγραμμα 6.22, παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (a) τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP (c) για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών του κύματος A (2563  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτό του κύματος B (2662  $\mu\text{g/g}$ ). Ομοίως, η αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH, b) των μανιταριών του κύματος A (639  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτήν του κύματος B (700  $\mu\text{g/g}$ ). Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP, c) των

μανιταριών του κύματος A (563  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από αυτή του κύματος B (621  $\mu\text{g/g}$ ).



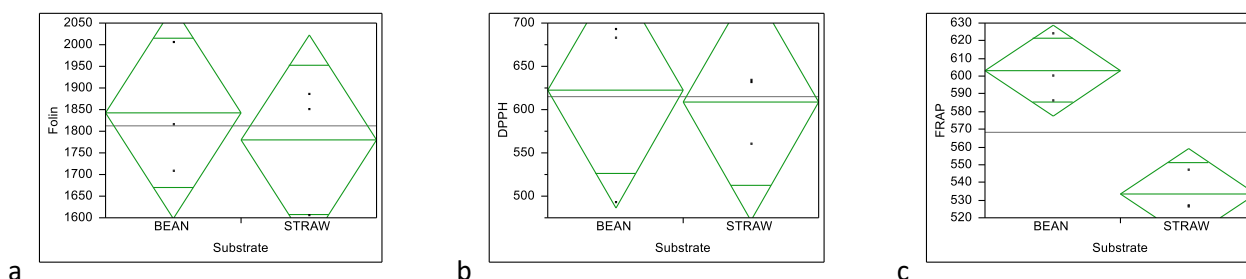
**Διάγραμμα 6.22:** Επίδραση του παράγοντα κύμα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) (a), στην αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και FRAP (c) εκχυλισμάτων μανιταριού του στελέχους *Agrocybaeagerita* 104 που αναπτύχθηκε σε φασόλι.

Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση του παράγοντα «υπόστρωμα» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών του στελέχους 103 και του κύματος A.

### 6.3.12 Στέλεχος 103 – Κύμα A

Το διάγραμμα 6.23 παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (a) τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP (c) για κάθε επίπεδο του παράγοντα «υπόστρωμα» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι (1843  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ( $p=0,6412$ ) από το αντίστοιχο των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο (1780  $\mu\text{g/g}$ ). Ομοίως, η αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH των μανιταριών που καλλιεργήθηκαν σε φασόλι (623  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ( $p=0,8462$ ) από την αντίστοιχη των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο (608  $\mu\text{g/g}$ ). Ωστόσο, η αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε φασόλι (603  $\mu\text{g/g}$ ) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ( $p=0,0058$ ) από την αντίστοιχη των μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο (533  $\mu\text{g/g}$ ).



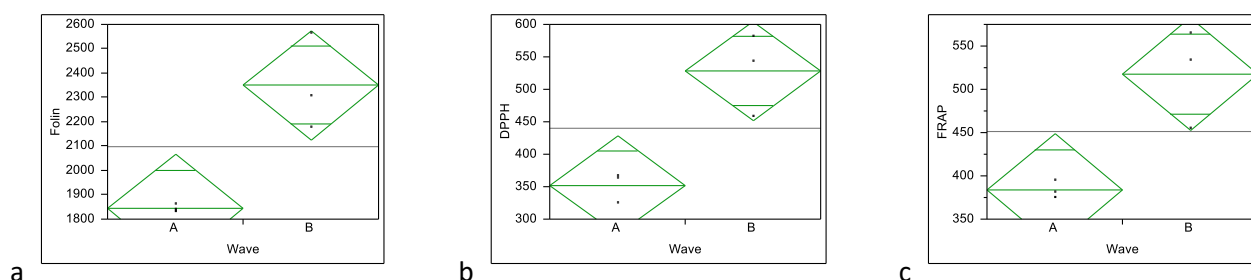
**Διάγραμμα 6.23:** Επίδραση του παράγοντα υπόστρωμα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) (a), στην αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και FRAP (c) εκχυλισμάτων μανιταριού του στελέχους *Agrocybaeagerita* 103 του A κύματος.

Παρακάτω, εξετάζεται η επίδραση του παράγοντα «κύμα» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε εκχυλίσματα μανιταριών που αναπτύχθηκαν σε άχυρο και ήταν του στελέχους 104.

### 6.3.13 Στέλεχος 104 - Άχυρο

Το διάγραμμα 6.24, παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (a) τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP (c) για κάθε επίπεδο του παράγοντα «κύμα» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (a) των μανιταριών του κύματος A (1844  $\mu\text{g/g}$ ) βρέθηκε σημαντικά μικρότερο ( $p=0,0113$ ) από το αντίστοιχο των μανιταριών του κύματος B (2351  $\mu\text{g/g}$ ). Ομοίως, η αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) μανιταριών του κύματος A (352  $\mu\text{g/g}$ ) βρέθηκε σημαντικά μικρότερη ( $p=0,0103$ ) από την αντίστοιχη των μανιταριών του κύματος B (528  $\mu\text{g/g}$ ). Τέλος, η αντιοξειδωτική ικανότητα FRAP (c) των μανιταριών του κύματος A (384  $\mu\text{g/g}$ ) βρέθηκε σημαντικά μικρότερη ( $p=0,0156$ ) από την αντίστοιχη των μανιταριών του κύματος B (518  $\mu\text{g/g}$ ).

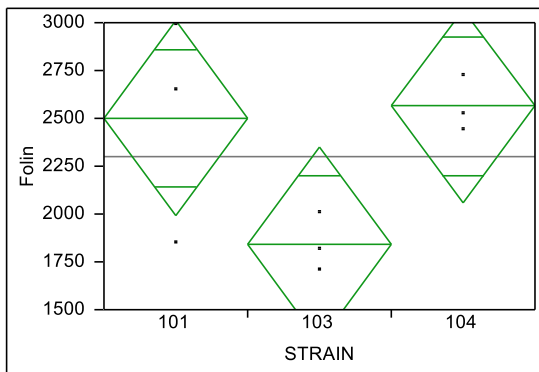


**Διάγραμμα 6.24:** Επίδραση του παράγοντα κύμα στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin) (a), στην αντιοξειδωτική ικανότητα DPPH (b) και FRAP (c) εκχυλισμάτων μανιταριού του στελέχους *Agrocybeaegerita* 104 που αναπτύχθηκαν σε άχυρο.

Παρακάτω εξετάζεται η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» στις μετρήσεις Folin, DPPH και FRAP σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι και ήταν του κύματος A.

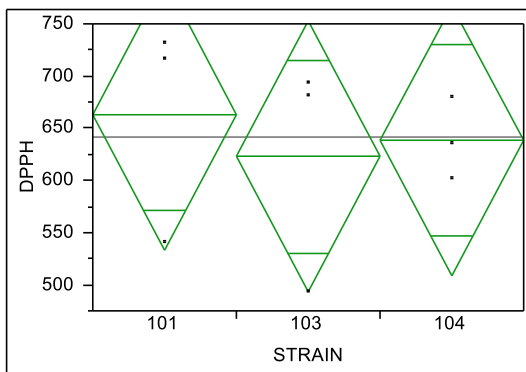
### 6.3.14 Φασόλι – Κύμα A

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (one-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,0904$ ). Το διάγραμμα 6.25 παρουσιάζει το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο για κάθε επίπεδο του παράγοντα «στέλεχος» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μανιταριών του στελέχους 101 (2500  $\mu\text{g/g}$ ), του στελέχους 103 (1843  $\mu\text{g/g}$ ) και του στελέχους 104 (2563  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.



**Διάγραμμα 6.25:** Επίδραση του παράγοντα στέλεχος στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin)

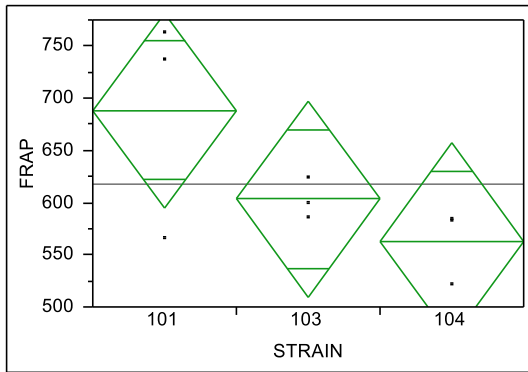
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (one-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,8650$ ). Το διάγραμμα 6.26 παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα για κάθε επίπεδο του παράγοντα «στέλεχος» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα του στελέχους 101 (663  $\mu\text{g/g}$ ), του στελέχους 103 (623  $\mu\text{g/g}$ ) και του στελέχους 104 (639  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.



**Διάγραμμα 6.26:** Επίδραση του παράγοντα στέλεχος στην αντιοξειδωτική ικανότητα (DPPH)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA (one-way), προέκυψε ότι η επίδραση του παράγοντα «στέλεχος» δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ( $p=0,1391$ ). Το διάγραμμα 6.27 παρουσιάζει τη μέση αντιοξειδωτική ικανότητα για κάθε επίπεδο του παράγοντα «στέλεχος» καθώς και τα διαστήματα γύρω από τη μέση τιμή που βασίζονται στη διαδικασία Fischer's least significant difference (LSD). Κάθε ζεύγος διαστημάτων που δεν αλληλεπικαλύπτονται αντιστοιχούν σε ζεύγος μέσων τιμών που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Όπως φαίνεται, η αντιοξειδωτική ικανότητα του στελέχους 101 (688  $\mu\text{g/g}$ ), του στελέχους 103 (603  $\mu\text{g/g}$ ) και του στελέχους 104 (563  $\mu\text{g/g}$ ) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά.

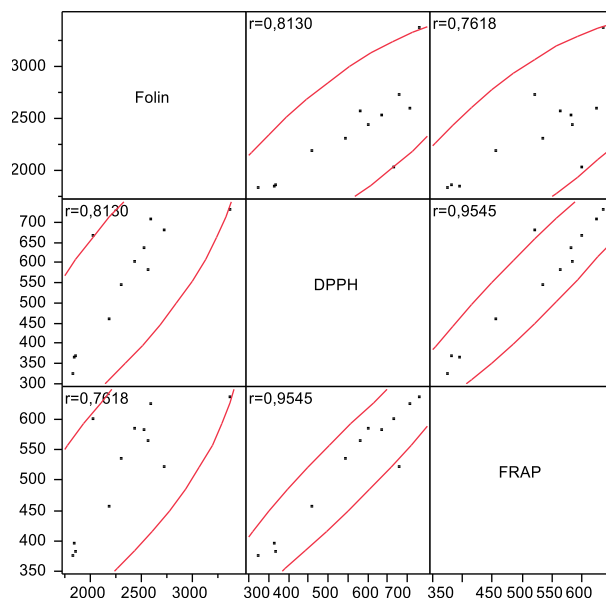




**Διάγραμμα 6.27:** Επίδραση του παράγοντα στέλεχος στην αντιοξειδωτική ικανότητα (FRAP)

### 6.3.15 Συσχέτιση μεθόδων

Εδώ βγαίνουν στατιστικώς σημαντικές όλες οι συσχετίσεις, όπως φαίνεται στην τελευταία στήλη του Pairwise Correlations που είναι το Significant Probability. Όπως φαίνεται στο Pairwise Correlations και στο Scatterplot Matrix, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ DPPH και Folin είναι 0,8130, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ FRAP και Folin είναι 0,7618 και ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ FRAP και DPPH είναι 0,9545. Επίσης, από το Scatterplot Matrix φαίνεται ίδιος ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ δύο μεθόδων είτε η μία βρίσκεται στον άξονα χ και η άλλη στον άξονα ψ, είτε η μία βρίσκεται στον άξονα ψ και η άλλη στον άξονα χ. Τέλος, παρατηρούνται θετικοί συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων, που σημαίνει ότι όταν αυξάνονται οι τιμές της μίας μεθόδου, αυξάνονται και οι τιμές της άλλης.



**Διάγραμμα 6.28:** Συσχέτιση μεθόδων

## 7 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα του χρόνου αποικισμού των υποστρωμάτων αλλά και της ταχύτητας αύξησης των ειδών *Agrocybe* spp. του παρόντος πειράματος υποδεικνύουν ότι το είδος του υποστρώματος, αλλά και το στέλεχος του μύκητα έχουν επίδραση στα χαρακτηριστικά της μυκηλιακής αύξησης (Philippoussis et al., 2001, 2003). Οι παράμετροι αυτοί επηρεάζουν συνήθως την ταχύτητα γραμμικής αύξησης ενός μύκητα και κατά συνέπεια και την επώαση και την διάρκεια του κύκλου καλλιέργειας. Κατά τις μελέτες αύξησης στελεχών των *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *A. aegerita* και *V. volvacea* από τους Philippoussis et al. (2001), επισημαίνονται οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους. Πέρα από τη σύσταση του υποστρώματος και την επίδρασή της στην θρέψη του μύκητα, επίδραση στην ανάπτυξη των μυκήτων *Agrocybe* μπορεί να έχει και η συγκέντρωση του αζώτου (αναλογία C/N) και το πορώδες του υποστρώματος (διαθεσιμότητα σε O<sub>2</sub>), όπως συμβαίνει και σε άλλους ανώτερους μύκητες (Philippoussis et al., 2001, 2002; Royses and Sanchez-Vazquez, 2001). Γενικά, η επιτυχία της καλλιέργειας μανιταριών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον γρήγορο αποικισμό των υποστρωμάτων από το μυκήλιο, καθώς έτσι μειώνεται ο κίνδυνος μόλυνσεων στην αρχή της παραγωγικής διαδικασίας. Όπως για πολλούς άλλους μακρομύκητες, έτσι και στα *Agrocybe* τα πειράματά μας έδειξαν ότι η συγκριτική αξιολόγηση υποστρωμάτων και στελεχών σε γυάλινους σωλήνες, είναι μια πολύ καλή μέθοδος για γρήγορη εκτίμηση της καταλληλότητας των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την χρήση τους ως υποστρώματα στην μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια των μανιταριών (Philippoussis et al., 2001, 2002, 2007).

Τα αποτελέσματα της γραμμικής αύξησης στους σωλήνες έδειξαν ότι το φασόλι και το άχυρο ευνόησαν εξίσου την ανάπτυξη των μυκήτων, δεν έδωσαν όμως ασφαλή αποτελέσματα σε σχέση με την πορεία της καλλιέργειας και την ΒΑ%. Οι παρούσες τιμές της γραμμικής αύξησης ήταν παραπλήσιες με την ταχύτητα αύξησης που καταγράφηκε για τον *A. aegerita* σε παλαιότερα πειράματα στο υπόστρωμα του αχύρου (~4 mm/ημέρα), όπου το άχυρο υπερέτρησε σε σχέση με την αραχίδα και το υπόλειμμα βαμβακιού (Philippoussis et al., 2001). Η γρήγορη επώαση στο άχυρο βέβαια δεν συνοδεύτηκε με γρήγορη καρποφορία και τα στελέχη έδειξαν έντονη διαφοροποίηση στη βλαστική και παραγωγική φάση του μύκητα. Ωστόσο, στη χαμηλότερη περιεκτικότητα του αχύρου σε άζωτο μπορεί να οφείλεται η αδυναμία καρποφορίας του στελέχους 101 και ο μικρότερος αριθμός καρποσωμάτων του στελέχους 103, όπως και το μικρότερο μέσο βάρος των 103 και 104. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και μικρότερη από αυτή του φασολιού (~120-150%), η ΒΑ% στο άχυρο (~60-90 %) ήταν αρκετά υψηλή, υψηλότερη από αυτή αντίστοιχων πειραμάτων (Philippoussis et al., 2001). Η μεγάλη αποδοτικότητα του μανιταριού *Agrocybe* στα υπολείμματα φασολιού ανοίγει τον δρόμο για την αξιοποίηση και άλλων εναλλακτικών υποστρωμάτων, πλην του αχύρου, στην καλλιέργεια του *Agrocybe*. Τέλος, το εμπορικό στέλεχος 104 υπερέτρησε, όπως αναμενόταν, των αυτοφυών στελεχών.

Οι τιμές των ολικών φαινολικών (Folin), φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα ανάπτυξης των μανιταριών, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα Α στο κύμα Β, και από το στέλεχος, αφενός σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι, με αύξηση από το στέλεχος 103 στο 104, αφετέρου σε μανιτάρια του κύματος Α, με αύξηση από το στέλεχος 103 στο 104.

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας DPPH, φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα ανάπτυξης των μανιταριών, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα

καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα Α στο κύμα Β, και από το στέλεχος σε μανιτάρια του κύματος Α, με μείωση από το στέλεχος 103 στο 104.

Οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας FRAP, φάνηκε ότι επηρεάζονται από το υπόστρωμα ανάπτυξης των μανιταριών, με το φασόλι να δίνει υψηλότερες τιμές από το άχυρο, από το κύμα καρποφορίας σε μανιτάρια του στελέχους 104, με αύξηση από το κύμα Α στο κύμα Β, και από το στέλεχος σε μανιτάρια του κύματος Α, με μείωση από το στέλεχος 103 στο 104.

Δεν βρέθηκε στη βιβλιογραφία μελέτη της επίδρασης του κύματος, του υποστρώματος και του στελέχους στα ολικά φαινολικά και στην αντιοξειδωτική ικανότητα μανιταριών.

Στις παρακάτω βιβλιογραφικές αναφορές τα δείγματα ήταν αποξηραμένα και αλεσμένα, όπως και στην παρούσα μελέτη.

Οι Lo, Cheung (2005) μελέτησαν καρποσώματα του μανιταριού *Agrocybe aegeritavar. alba*. Το φαινολικό κλάσμα απομονώθηκε με μεθανόλη και στη συνέχεια επανεκχυλίστηκε με τη χρήση διαφόρων διαλυτών, με περισσότερο αποτελεσματικό τον οξικό αιθυλεστέρα. Το ξηρό μεθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε ολικό φαινολικό περιεχόμενο ίσο με  $15,3 \pm 0,24$  mg/g GAE ενώ το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα  $51,2 \pm 0,38$  mg/g GAE. Το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, η οποία μετρήθηκε με τη μέθοδο DPPH, και βρέθηκε ίση με  $EC_{50} = 1,16$  mg/ml.

Οι Huang et al. (2006) μελέτησαν καρποσώματα, μυκκήλια και υπόστρωμα ανάπτυξης στο μανιτάρι *Agrocybe cylindracea*. Το φαινολικό κλάσμα παραλήφθηκε με εκχύλιση με διαλύτη μεθανόλη. Η ικανότητα απενεργοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH στο 1 mg/ml εκχύλισμα των καρποσωμάτων ήταν 89,0%, στο εκχύλισμα των μυκκηλίων 91,4% και στο υπόστρωμα ήταν 94,9%, στα 10 mg/ml αντίστοιχα. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο βρέθηκε ίσο με  $23,47 \pm 0,30$  mg/g στα καρποσώματα,  $15,55 \pm 0,10$  mg/g στα μυκκήλια και  $17,53 \pm 0,36$  mg/g στο υπόστρωμα.

Οι Tsai et al. (2006) μελέτησαν καρποσώματα, μυκκήλια και υπόστρωμα ανάπτυξης στο μανιτάρι *Agrocybe cylindracea*. Το φαινολικό κλάσμα παραλήφθηκε με εκχύλιση με ζεστό νερό. Η ικανότητα απενεργοποίησης της ελεύθερης ρίζας DPPH από 1-20 mg/ml καρποσωμάτων κυμάνθηκε από 58,3 ως 66,2%, στα μυκκήλια κυμάνθηκε από 47,7 ως 76,1% και στο υπόστρωμα κυμάνθηκε από 53,5 ως 73,5%. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα καρποσώματα βρέθηκε ίση με  $30,16 \pm 0,07$  mg/g, στα μυκκήλια  $27,28 \pm 0,30$  mg/g και στο υπόστρωμα  $23,74 \pm 0,25$  mg/g.

Οι Islam et al. (2016) μελέτησαν πολλά είδη μανιταριών που καταναλώνονται στην Κίνα, μεταξύ αυτών και το *Agrocybe aegerita*. Το φαινολικό κλάσμα παραλήφθηκε με εκχύλιση με ακετόνη/νερό/οξικό οξύ σε αναλογία 70:29,5:0,5. Στο μανιτάρι *Agrocybe aegerita* το ολικό φαινολικό περιεχόμενο βρέθηκε ίσο με  $4,23 \pm 0,12$  mg /g GAE, η αντιοξειδωτική ικανότητα ( $EC_{50}$ ) μετρούμενη με τη μέθοδο DPPH βρέθηκε ίση με  $11,40 \pm 0,04$   $\mu$ moles ισοδύναμων Trolox/g και τιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας μετρούμενη με τη μέθοδο FRAP  $1,1 \pm 0,035$  mmole ισοδύναμων  $Fe^{2+}$  /100g.

Στην παρούσα μελέτη, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) υπολογίστηκε από 1,78 έως 2,662 mg/g GAE, το οποίο είναι το χαμηλότερο από αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Μικρό TPC προσδιορίστηκε και από τους Islam et al. (2016), όπου ο διαλύτης εκχύλισης ήταν μίγμα ακετόνης/νερού/οξικού οξέος σε αναλογία 70:29,5:0,5.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το γεγονός ότι τα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι εμφάνισαν υψηλότερες τιμές ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικήδραστικότητα από αυτά που αναπτύχθηκαν σε άχυρο, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιοσύνθεση φαινολικών ευνοείται σε σχετικά χαμηλό λόγο άνθρακα προς άζωτο, μιας και ο λόγος άνθρακα προς άζωτο στο φασόλι είναι χαμηλότερος από αυτόν στο άχυρο.

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτικήδράση στα δύο κύματα παραγωγής που μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν στατιστικώς σημαντικές, με αύξηση από το κύμα Α στο κύμα Β σε μανιτάρια του στελέχους *Agrocybe aegerita* 104, ενώ δεν ήταν στα μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι η χρονική στιγμή παραγωγήςκαρποσωμάτων από το μυκήλιο είχε σημαντική επίδραση εντός του ίδιου στελέχους, αλλά δεν είχε εντός του ίδιου υποστρώματος.

Όπως αναφέρθηκε στο σχολιασμό, η επίδραση του στελέχους ήταν διαφορετική. Σε ανάλυση two-way ANOVA σε μανιτάρια που αναπτύχθηκαν σε φασόλι, το στέλεχος επέδρασε μόνο στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, με αύξηση από το στέλεχος 103 στο 104, ενώ δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε ανάλυση two-way ANOVA σε μανιτάρια του κύματος Α, υπήρχε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο από το στέλεχος 103 στο 104, αλλά μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Τέλος, σε ανάλυση one-way ANOVA, δε βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών 101, 103 και 104 όταν αναπτύχθηκαν σε φασόλι (κύμα Α). Επιπλέον, ο γονότυπος φαίνεται να επιδρά όχι μόνο στην ποσότητα των φαινολικών συστατικών, αλλά και στο είδος τους το οποίο τους προσδίδει ιδιότητες που εκφράζονται ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

## 8 Βιβλιογραφία

- Akata I., Ergonul B., Kalyoncu F. (2012) Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology* 8, 134-138
- Alam N., Yoon K. N., Lee J. S., Cho H. J., Lee T. S. (2012) Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 111-118
- Alshikh N., de Camargo A. C., Shahidi F. (2015) Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of Functional Foods* 18, 1022-1038
- Aprosoaie A. C., Zavastin D. E., Mihai C-T., Voichita G., Gherghel D., Silion M., Trifan A., Miron A. (2017) Antioxidant and antigenotoxic potential of *Ramaria lagentii* Marr & D. E. Stuntz, a wild edible mushroom collected from Northeast Romania. *Food and Chemical Toxicology* xxx, 1-9
- Arbelaez J. H., Vazquez M., Calderon J. C-. (2017) Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chemistry* 221, 1371-1381
- Bai M-S., Wang C., Zong S-C., Lei M., Gao J-M (2013) Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*. *Food Chemistry* 141, 3424-3427
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., and Boerjan, W., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, (1998), 17, 125-139.
- Beckman, C.H., *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (2000), 57, 101-106.
- Bengoechea, M.L., Sancho, A.I., Bartolome, B., Estrella, I., Gomez-Cordovez, C., and Hernandez, T., *J. Agric. Food Chem.*, (1997), 45, 4071-4075.
- Bennet R.C., and Wallsgrave, R.M., *New Phytol.*, (1994), 127, 617-633.
- Benzie, I. F. F., & 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.
- Bhattacharya M., Srivastav P. P., Mishra H. N. (2014) Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. *The Journal of Supercritical Fluids* 95, 51-59
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.
- Bondia-Pons I., Aura A-M., Vuorela S., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K. (2009) Rye phenolics in nutrition and health. *Journal of Cereal Science* 49, 323-336
- Brahmi F., Mechri B., Dabbou S., Dhibi M., Hammami M. (2012) The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products* 38, 146-152
- Brenes-Balbuena, M., Garcia-Garcia, P., and Garrido-Fernandez, A., *J. Agric. Food Chem.*, (1992), 40, 1192-1196.
- Burda, S., and Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities off flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.
- Cadiz-Gurrea M. D. L. L., Borrás-Linares I., Lozano-Sanchez J., Joven J., Fernandez-Arroyo S., Segura-Carretero A. (2017) Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences* 18
- Camilo LA, Denicol A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 763, 1-10.
- Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51,15-25.

- Chang, S.-T. and Miles, P.G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact* (S.-T. Chang and P.G Miles eds., 2nd edition), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Delmas J., 1989. *Les champignons et leur culture*. La Maison Rustique, Flammarion, Paris.
- Chen G-L. , Zhang X. , Chen S-G. , Han M-D. , Gao Y-Q. (2017) Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. *Journal of Functional Foods* 30, 290-302
- Cheng J. , Yi X. , Wang Y. ,Huang X. , He X. (2017) Phenolics from the roots of hairy fig (*Ficus hirta* Vahl.) exert prominent anti-inflammatory activity. *Journal of Functional Foods* 31, 79-88
- Ching-yu H. (2013) *Evaluation of antioxidant properties of some commercially available culinary and medicinal mushrooms from Taiwan*. Newcastle University
- Christie P.J., Alfenito, M.R., and Walbot, V., *Planta*, (1994), 194, 541–549.
- Christodouleas C. D., Fotakis, Ch., & Nikokavoura, A., Papadopoulos, K., & Calokerinos, C. A. 2015. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Anal. Methods* 8, 1294–1302.
- De Mejia E. G. , Song Y. S. , Heck C. I. , Ramirez-Mares M. V. (2010) Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods* 2, 23-34
- Dulay R. M. R. , Miranda L. A. , Malasaga J. S. , Kalaw S. P. , Reyes R. G. , Hou C. T. (2017) Antioxidant and antibacterial activities of acetonitrile and hexane extracts of *Lentinus tigrinus* and *Pleurotus djamor*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 9, 141-144
- Finimundy T. C. , Gambato G. , Fontana R. , Camassola M. , Salvador M. , Moura S. , Hess J., Henriques J. A. P. , Dillon A. J. P. , Roesch-Ely M. (2013) Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition Research* 33, 76-84
- Folin, O., and Ciocalteu, V., *J. Biol. Chem.*, (1927), 27, 627–650.
- Gambato G. , Todescato K. , Pavao E. M. , Scortegagna A. , Fontana R. C. , Salvador M. , Camassola M. (2016) Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* 207, 46-51
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zemser, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S., and Martin-Belloso, O., (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 952-957.
- Guo T. , Wei L. , Sun J. , Hou C-l. , Fan L. (2011) Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Massee. *Food Chemistry* 127, 1634-1640
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Heleno S. A. , Martins A. , Queiroz M. J. R. P. , Ferreira I. C. F. R. (2015) Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry* 173, 501-513
- Herrero M. , Plaza M. , Cifuentes A. , Ibanez E. (2012) Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Volume 4, 159-180
- Hu H. , Zhang Z. , Lei Z. , Yang Y. , Sugiura N. (2009) Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, 42-48
- Huang S-J. , Tsai S-Y. , Mau J-L. (2006) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT* 39, 378-386
- Islam T. , Yu X. , Xu B. (2016) Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT-Food Science and Technology* 72, 423-431
- Kaewnarin K. , Suwannarach N. , Kumla J. , Lumyong S. (2016) Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hypoglycaemic inhibitory activities. *Journal of Functional Foods* 27, 352-364

- Kalogeropoulos N. , Yanni A. E. , Koutrotsios G. , Aloupi M. (2013) Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece. *Food and Chemical Toxicology* 55, 378-385
- Kim, W. G., Lee, I. K., Kim, J. P., Ryoo, I. J., Koshino, H., and Yoo, I. D. (1997). New indole derivatives with free radical scavenging activity from *Agrocybe cylindracea*. *Journal of Natural Products*, 60, 721–723.
- Koley T. K. , Kaur C. , Nagal S. , Walia S., Jaggi S. , Sarika (2016) Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry* 9, 1044-1052
- Lacombe A. , Wu V. C. H. , Tyler S. , Edwards K. (2010) Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 139, 102-107
- Lau B. F. , Abdullah N. (2017) Bioprospecting of *Lentinus squarrosulus* Mont. , an underutilized wild edible mushroom, as a potential source of functional ingredients: A review. *Trends in Food Science and Technology* 61, 116-131
- Lee Y-L. , Yen M-T. , Mau J-L (2007a) Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus*. *Food Chemistry* 104, 1-9
- Lee Y-L. , Huang G-W. , Liang Z-C. , Mau J-L. (2007b) Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *LWT* 40, 823-833
- Li N. , Ng T. B. , Wong J. H. , Qiao J. X., Zhang Y. N. , Zhou R. , Chen R. R. , Liu F. (2013) Separation and purification of the antioxidant compounds, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid from mushrooms by molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry* 139, 1161-1167
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L., *Plant Cell*, (1993), 5, 171-179.
- Lin D. , Xiao M. , Zhao J. , Li Z. , Xing B. , Li X. , Kong M. , Li L. , Zhang Q. , Liu Y. , Chen H., Qin W. , Wu H., Chen S. (2016) An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* 21
- Lin J-T. , Liu C-W. , Chen Y-C. , Hu C-C. , Juang L-D. , Shiesh C-C. , Yang D-J. (2014) Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT-Food Science and Technology* 55, 374-382
- Lo K. M. , Cheung P. C. K. (2005) Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry* 89, 533-539
- Lou S-N. , Ho C-T. (2017) Phenolic compounds and biological activities of small-size citrus: Kumquat and calamondin. *Journal of Food and Drug Analysis* 25, 162-175
- Lull, C., Wichers, H.J. and Savelkoul, H.F.J. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* 2, 63–80.
- Maga, J.A., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, (1978), 10, 323-372.
- Manohar C. M. , Xue J. , Murayyan A. , Neethirajan S. , Shi J. (2017) Antioxidant activity of polyphenols from Ontario grown onion varieties using pressurized low polarity water technology. *Journal of Functional Foods* 31, 52-62
- Matilla, P., Vaananen, P.-S., Konko, K., Aro, H. and Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6419-6422.
- Mau J-L. , Tsai S-Y. , Tseng Y-H. , Huang S-J. (2005a) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 93, 641-649
- Mau J-L. , Tsai S-Y. , Tseng Y-H. , Huang S-J. (2005b) Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill. *LWT* 38, 589-597

- McKay D. L. , Chen C. -Y. O. , Zampariello C. A. , Blumberg J. B. (2015) Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry* 168, 233-240
- Muddathir A. M. , Yamauchi K. , Batubara I. , Mohieldin E. A. M. , Mitsunaga T. (2017) Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany* 109, 9-15
- Mudric S. Z. , Gasic U. M. , Dramicanin A. M. , Ciric I. Z. , Milojkovic-Opsenica D. M. , Popovic-Dordevic J. B. , Momirovic N. M. , Lj. Tesic Z. (2017) The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika. *Food Chemistry* 217, 705-715
- Nacz M. , Townsend M. , Zadernowski R. , Shahidi F. (2011) Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry* 128, 292-298
- Nacz, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in foods. *Journal of Chromatography A*, J054, 95-111.
- Nakajima V. M. , Macedo G. A. , Macedo J. A. (2014) Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT-Food Science and Technology* 59, 1205-1212
- Natella, F., Nardini, L, Di Felice, M. & Scaccini, C. 1999. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.*, 47,1453-1459.
- Ngai, P.H., Zhao, Z, Ng, T.R. Agrocybin: an antifungal peptide from edible mushroom *A. cylindracea*. *Peptides*. 2005, 26:191–196.
- Nyiredy, S. 2004. Separation strategies of plant constituents-current issues. *Journal of Chromatography B*, 812,35-51
- Ouzouni, P.K., Veltsistas, P.G., Paleologos, E.V. and Riganakos, K.A. (2007). Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 480–486.
- Ozo, O.N., and Caygill, J.C., *J. Sci. Food Agric.*, (1986), 37, 283-289.
- Panthong S. , Boonsathorn N. , Chuchawankul S. (2016) Antioxidant activity, anti-proliferative activity, and amino acid profiles of ethanolic extracts of edible mushrooms. *Genetics and Molecular Research* 15
- Patten G. S. , Abeywardena M. Y. , Sundram K. , Tan Y. A. , Sambanthamurthi R. (2015) Effect of oil palm phenolics on gastrointestinal transit, contractility and motility in the rat. *Journal of Functional Foods* 17, 928-937
- Pelitli E. P. , Janiak M. A. , Amarowicz R. , Alasalvar C. (2017) Protein precipitating capacity and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut phenolic extract and its fractions. *Food Chemistry* 218, 584-590
- Peterson, G.L., *Anal. Biochem.*, (1979), 100, 201-220.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P. and Zervakis, G. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6), 551-557.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Kokkinis, G., Kazoglou, Y. and Parissopoulos, G. (2007). Potential of littoral vegetation residues, from Lake Mikri Prespa , as substrate for mushroom cultivation. *Proceedings of the International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics*. Skiathos, June 24-28, 2007, p: 1663-1669.
- Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Zervakis G. (2002). Monitoring of mycelial growth and fructification of *Lentinula edodes* on several lignocellulosic residues. In: Sanchez, J.E, Huerts, G., Montiel, E. (Eds.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Mexico: 279-287.
- Philippoussis, A., Zervakis, G. and Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17 (2), 191-200.



- Quartacci M. F. , Sgherri C. , Frisenda S. (2017) Biochar amendment affects phenolic composition and antioxidant capacity restoring the nutraceutical value of lettuce grown in a copper-contaminated soil. *Scientia Horticulturae* 215, 9-14
- Racz, L., Papp, L., Prokai, B. and Kovacz, Zs. (1996). Trace element determination in cultivated mushrooms. An investigation of manganese, nickel and cadmium intake in cultivated mushrooms using ICP atomic emission. *Microchemical Journal* 54, 444-451.
- Rathee S. , Rathee D. , Rathee D., Kumar V. , Rathee P. (2012) Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22, 459-474
- Reis F. S. , Barros L. , Calhella R. C. , Ciric A. , van Griensven L. J. L. D. , Sokovic M. , Ferreira I. C. F. R. (2013) The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food and Chemical Toxicology* 62, 91-98
- Reis F. S. , Martins A. , Barros L. , Ferreira I. C. F. R. (2012) Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1201-1207
- Ren, 2014. Anticancer ability of mushroom polysaccharides. Ph.D. thesis. School of Chemical Sciences. The University of Auckland, Auckland, New Zealand.
- Rice-Evans, A.C., Miller, J.N., and Paganga, G., *Trends in Plant Sci.*, (1997), 2, 152-159.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Robbins, J.R., *J. Agric. Food Chem.*, (2003), 51, 2866-2887.
- Rose S. , Philippe J. (2005) Antioxidant properties of some edible fungi in the genus *Pleurotus*. University of Tennessee, Knoxville
- Royse, D.J. and Sanchez-Vazquez., J.E. (2001). Influence of substrate wood-chip particle size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. *Bioresource Technology* 76: 229-233.
- Rysman T. , Utrera M. , Morcuende D. , Van Royen G. , Van Weyenberg S. , De Smet S., Estevez M. (2016) Apple phenolics as inhibitors of the carbonylation pathway during in vitro metal-catalyzed oxidation of myofibrillar proteins. *Food Chemistry* 211, 784-790
- Sakihama, Y., Cohen, F.M., Grace, C.S., and Yamasaki, H., *Toxicology*, (2002), 177, 67-80.
- Samchai S. , Seephonkai P. , Kaewtong C. (2011) Two indole derivatives and phenolic compound isolated from mushroom *Phellinus linteus*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 9, 173-175
- Sanchez-Tena S., Vizan P. , Dudeja P. K. , Centelles J.J., Cascante M. (2013) Green tea phenolics inhibit butyrate-induced differentiation of colon cancer cells by interacting with monocarboxylate transporter 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832, 2264-2270
- Shahidi F. , Ambigaipalan P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods* 18, 820-897
- Shahidi F. , Chandrasekara A. (2013) Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *Journal of Functional Foods* 5, 570-581
- Silva, G. L., Lee, I. S., Kinghorn, A. D. 1998. Special problems with the extraction of plants, In *Natural Products Isolation*, R.J.P. Cannell (ed), Humana Press, New Jersey, pp. 343-363.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158
- Smolskaite L. , Venskutonis P. R. , Talou T. (2015) Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT- Food Science and Technology* 60, 462-471
- Soobrattee M. A. , Bahorun T. , Neergheen V. S. , Googoolye K. , Aruoma O. I. (2008) Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae,

- Erythroxyaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro* 22, 45-56
- Stamets P. (2000). *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley.
- Steffen, K.T. (2003). Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. PhD thesis. University of Helsinki. Zadrzil, (1994).
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In: *Plant Biochemistry*, Eds Dey, P.M., Harborne, J. B. Academic Press, London, pp. 387-416.
- Tadashi, K., Sobue, S. and Ukai, S. (1994). Polysaccharides in fungi XXXI, structural features of and hypoglycemic activity of two polysaccharides from hot water extracts of *Agrocybe cylindrica*. *Carbohydrate Research*, 251, 81–87.
- Tan, S.C., *Proc. Nutr. Soc. Aust.*, (2000), 24, 139-152.
- Tel-Cayan G. , Ozturk M. , Duru M. E. , Rehman M. U. , Adhikari A. , Turkoglu A. , Choudhary M. I. (2015) Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. *Industrial Crops and Products* 76, 749-754
- Toledo C. V. , Barroetavena C. , Fernandes A. , Barros L. , Ferreira I. C. F. R. (2016) Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. Forest, Argentina. *Molecules* 21
- Touati R. , Santos S. A. O. , Rocha S. M. , Belhamel K. , Silvestre A. J. D. (2017) Phenolic composition and biological prospecting of grains and stems of *Retama sphaerocarpa*. *Industrial Crops and Products* 95, 244-255
- Tsai S-Y. , Huang S-J. , Lo S-H. , Wu T-P., Lian P-Y., Mau J-L. (2009) Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 113, 578-584
- Tsai S-Y. , Huang S-J. , Mau J-L. (2006) Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food Chemistry* 98, 670-677
- Tsai S-Y. , Tsai H-L. , Mau J-L. (2007) Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT* 40, 1392-1402
- Tsao, R., Deng, Z. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Wallace, G., and Fry, S., *Int. Rev. Cytol.*, (1994), 151, 229-267.
- Wang C. R. , Zhou R. , Ng T. B. , Wong J. H. , Qiao W. T. , Liu F. (2014) First report on isolation of methyl gallate with antioxidant, anti-HIV-1 and HIV-1 enzyme inhibitory activities from a mushroom (*Pholiota adiposa*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 626-637
- Wang, L., and Weiler, C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17,300-312.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 31-62.
- Wen L. , You L. , Yang X. , Yang J. , Chen F. , Jiang Y. , Yang B. (2015) Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 84, 171-184
- Wong J. Y. , Chye F. Y. (2009) Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of food composition and analysis* 22, 269-277
- Xu X. , Zhao W. , Shen M. (2016) Antioxidant activity of liquid cultured *Inonotus obliquus* polyphenols using tween-20 as a stimulatory agent: Correlation of the activity and the phenolic profiles. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 69, 41-47

- Yahia E. M. , Gutierrez-Orozco F. , Moreno-Perez M. A. (2017) Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. *Food Chemistry* 226, 14-22
- Yasir M. , Sultana B. , Amicucci M. (2016) Biological activities of phenolic compounds extracted from Amaranthaceae plants and their LC/ESI-MS/MS profiling. *Journal of Functional Foods* 26, 645-656
- Zadrasil F. (1993). Cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on lingo-cellulose containing wastes. *Mushroom Information* 9-31.
- Zadrasil F. (1993). Cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on lingo-cellulose containing wastes. *Mushroom Information* 9-31.
- Zadrasil F. (1994). Cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on lingo-cellulose containing wastes. *Mushroom Information* 5-22.
- Zervakis G.A., Philippoussis A., Ioannidou S. and Diamantopoulou P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiology (Praha)* 46,231-234.
- Zhang, Y., Mills, G.L. and Nair, M.G. (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine* 10, 386–390.
- Zyzelewicz D. , Zaklos-Szyda M. , Juskiewicz J. , Bojczuk M. , Oracz J. , Budryn G. , Miskiewicz K. , Krysiak W. , Zdunczyk Z. , Jurgonski A. (2016) Cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) phenolic extracts as PTP1B inhibitors, hepatic HepG2 and pancreatic  $\beta$ -TC3 cell cytoprotective agents and their influence on oxidative stress in rats. *Food Research International* 89, 946-957
- Αλεξάνδρου, Ν.Ε., και Βάρβογλη, Α.Γ., *Οργανική Χημεία, Δ' Έκδοση, Εκδόσεις «Ζήτα», Θεσσαλονίκη, (1996), 230-254.*
- Καραουλάνης, Δ.Γ., *Χημικά Χρονικά, (1996), 9, 568-569.*
- Λαναρίδης Π., *Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, (2000), 47-60.*
- Φιλιπούσης, Α. και Διαμαντοπούλου, Π. (2001). Δυνατότητες οικολογικής διαχείρισης λιγνοκυτταρινούχων γεωργικών υπολειμμάτων και αποβλήτων με την καλλιέργεια μανιταριών. Πρακτικά της διημερίδας 'Ολοκληρωμένη διαχείριση οργανικών αποβλήτων και υπολειμμάτων'. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα, σελ. 159-170.