



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΘΕΜΑ

Επίδραση της συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή βιομάζας και στη βιοσύνθεση λιπιδίων του εδώδιμου και φαρμακευτικού μύκητα *Agrocybe aegerita* κατά την καλλιέργειά του σε υγρές ζυμώσεις

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ Χ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΘΕΜΑ

**Επίδραση της συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή βιομάζας και στη βιοσύνθεση
λιπιδίων του εδώδιμου και φαρμακευτικού μύκητα *Agrocybe aegerita* κατά την
καλλιέργειά του σε υγρές ζυμώσεις**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ
ΓΕΩΡΓΙΟΥ Χ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ: Επίδραση της συγκέντρωσης γλυκόζης στην παραγωγή βιομάζας και στη βιοσύνθεση λιπιδίων του εδώδιμου και φαρμακευτικού μύκητα *Agrocybe aegerita* κατά την καλλιέργειά του σε υγρές ζυμώσεις.

ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Χ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

Μαλλούχος Αθανάσιος, Λέκτορας ΓΠΑ

Διαμαντοπούλου Παναγιώτα, Αν. Ερευνήτρια ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έλαβε χώρα κατά κύριο λόγο στο εργαστήριο «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα στο σημείο αυτό να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην επιτυχή διεξαγωγή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαλλούχο Αθανάσιο και την κα. Γαρδέλη Αυγή για την αποτελεσματική συνεργασία και καθοδήγηση τους, χωρίς την οποία η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Διαμαντοπούλου Παναγιώτα για την άριστη συνεργασία και την φιλοξενία που μου παρείχε στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων / ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ στο οποίο και πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια των μανιταριών, καθώς και τον κ. Παπανικολάου Σεραφείμ για τα εύστοχα σχόλια και παρατηρήσεις κατά την διεξαγωγή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα ακόμα να εκθειάσω την σημαντική βοήθεια μέσα από τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης καθώς και τη ψυχολογική υποστήριξη από τον Σαρρή Δημήτριο καθώς και από τους υποψήφιους διδάκτορες Μάινα Σοφία, Παπαδάκη Κατερίνα, Τσούκο Έρη.

Ξεχωριστά ευχαριστώ θερμά τους γονείς, τον αδερφό και τους φίλους μου που μοναδικά με υπέμειναν και με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς επίσης και τους συμφοιτητές και συμφοιτήτριές μου για την τόσο ευχάριστη και αποτελεσματική συνεργασία τους.

Θα ήθελα ,τέλος, να εκφράσω της εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου σε όλους τους καθηγητές μου κατά τη διετή φοίτησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, καθώς θεωρώ τη συμβολή καθενός ξεχωριστά στις γνώσεις που έλαβα πολύτιμη.

Γιώργος Βασιλόπουλος

Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

1. Εισαγωγή

1.1. Ο μακρομύκητας *Agrocybe aegerita*

- 1.1.1. Γενικά στοιχεία – Ταξινόμηση
- 1.1.2. Μορφολογία
- 1.1.3. Βιολογικός κύκλος του *Agrocybe aegerita*
- 1.1.4. Συνθήκες ανάπτυξης
- 1.1.5. Καλλιέργεια
- 1.1.6. Διατροφικές ιδιότητες των εδώδιμων μανιταριών και του *A. aegerita*
- 1.1.7. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών *Agrocybe* και η εφαρμογή τους στην ιατρική

1.2. Λιπίδια

- 1.2.1. Ανάλυση Λιπιδίων
- 1.2.2. Λιπίδια μυκήτων
 - 1.2.2.1. Ακυλογλυκερόλες
 - 1.2.2.2. Γλυκεροφωσfolιπίδια
 - 1.2.2.3. Γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια
 - 1.2.2.3.a. Γλυκερογλυκολιπίδια
 - 1.2.2.3.β. Σφιγγολιπίδια
 - 1.2.2.4. Στερόλες
- 1.2.3. Παραγωγή μικροβιακού λίπους
- 1.2.4. Βιοσύνθεση μικροβιακών λιπιδίων
- 1.2.5. Τα λιπίδια των μανιταριών
- 1.2.6. Χημική σύσταση λιπιδίων βασιδιομυκήτων
- 1.2.7. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

- 1.2.7.1. Η Στατική Φάση
- 1.2.7.2. Η Κινητή Φάση
- 1.2.7.3. Εναπόθεση του Δείγματος και των Προτύπων
- 1.2.7.4. Θάλαμος Ανάπτυξης
- 1.2.7.5. Συστήματα Ανίχνευσης
 - 1.2.7.5.α. Μη καταστρεπτικό, μη ειδικό
 - 1.2.7.5.β. Καταστρεπτικό, μη ειδικό
 - 1.2.7.5.γ. Καταστρεπτικό, ειδικό
- 1.2.8. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
- 1.2.9. Μεθυλεστρεποποίηση Λιπιδίων
 - 1.2.9.1. Εστεροποίηση και μεθυλεστεροποίηση καταλυόμενη με οξύ
 - 1.2.9.2. Εστεροποίηση και μεθυλεστεροποίηση καταλυόμενη με βάση
 - 1.2.9.3. *In situ* μετεστεροποίηση

2. Υλικά και Μέθοδοι

- 2.1. Γενική παρουσίαση
- 2.2. Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων
- 2.3. Πειράματα ζυμώνσεων βυθού σε φιάλες
- 2.4. Χημικές αναλύσεις
 - 2.4.1. Προσδιορισμός κατανάλωσης γλυκόζης
 - 2.4.2. Συλλογή βιομάζας
 - 2.4.3. Προσδιορισμός ευδοπολυσακχαριτών
 - 2.4.4. Προσδιορισμός pH
 - 2.4.5. Ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους
 - 2.4.6. Εκχύλιση του λίπους
 - 2.4.7. Κλασμάτωση του λίπους
 - 2.4.8. Ανάλυση των λιπιδίων με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)
 - 2.4.9. Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου
 - 2.4.10. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σακχάρων στο λίπος

- 2.4.11. Προσδιορισμός ολικών λιπιδίων ως μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων με απευθείας μετεστεροποίηση στη βιομάζα
- 2.4.12. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία - προσδιορισμός FAMES

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1. Καλλιέργεια του *Agrocybe aegerita* σε εμπορική γλυκόζη ($S_0 = 30$ g/L και $S_0 = 62,4$ g/L)

- 3.1.1. Παράμετροι ανάπτυξης και βιοσύνθεσης λίπους
- 3.1.2. Ανάλυση λιπιδίων
 - 3.1.2.1. Ποσοτική ανάλυση λιπιδίων με TLC
 - 3.1.2.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου
 - 3.1.2.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός σακχάρων στα λιπίδια του μακρομύκητα
 - 3.1.2.4. Ποιοτική ανάλυση τάξεων του μακρομύκητα
 - 3.1.2.5. *A. aegerita* με TLC

4. Συμπεράσματα μελέτης

Βιβλιογραφία

Παράρτημα με φωτογραφίες

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης γλυκόζης στη φυσιολογία του εδώδιμου – φαρμακευτικού μύκητα *Agrocybe aegerita* κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε υγρή κατάσταση. Συγκεκριμένα, αυτοφυές στέλεχος του μανιταριού *A. aegerita* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με συγκέντρωση γλυκόζης ~ 30 g/L (C/N=20, μάρτυρας) και ~ 65 g/L (C/N=40) και εξετάστηκε η επίδραση της γλυκόζης στην ποσότητα της παραγόμενης βιομάζας του μανιταριού (μυκήλιο), στην παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών και στη συγκέντρωση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων της. Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων των μυκηλίων με εκχύλιση, προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά οι κύριες τάξεις λιπιδίων με τη βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών (υγρή χρωματογραφία στήλης, TLC). Παράλληλα, αναπτύχθηκε μεθοδολογία για την *in situ* μετεστεροποίηση των λιπιδίων και τον μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων (ως μεθυλεστέρες) με αέρια χρωματογραφία. Σε ό,τι αφορά την κυτταρική αύξηση του μακρομύκητα, καταγράφηκε υψηλή συγκέντρωση βιομάζας και στα δύο υποστρώματα φτάνοντας την τελευταία μέρα της ζύμωσης σε ~ 21 g/L. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεγάλη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (65% επι της ξηρής βιομάζας), γεγονός που υποδεικνύει την φαρμακευτική δράση του μανιταριού. Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους και στις δύο περιπτώσεις δεν ξεπέρασε το 4% επί ξηρής βιομάζας, ενώ παρατηρήθηκε λίγο μεγαλύτερη ποσότητα λίπους (~1%) στην καλλιέργεια με την μικρή συγκέντρωση γλυκόζης στο υπόστρωμα. Ποιοτική ανάλυση μέσω TLC των λιπιδίων έδειξε πως τα κύρια ουδέτερα λιπίδια είναι οι τριακυλογλυκερόλες, οι στερόλες και οι κηροί, ενώ τα κύρια φωσφολιπίδια είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Ποσοτική ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας μεθυλεστέρων, οι οποίοι προέκυψαν από απευθείας μετεστεροποίηση στη βιομάζα, έδειξε πως και στις δύο συνθήκες ζύμωσης τα κύρια λιπαρά οξέα ήταν το παλμιτικό (16:0), το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1) και το λινελαϊκό οξύ (18:2). Το λινελαϊκό οξύ ήταν το κυρίαρχο λιπαρό οξύ με ποσοστό 47-75% w/w του συνόλου των λιπαρών οξέων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αύξηση του ελαιικού οξέος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας καθώς ξεκινάει με ποσοστό 5,67% του συνόλου των λιπαρών οξέων την 13 ημέρα της καλλιέργειας και φτάνει το 32% τις τελευταίες μέρες της καλλιέργειας. Τέλος, έγινε προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού των τάξεων των λιπιδίων από την επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας της πλάκας TLC το λογισμικό ImageJ, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά. Η παρούσα μελέτη είναι πρωτότυπη διότι καθώς υπάρχει έλλειψη βιβλιογραφίας σχετικά με τη βιοσυνθετική ικανότητα λιπιδίων του μακρομύκητα *A. aegerita*, διεξήχθησαν

προηγμένες βιο-φυσιολογικές μελέτες σε σχέση με την ανάπτυξη του, καθώς και τον προσδιορισμό του λιπιδικού του προφίλ του σε υγρές καλλιέργειες.

Λέξεις κλειδιά : καλλιέργεια, γλυκόζη, *A. aegerita*, βιομάζα, λίπος, λιπαρά οξέα, TLC

Abstract

The purpose of this study is to investigate the effect of variable concentration of glucose in the physiology of the edible - medicinal fungus *Agrocybe aegerita* during its cultivation in liquid batch cultures. More specifically, a wild strain of mushroom *A. aegerita* was cultured in nutrient medium with high glucose (~ 65 g/L) and was compared with low-concentration cultures (~30 g/L). Also the effect of glucose on the amount of the produced mycelial biomass and the biosynthesis of its lipids was examined. After quantification of lipids of mycelium by extraction, the main classes of lipids were determined qualitatively and quantitatively by means of chromatographic techniques (column chromatography, TLC). At the same time, a methodology was developed for the in situ transesterification of lipids and subsequent quantitative determination of fatty acids (as methyl esters) by gas chromatography. The mushroom grew normally on both substrates reaching the last day of the fermentation a DCW concentration of ~ 21 g/L. Worth to mention is the high production of intracellular polysaccharides 65% of dry biomass, which indicates the potential interest of this m/o as cell factory able to produce medicinally significant metabolites. Intracellular lipid accumulation in both cases did not exceed 4% on dry biomass, which is reasonable since this fungus is a non-oleaginous one. Little more lipids (<1%) were observed in the culture with low glucose concentration in the substrate. TLC analysis of lipids showed that the major neutral lipids are triacylglycerol, sterols and waxes while the main phospholipids identified were phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. Quantitative analysis by gas chromatography of methyl esters which resulted from direct methylesterification in biomass showed that in both fermentation conditions the main fatty acids were palmitic acid (16: 0), stearic acid (18: 0), oleic acid (18: 1) and linoleic acid (18: 2). Linoleic acid was the predominant fatty acid with 47-75% w/w of total lipids. Oleic acid starts with a percentage of 5.67% of total fatty acids at 13 days of cultivation and significantly increased to 32% in the last days. Finally, an attempt was made to quantify the lipids through a TLC plate and ImageJ software but the results

were not as satisfactory. The present study is original because in general there is a lack of relevant bibliography on the lipid biosynthetic ability of the specific strain of fungus and also because advanced bio-physiological studies in relation with the growth of this fungus and determination of its lipid profile in liquid cultures were carried out.

Keywords: cultivation, glucose, *A. aegerita*, biomass, lipids, fatty acids, TLC

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.0 ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΑΣ *AGROCYBE AEGERITA*

1.1.1. Γενικά στοιχεία – Ταξινόμηση

Πίνακας 1. Ταξινόμηση μανιταριού *Agrocybe aegerita*

| | |
|-------------------|-----------------------|
| ΒΑΣΙΛΕΙΟ | <i>Μύκητες</i> |
| ΦΥΛΟ | <i>Basidiomycota</i> |
| ΚΛΑΣΗ | <i>Agaricomycetes</i> |
| ΤΑΞΗ | <i>Agaricales</i> |
| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ | <i>Strophariaceae</i> |
| ΓΕΝΟΣ | <i>Agrocybe</i> |
| ΕΙΔΟΣ | <i>A. aegerita</i> |

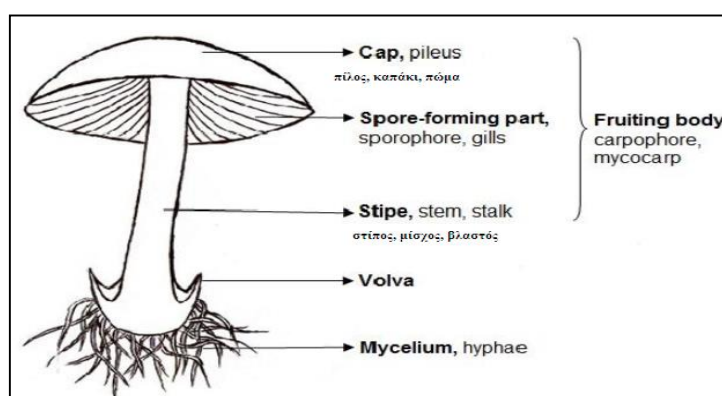
Ο μακρομύκητας *A. aegerita* (V. Brig.) Singer – συνώνυμος με τον *A. cylindracea* (DC.) Maire ανήκει στην τάξη Agaricales, οικογένεια Strophariaceae. Το όνομα του προέρχεται από την ελληνική λέξη «αιγείτης» που φανερώνει ότι το μανιτάρι αυτό ευδοκίμει και αναπτύσσεται πάνω σε μαύρη λεύκα (black poplar 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).

1.1.2. 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)

1.1.3. Βιολογικός κύκλος του *Agrocybe aegerita*

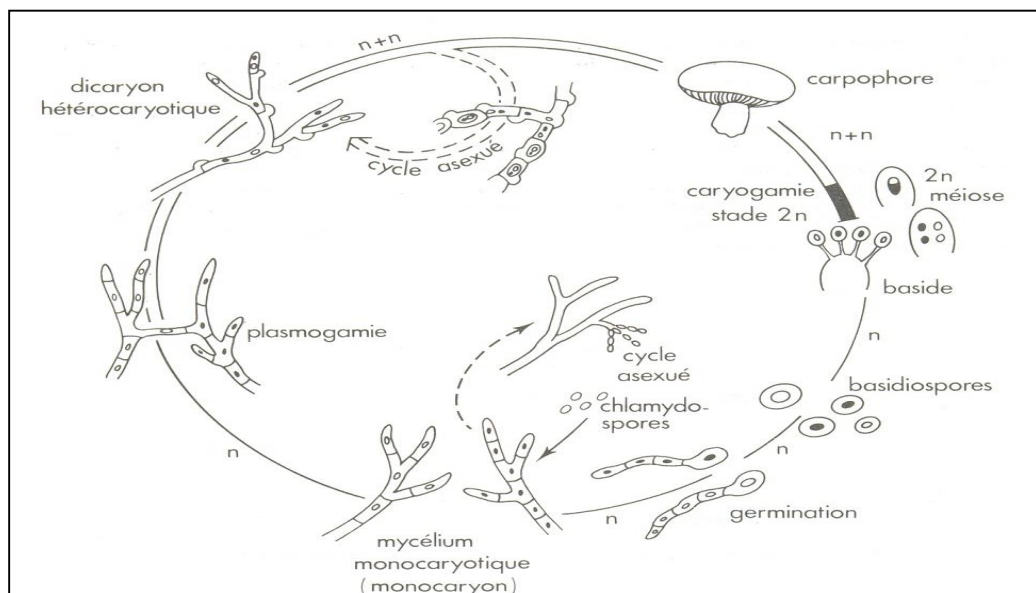
Ο βιολογικός κύκλος του μακρομύκητα *A. aegerita* ακολουθεί αυτόν των Βασιδιομυκήτων. Παρακάτω περιγράφεται και απεικονίζεται ο βιολογικός κύκλος ενός τυπικού βασιδιομύκητα της τάξης των Agaricales (Delmas, 1989).

Ως σημείο εκκίνησης του βιολογικού κύκλου θεωρείται το βασιδιοσπόριο το οποίο είναι μονοκύτταρο και απλοειδές (n 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. Δικαρύωση 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 τα βασίδια είναι κύτταρα

ροπαλοειδή ή κυλινδρικά. Ολόκληρο το βασιδιοκάρπιο (μανιτάρι) είναι κατασκευασμένο από δικάρυες υφές (ψευδοϊστό).

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 βασιοσπόριο. Κάθε βασίδιο σχηματίζει 4 βασιοσπόρια απλοειδή και ανά δύο αντίθετου φύλου. Όταν ωριμάσουν τα βασιοσπόρια εκτινάσσονται από τα στηρίγματά τους, διασπείρονται, και όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα βλασταίνουν δίνοντας μονοκάρνα απλοειδή μυκήλια. Τέλος, σε πολλά είδη μανιταριών μεταξύ των βασιδίων υπάρχουν χαρακτηριστικά άγωνα στοιχεία τα οποία ονομάζονται κυστίδια και των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι πολύ χρήσιμα στην ταξινόμηση.



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

1.1.4. Συνθήκες ανάπτυξης

Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης του μυκηλίου βρίσκονται στους 20 – 22 °C. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο κίνδυνος ανάπτυξης ανταγωνιστικών μικροοργανισμών αυξάνεται. Η καρποφορία αναπτύσσεται φυσιολογικά μέχρι ενός ποσοστού CO₂ (περίπου 0,25%). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις CO₂ 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).

1.1.5. 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 βιοαποδόμησή 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*, έχουν μοναδικό ρόλο στο βιογεωχημικό κύκλο του άνθρακα αφού είναι ικανοί να αποδομούν αμφοότερες την κυτταρίνη και τη λιγνίνη.

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 «επάωσης». 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. (Zadrazil, 1993, Philippoussis κ.α., 2001; Zervakis κ.α., 2001; Φιλιπούσης και Διαμαντοπούλου, 2001). Ακολουθεί επώαση για τρεις εβδομάδες σε θερμοκρασία 23 – 27 °C, με υψηλή συγκέντρωση CO₂ 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, CO₂ < 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*

1.1.6. 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 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. Επιπλέον, αποτελούν τροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρές ύλες (1,5-8,0%, w/w), χαμηλή σε κορεσμένα λιπίδια και με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να κατέχουν τη μεγαλύτερη αναλογία στο σύνολο των ολικών λιπαρών οξέων (72-85% w/w.; Chang και Miles, 2004).

Ιδιαίτερα πλούσια είναι τα μανιτάρια σε σίδηρο, φώσφορο, κάλιο, μαγνήσιο, χαλκό, ψευδάργυρο και σελήνιο, βιταμίνη B5 (Racz κ.α., 1996; Ouzouni κ.α., 2007). Το μανιτάρι *Agrocybe aegerita* περιέχει επίσης σε σημαντικές ποσότητες παλμιτικό και λινελαϊκό οξύ, εργοστερόλη, μαννιτόλη και τρεαλόζη (Zang κ.α., 2003), ασβέστιο, φολικό οξύ, βιοτίνη, νιασίνη (B3), σελήνιο, 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 5-9% της σύστασης του ξηρού δείγματος αποτελείται από οξείδια του καλίου και του φωσφόρου (Ouzouni κ.α, 2009).

Τέλος, σε ό,τι αφορά τους υδατάνθρακες (53-67%, w/w) 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.

1.1.7. 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 και Weis, 1999; Lull κ.α., 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.ά. 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 1.2., 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 κ.α., 1997), πολυσακχαρίτες του εμφάνισαν υπογλυκαιμική δράση (Tadashi κ.α., 1994) και το πεπτίδιο *agrocybin* έδειξε αντιμυκητιακή δράση (Ngai κ.α., 2005). Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι καταναλώνοντας φρούτα και λαχανικά που είναι υψηλά σε αντιοξειδωτικά μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος χρόνιων παθήσεων. Το *ergothioneine*, ένας μοναδικός μεταβολίτης που παράγεται από τους μύκητες, έχει αποδειχθεί ότι έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και παρέχει κυψελοειδή προστασία στο ανθρώπινο

σώμα. Τα μανιτάρια είναι μια από τις καλύτερες φυσικές πηγές του αντιοξειδωτικού ergothioneine. Το λευκό μανιτάρι, το οποίο είναι το πιο καταναλώσιμο μανιτάρι στις ΗΠΑ, έχει περίπου 12 φορές περισσότερο από το αντιοξειδωτικό ergothioneine από ό,τι το σιτάρι και 4 φορές περισσότερο από το συκώτι κοτόπουλου, επίσης σε μεγάλα ποσοστά το ergothioneine βρίσκεται και στα μανιτάρια της ποικιλίας portabellas και τα criminis. Πολύ σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα επίπεδα ergothioneine δεν μειώνονται κατά την επεξεργασία του μαγειρέματος των μανιταριών (Penn State, 2005).

Πίνακας 1.2. Φαρμακευτικές δράσεις βασιδιομυκήτων (Wasser και Weis, 1999)

| Θεραπευτικά αποτελέσματα / Μακρομύκητες | Αντιμυκητιστακά | Αντιφλεγμονώδη | Αντικαρκινικά | Κατά των ιών, π.χ. AIDS | Αντιβακτηριακά και 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

1.2. Λιπίδια

Σύμφωνα με τον Christie (2003), λιπίδια είναι τα λιπαρά οξέα, τα παράγωγά τους και ουσίες που σχετίζονται βιοσυνθετικά ή λειτουργικά με αυτά. Ένα λιπαρό οξύ περιέχει μια μακριά υδρογονανθρακική αλυσίδα και μια τελική καρβοξυλική ομάδα. Τα λιπαρά οξέα έχουν τέσσερεις κύριους φυσιολογικούς ρόλους (Stryer κ.α., 2014) :

- Είναι καύσιμα μόρια. Αποθηκεύονται ως τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες είναι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Οι τριακυλογλυκερόλες αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό, ο οποίος αποτελείται από κύτταρα τα οποία ονομάζονται λιποκύτταρα. Τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών οξειδώνονται για να ικανοποιήσουν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου και κατ'επέκταση του οργανισμού.
- Είναι οι δομικοί λίθοι των φωσφολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων. Οι ενώσεις αυτές είναι σημαντικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών.
- Πολλές πρωτεΐνες τροποποιούνται με την ομοιοπολική δέσμευση λιπαρών οξέων τα οποία τις κατευθύνουν προς τις θέσεις τους στις μεμβράνες.
- Παράγωγα των λιπαρών οξέων χρησιμεύουν ως ορμόνες και ως ενδοκυτταρικοί αγγελιαφόροι.

Τα λιπαρά οξέα δύνανται να είναι εστεροποιημένα είτε με τη γλυκερόλη οπότε τα λιπίδια που προκύπτουν ονομάζονται γλυκερίδια ή ακυλογλυκερόλες, είτε με τη σφιγγοσίνη οπότε προκύπτουν τα σφιγγολιπίδια, είτε τέλος με διάφορες λιπαρές αλκοόλες (συνήθως κετυλική, κερυλική και μυρικυλική αλκοόλη) οπότε προκύπτουν οι κηροί. Τα λιπίδια ανήκουν σε μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων, των οποίων κύριο χαρακτηριστικό είναι η ευχέρεια διάλυσής τους σε οργανικούς διαλύτες. Τέτοιοι διαλύτες μπορεί να είναι ο αιθέρας, το βενζόλιο, το εξάνιο, το χλωροφόρμιο και άλλα. Τα λιπίδια διακρίνονται σε απλά, σύνθετα λίπη, παράγωγα λιπίδια και άλλες λιπαρές ύλες. Στα απλά λιπίδια εντάσσονται οι ακυλογλυκερόλες, οι κηροί, και οι εστέρες στερολών. Στα σύνθετα λιπίδια εντάσσονται τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν γλυκερίδια που περιέχουν στο μόριο τους χαρακτηριστικές ομάδες. Στα παράγωγα λιπίδια εντάσσονται τα λιπαρά οξέα, οι στερόλες, οι λιπαρές αλδεΐδες και οι υδρογονάνθρακες. Στα διάφορα λίπη εντάσσονται

οι χρωστικές, οι σάπωνες με τα Na ή K, άλατα λιπαρών οξέων και πολυμερή προϊόντα οξείδωσης λιπών.

1.2.1. Ανάλυση Λιπιδίων

Η μεγάλη διαφορά του μεγέθους των κυττάρων των μανιταριών, κάτι που τα διαχωρίζει από τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, συνοδεύεται από ανάλογη διαφοροποίηση στα λιπίδια. Δημιουργούνται λοιπόν οι εξής ερωτήσεις οι οποίες απαντώνται μέσω της ανάλυσής τους:

1. Ποια λιπαρά οξέα εμφανίζονται στο λίπος
2. Ποιες διαφορετικές τάξεις λιπιδίων είναι εμφανείς
3. Ποια είναι η σύσταση των λιπαρών οξέων κάθε τάξης

Τα λιπίδια είναι υδρόφοβα ή αμφίπολα μικρά μόρια. Μια υποδιαίρεση σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ως απλά και σύνθετα λιπίδια, είναι βολική για την χρωματογραφία. Τα απλά λιπίδια ορίζονται ως εκείνα που κατά την υδρόλυση δίνουν το περισσότερο δύο είδη κύριου προϊόντος ανά γραμμομόριο. Σύνθετα λιπίδια αποδίδουν τρία ή περισσότερα κύρια προϊόντα υδρόλυσης ανά γραμμομόριο.

Τα σύνθετα λιπίδια κατατάσσονται σε γλυκεροφωσfolιπίδια (ή με μικρότερη ακρίβεια απλώς φωσfolιπίδια), τα οποία περιέχουν ένα πολικό τμήμα με φωσφορική ομάδα και μια ραχοκοκαλιά γλυκερόλης ή τα γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια, τα οποία περιέχουν πολική υδρογονανθρακική αλυσίδα και αναλύονται εύκολα χωριστά. Εναλλακτικά, οι όροι "ουδέτερα" και "πολικά" λιπίδια χρησιμοποιούνται για τον ορισμό αυτών των ομάδων, αλλά είναι λιγότερο ακριβείς (Christie, 2003).

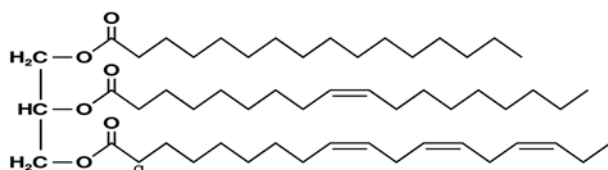
1.2.2. Λιπίδια μυκήτων

Η ποσότητα και ο τύπος των λιπιδίων σε μεμονωμένους μύκητες ποικίλλουν όχι μόνο από τον έναν οργανισμό στον άλλο αλλά και από την ηλικία, τα στάδια ανάπτυξης, τη διατροφή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Weete και Weber, 1980). Η περιεκτικότητα σε λιπίδια των μυκητιακών κυττάρων μεταβάλλεται σημαντικά με τη

μεταβολή των συνθηκών καλλιέργειας, επομένως, η βιβλιογραφία σχετικά με τη συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια είναι περιορισμένης αξίας εκτός εάν παρατίθενται λεπτομερών όλες οι παράμετροι ανάπτυξης.

1.2.2.1. Ακυλογλυκερόλες

Υπό κατάλληλες συνθήκες, οι ακυλογλυκερόλες είναι τα κύρια λιπίδια αποθήκευσης πολλών νηματοειδών μυκήτων. Η ποσότητα αυτών των ενώσεων ποικίλλει σημαντικά κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των μυκήτων και διαφέρει από είδος σε είδος, καθώς επίσης επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά. Οι τριακυλογλυκερόλες (TAGs) είναι τα κύρια λιπίδια όπως στο μυκήλιο των περισσότερων μυκήτων, τα οποία γενικά θεωρούνται λιπίδια αποθήκευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ενέργειας κατά την ανάπτυξη (Ratledge και Wilkinson, 1988). Αυτά αποτελούνται από τρία λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με μόρια γλυκερόλης και είναι σκληρά κηρώδη στερεά σε θερμοκρασία δωματίου (λίπη) έως ημιδιαφανή υγρά (έλαια) (Christie, 2003).



Εικόνα 1.4. Η ακόρεστη τριακυλογλυκερόλη (TAG). Αριστερό μέρος: γλυκερόλη, δεξιά μέρος από πάνω προς τα κάτω: παλμιτικό οξύ, ελαϊκό οξύ και α -λινολενικό οξύ.

1.2.2.2. Γλυκεροφωσfolιπίδια

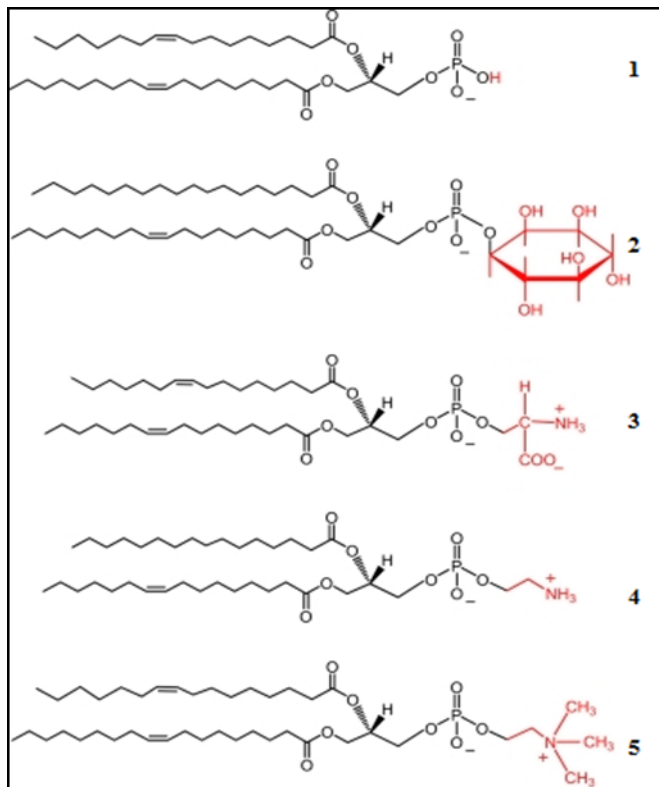
Τα φωσfolιπίδια είναι σημαντικά δομικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών. Έχουν εμπλακεί στην ενεργή μεταφορά ιόντων δια μέσου των μεμβρανών και είναι επίσης απαραίτητα για τη δράση ορισμένων ενζύμων που συνδέονται με την μεμβράνη (Sancholle κ.α., 2003; Cohen, 2011)

Τα φωσfolιπίδια είναι μια κατηγορία λιπιδίων που αποτελούνται από δύο λιπαρά οξέα εστεροποιημένα στις θέσεις *sn*-1 και *sn*-2 της γλυκερόλης και περιέχουν μια φωσφορική ομάδα στη θέση *sn*-3. Υπάρχει ποικιλία φωσfolιπιδικής σύνθεσης στους μικροοργανισμούς. Συνήθως, στους περισσότερους μύκητες, τα κύρια συστατικά είναι

η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), ακολουθούμενη στενά από την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) με μικρότερες ποσότητες φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η PE μπορεί να είναι σε μεγάλη ποσότητα. (Cerv, 1993; Ratledge και Wilkinson, 1988).

Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) αντιπροσωπεύει το 5-16% των συνολικών φωσφολιπιδίων στις περισσότερες κατηγορίες. Η διφωσφατιδυλογλυκερόλη (DPG) που συνήθως αντιπροσωπεύει το 2-5% λιπιδικού φωσφόρου, συναντάται επίσης συχνά στους μύκητες. Η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), η χαρακτηριστική κατηγορία φωσφολιπιδίων που υπάρχουν στους χλωροπλάστες, φαίνεται να είναι μεταξύ 3-13% σε ελαιογόνους μύκητες.

Από τις περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με την εμφάνιση της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (lysoPC) και της lyso-PE, είναι αδύνατον να προσδιοριστεί αν αυτά εμφανίζονται σημαντικά στον φυσιολογικό μεταβολισμό των μυκήτων ή αντανακλούν τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης κατά την εκχύλιση λιπιδίων. Όπως και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, τα μυκητιακά φωσφολιπίδια αποτελούν τα κύρια συστατικά των μεμβρανικών και άλλων οργανικών κυττάρων. Το γεγονός πως τα φωσφολιπίδια των μυκητιακών κυττάρων μπορεί να βρίσκονται και σε άλλα σημεία εκτός των μεμβρανών έχει προταθεί πρώτα από τους Illingworth κ.α. (1973), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η ασκοσπογένεση στο *Saccharomyces cerevisiae* συνοδεύτηκε από αύξηση της περιεκτικότητας σε φωσφολιπίδια κατά 171% περισσότερη από αυτή που οφείλεται στην ανάπτυξη των μεμβρανών.



Εικόνα1.5. Δομές των κύριων γλυκεροφωσfolιπιδίων. 2: (Φωσφατιδυλινσιτόλη), 3: PS (Φωσφατιδυλοσερίνη), 4: PE (Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη), 5: PC (Φωσφατιδυλοχολίνη).

1.2.2.3. Γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια

1.2.2.3.α. Γλυκερογλυκολιπίδια

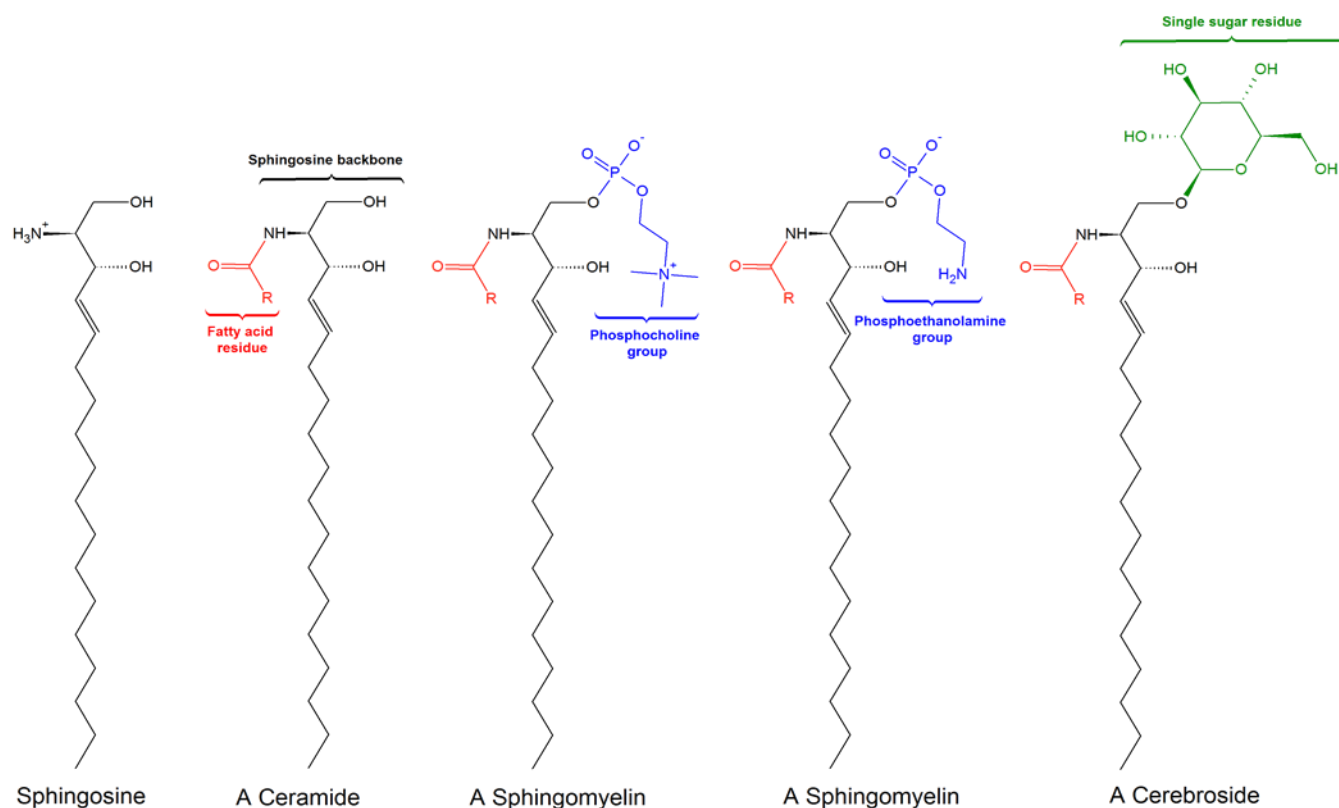
Τα γλυκερογλυκολιπίδια είναι παράγωγα της γλυκερόλης και συμπεριλαμβάνουν τις Μονο-και Διγαλακτοζυλοδιακυλογλυκερόλες στις οποίες κυριαρχεί η γαλακτόζη και ανευρίσκονται σε αυθονία σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, και τα Σουλφολιπίδια (σουλφοκινονοβοζυλοδιακυλογλυκερόλες) τα οποία αποτελούν επίσης τα πιο χαρακτηριστικά γλυκολιπίδια σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ιστούς και είναι ιδιαίτερα διαλυτά στο νερό.

1.2.2.3.β. Σφιγγολιπίδια

Τα σφιγγολιπίδια αποτελούνται από κεραμίδιο (μόριο σφιγγοσίνης ή παραγώγου της) με εστεροποιημένο λιπαρό οξύ στην αμινομάδα. Από εστεροποίηση ενός μορίου φωσφορυλαιθανολαμίνης ή φωσφορυλοχολίνης με την υδροξυλομάδα στη θέση -1 του κεραμιδίου, προκύπτει η σφιγγομυελίνη, το πιο διαδεδομένο μέλος της κατηγορίας.

Εκτός από τον δομικό τους ρόλο, τα σφιγγολιπίδια συμμετέχουν σε διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης που ρυθμίζουν τη διακυτταρική επικοινωνία, κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό και απόπτωση.

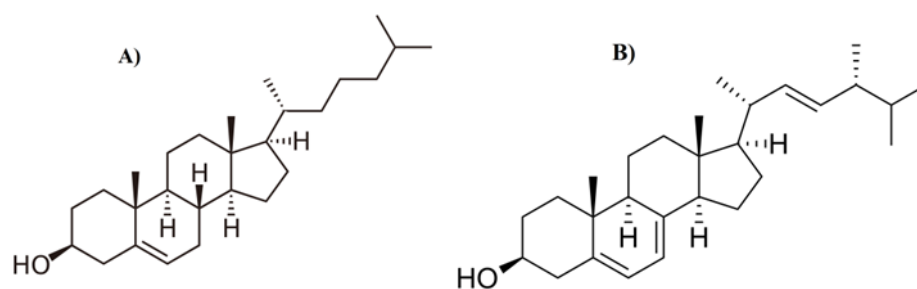
Στην κατηγορία των σφιγγολιπιδίων κατατάσσονται και τα γλυκοσφιγγολιπίδια, που στο μόριό τους περιέχουν επί πλέον κατάλοιπα σακχάρων. Αποτελούν σημαντικά συστατικά των νευρικών και μυικών κυττάρων και περιέχουν σκελετό κεραμιδίου, αντί όμως για φωσφορυλοχολίνη ή φωσφορυλαιθανολαμίνη, έχουν ενωμένο στην 1-υδροξυλομάδα του κεραμιδίου ένα ή περισσότερα ισοδύναμα σακχάρου με β-γλυκοζιτικό δεσμό. Αν το σάκχαρο είναι γλυκόζη, γαλακτόζη ήθειικός εστέρας της γαλακτόζης, το μόριο ονομάζεται κερεβροζίτης. Οι γαλακτοκερεβροζίτες βρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά στον εγκέφαλο και στο νευρικό σύστημα. Οι γαγγλιοζίτες είναι πολύπλοκοι κερεβροζίτες και περιλαμβάνουν τρία ή περισσότερα ισοδύναμα σακχάρων στο μόριό τους, καθώς και τουλάχιστον ένα ισοδύναμο σιαλικού οξέος. Οι γαγγλιοζίτες βρίσκονται στις μεμβράνες των νευρικών απολήξεων, ιδίως στον εγκέφαλο και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαβίβαση των νευρικών ώσεων.



Εικόνα 1.6. Δομές διαφόρων σφιγγολιπιδίων

1.2.2.3. Στερόλες

Δεδομένων των απαιτούμενων αερόβιων συνθηκών, οι περισσότεροι μύκητες μπορούν να συνθέσουν στερόλες. Οι στερόλες εμφανίζονται στα κύτταρα των μυκήτων ως ελεύθερες στερόλες, εστέρες και γλυκοζίτες στερόλης ή σε άλλες δεσμευμένες μορφές.. Όπως και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, τέτοια στοιχεία δείχνουν ότι οι ελεύθερες στερόλες στους μύκητες αποτελούν σε μεγάλο βαθμό συστατικά των μεμβρανών τα οποία μπορούν να σταθεροποιήσουν άλλα λιπίδια μεμβράνης, ελέγχοντας έτσι τη διαπερατότητα επηρεάζοντας το εσωτερικό ιξώδες και τη μοριακή κίνηση των λιπιδίων μέσα στη μεμβράνη. Μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως πρόδρομοι στεροειδών ορμονών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή ορισμένων μυκήτων (Ratledge και Wilkinson, 1988). Οι ζυγομύκητες διαφέρουν από άλλες κατηγορίες «κατώτερων» μυκήτων στην παραγωγή εργοστερόλης γενικά ως κύρια στερόλη συνοδευόμενη από 22-διυδροεργοστερόλη και μικρότερες ποσότητες χοληστερόλης. Ωστόσο, οποιαδήποτε γενίκευση είναι πρόωρη ενόψει της ευρέως μεταβαλλόμενης σύνθεσης στερόλης που απαντάται σε μύκητες διαφορετικής ταξινομικής συγγένειας, η οποία πιθανόν να συνοδεύεται από μεγάλες διαφορές στις βιοσυνθετικές οδούς. Μεταξύ των στερολών, τα περισσότερα είδη μανιταριών, εμφανίζουν υψηλά ποσοστά περιεχόμενης εργοστερόλης, η οποία θεωρείται πρόδρομος της βιταμίνης D2 (Matilla κ.α., 2002).



Εικόνα 1.7. Γενική δομή στερολών A) Χοληστερόλη B) Εργοστερόλη

1.2.3. Παραγωγή μικροβιακού λίπους

Η ποσότητα του λίπους στους μικροοργανισμούς μπορεί να διαφέρει από 1% έως και 80% της κυτταρικής βιομάζας (Ratledge και Wynn, 2002). Η έκταση της συσσώρευσης λιπιδίων σε αυτούς τους μικροοργανισμούς προσδιορίζεται από τη γενετική σύσταση,

καθώς η ποσότητα των λιπιδίων μπορεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, ακόμη και μεταξύ των μεμονωμένων στελεχών. Είναι γνωστό ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν μεγαλύτερη τάση να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων, μερικές φορές περισσότερο από το 70% του βάρους της βιομάζας. Αυτοί οι μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να συσσωρεύσουν λιπίδια σε περισσότερο από περίπου το 20% της βιομάζας τους ονομάζονται ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Thorpe και Ratledge, 1972). Το λίπος που λαμβάνεται από μικροοργανισμούς έχει θεωρηθεί ως μονοκυτταρικό λίπος (SCO) επειδή συντίθεται πιο καθαρό και λιγότερο δαπανηρό από τις γεωργικές και ζωικές πηγές (Ratledge, 2004, Cohen και Ratledge; 2005). Στην ομάδα των ελαιογόνων κατατάσσονται πολλοί μικροοργανισμοί, όπως ζύμες, μύκητες, βακτήρια αλλά και μικροφύκη, μερικοί εκ των οποίων μπορούν να συσσωρεύουν SCOs πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFAs) (Aggelis κ.α., 1987; Ratledge, 1993, 2004; Leman, 1997), ή τριακυλογλυκερόλες (TAGs) σπάνιας δομής (Paranikolaou κ.α., 2001). Τα λιπίδια μπορεί να είναι σχετικά απλά μόρια, όπως για παράδειγμα τα ίδια τα λιπαρά οξέα ή πιο περίπλοκα που περιέχουν ομάδες φωσφο ή σουλφο, αμινοξέα, πεπτίδια και τα παράγωγά τους, σάκχαρα και ακόμη και ολιγοσακχαρίτες. Η ποικιλομορφία των λιπιδίων υποδηλώνει μια ποικιλία λειτουργιών (Ratledge και Wilkinson, 1988; Wynn κ.α., 1999).

Πολύ σημαντικό για την περαιτέρω ανάπτυξη των διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία SCO, είναι να κατανοήσουμε πώς οι μικροοργανισμοί συνθέτουν τα λιπαρά οξέα τους και πώς μπορούν να συσσωρεύουν τόσο λίπος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί πρέπει να συνθέσουν μια ελάχιστη ποσότητα λιπιδίων για τις μεμβράνες τους αλλά και για άλλες σημαντικές για τον οργανισμό λειτουργίες. Η βιοσυνθετική οδός των λιπιδίων στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι ίδια με τους μη-ελαιογόνους. Ωστόσο, η παρουσία ορισμένων βασικών ενζύμων παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή PUFAs (Polyunsaturated fatty acids), όπου αυτά τα ένζυμα δεν απαντώνται σε μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge, 1992a, 1992b).

Υπάρχουν μόνο 25-30 είδη που έχουν την ικανότητα συσσώρευσης λίπους. Σύμφωνα με τους Botham and Ratledge (1979) υπάρχουν τρεις πιθανοί λόγοι για τους οποίους δεν γίνεται συσσώρευση λίπους:

- Οι μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, μόλις εξαντληθεί από το υπόστρωμα το άζωτο, σταματούν να αφομοιώνουν την γλυκόζη με αποτέλεσμα να μην δημιουργούνται μονάδες ακετυλο-CoA το οποίο θα δρούσε ως σημείο εκκίνησης για την βιοσύνθεση των ελεύθερων λιπαρών οξέων.
- Η καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA, η οποία σχετίζεται με τον ρυθμό βιοσύνθεσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, υπερεκφράζεται στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, στους μη ελαιογόνους υφίσταται καταστολή ή και αναστολή ανατροφοδότησης με τελικό προϊόν έναν ακυλο-CoA εστέρα.

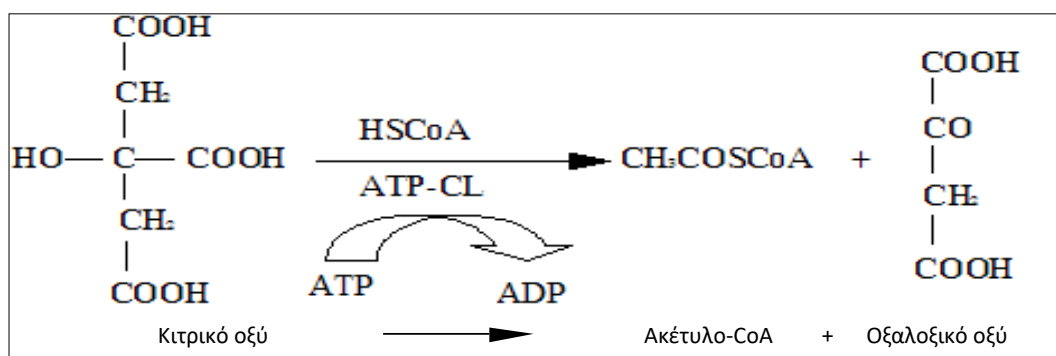
Θεμελιώδης απαίτηση για την μεγάλη παραγωγή λιπιδίων σε αυτούς τους οργανισμούς είναι η περίσσεια άνθρακα και γενικά περιορισμός αζώτου στο μέσο ανάπτυξης. Σε αυτές τις συνθήκες τα μικροβιακά κύτταρα δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν, αφού το άζωτο που είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων λείπει από το περιβάλλον αύξησης. Ο άνθρακας όμως που υπάρχει στο μέσο καλλιέργειας εξακολουθεί να αφομοιώνεται από τα κύτταρα και με την δράση κατάλληλων ενζύμων μετατρέπεται σε αποθεματικά λιπίδια. Κατά τη διάρκεια αυτών των συνθηκών παρατηρήθηκαν αρκετές αλλαγές στην φυσιολογία και στον μεταβολισμό του μικροοργανισμού (Ratledge, 1988). Όταν οι οργανισμοί αναπτύσσονται σε μέσο με περιορισμένο άζωτο, παρατηρείται μια συσσώρευση ελαίου έως 70% σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς, κάτι που δεν συμβαίνει στους μη-ελαιογόνους.

Αρχικά λοιπόν ο μικροοργανισμός ευρισκόμενος σε ένα περιβάλλον στο οποίο τα θρεπτικά συστατικά βρίσκονται σε ποσότητες ικανές να καλύψουν τις μεταβολικές του απαιτήσεις, αυξάνεται ισόρροπα (εκθετική φάση). Στη συνέχεια ακολουθεί η φάση της λιπογένεσης, η οποία επάγεται από την εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού, που είναι ικανό να προκαλέσει τη συσσώρευση λιπιδίων και στην οποία έχουμε την παραγωγή λιπιδίων. Η φάση αυτή διαρκεί μέχρι την εξάντληση της πηγής άνθρακα ή κάποιου άλλου θρεπτικού συστατικού που είναι απαραίτητο για τη διεργασία. Τέλος, έχουμε την φάση αποδόμησης λιπιδίων, κατά την οποία πολλοί ελαιογόνοι ετερότροφοι μικροοργανισμοί συνήθως αποδομούν και καταναλώνουν τα συσσωρευμένα λιπίδια. (Holdsworth και Ratledge, 1988; Aggelis και Sourdis, 1997; Alvarez κ.α., 2000; Papanikolaou και Aggelis, 2003a, 2003b; Papanikolaou κ.α., 2004b).

1.2.4. Βιοσύνθεση μικροβιακών λιπιδίων

Ως υλικό εκκίνησης για τη *de novo* βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, χρησιμοποιείται το ακετυλο-CoA, το οποίο με αντιδράσεις κατ' ουσίαν αντίστροφες αυτών της β-οξειδωσης δημιουργεί τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα, τα οποία κατόπιν θα εστεροποιηθούν δίδοντας γένεση στα ενδοκυτταρικά τριακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, κ.λπ. Η προέλευση του ακετυλο-CoA είναι ξεχωριστή αναλόγως με το γεγονός αν ο μικροοργανισμός είναι ελαιογόνος ή όχι. Το ακετυλο-CoA, το οποίο δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, είτε θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, είτε το υλικό δόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Όμως, η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών δομών δεν πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο, αλλά στο κυτταρόπλασμα, ως εκ τούτου το ακετυλο-CoA θα πρέπει εκ νέου να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι περατή από το ακετυλο-CoA, το οποίο εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια σε σχετικά μικρά ποσά υπό την μορφή της ακετυλο-καρνιτίνης και μόνο για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge και Gilbert, 1985; Davies και Holdsworth, 1992). Από την άλλη πλευρά, μεγάλες ποσότητες ακετυλο-CoA οφείλουν να ευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να μετατραπούν σε λιπαρά οξέα στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Στην πραγματικότητα, για να συμβεί κάτι τέτοιο, η αύξηση θα πρέπει να παύσει να είναι ισόρροπη και ικανός περιορισμός στο εξωκυτταρικό (και κατόπιν ενδοκυτταρικό) άζωτο θα πρέπει να επισυμβεί. Έτσι, αρχικά παρατηρείται πτώση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine monophosphate – AMP) που οφείλεται στο ένζυμο απαμινάση της AMP, της οποίας η ενεργότητα αυξάνει με την εξάντληση του αζώτου. Η αντίδραση αυτή ($AMP \longrightarrow IMP + NH_4^+$) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ποσοτήτων αζώτου που θα χρησιμοποιηθούν στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοξέων. Η μείωση της συγκέντρωσης του AMP καταστέλλει τη δράση των ενζύμων 6-φωσφοφρουκτοκινάση (6-Phosphorofructokinase – 6-PFK), πυροσταφυλική κινάση (Pyruvate kinase – PK) και NAD^+ (και σε μερικές περιπτώσεις επίσης και $NADP^+$) ισοκιτρική αφυδρογονάση ($NAD-ICDH$ και $NADP-ICDH$) (Galiotou-Panayotou κ.α., 1998; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α). Στην περίπτωση του περιορισμού της ενεργότητας της 6-PFK παρατηρείται συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

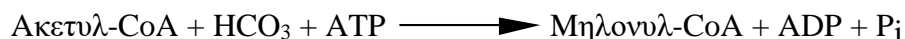
Από την άλλη πλευρά, η μείωση της ενεργότητας των NAD-ICDH και NADP-ICDH προκαλεί αναστολή στη λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, με το συσσωρευμένο στα μιτοχόνδρια κιτρικό οξύ να εξέρχεται του μιτοχονδρίου και να αποτελεί υπόστρωμα στο οποίο πραγματοποιείται η πιο κάτω, χαρακτηριστική της σύνθεσης λιπιδίων αντίδραση, όπου σε μεγάλα ποσά συντίθεται ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα των (κυρίως) ελαιογόνων μικροοργανισμών (Ratledge, 1994, 1997; Papanikolaou και Aggelis, 2011a):



Εικόνα 1.8. Αντίδραση σύνθεσης λιπιδίων

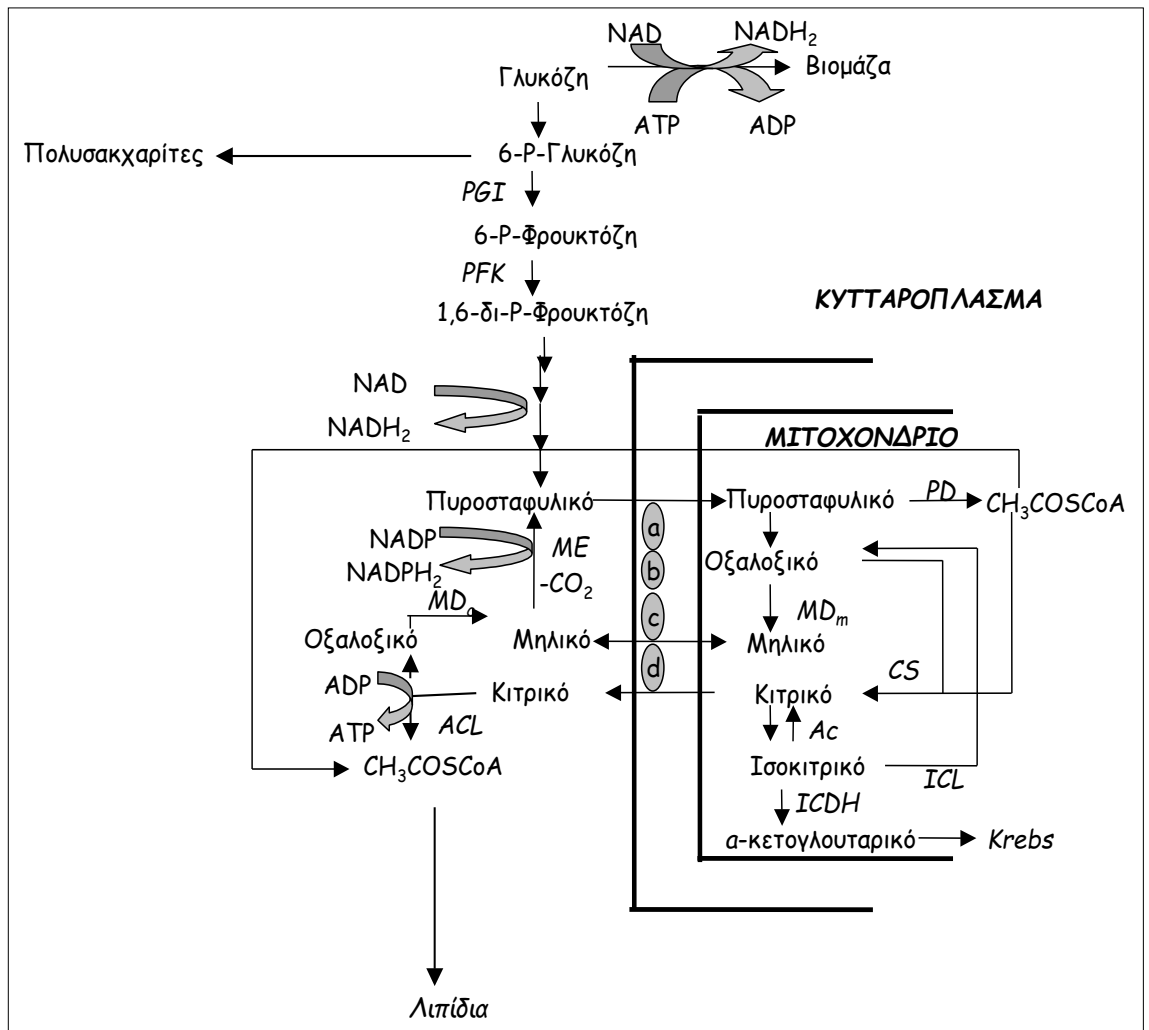
Η ανωτέρω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση (ACL) και (κυρίως στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς) με αυτό τον τρόπο παράγεται στο κυτταρόπλασμα σε μεγάλες ποσότητες το ακέτυλο-CoA, το οποίο θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης για τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων και συνακολούθως των τριγλυκεριδίων στους διαφόρους (ανώτερους και κατώτερους) οργανισμούς μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης, οι οποίες είναι περίπου αντίστροφες αυτών της β-οξειδωσης, καταλυόμενων από το ενζυμικό σύμπλοκο της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS – Fatty Acid Synthetase) (Papanikolaou και Aggelis, 2011a). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ένζυμο ACL μπορεί να ευρίσκεται και σε μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (ειδικά μύκητες; Wynn κ.α., 1998), πλην όμως συνήθως δεν εκφράζεται σε αυτούς. Σε κάθε περίπτωση και ανεξαρτήτως του τρόπου προέλευσης του ακέτυλο-CoA στο κυτταρόπλασμα, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινά με την καρβοξυλίωση του ακέτυλο-CoA προς μηλονυλο-CoA απ’ την καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA (Acetyl-CoA carboxylase-ACC). Η αντίδραση αυτή

δεν είναι αντιστρεπτή και αποτελεί το καθοριστικό βήμα της βιοσυνθετικής οδού (Ratledge, 1994; Papanikolaou και Aggelis, 2011a):



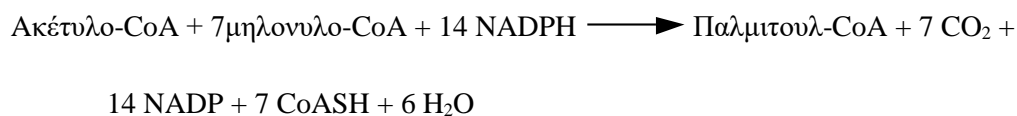
Η αντίδραση αυτή ενεργοποιείται με την παρουσία του κιτρικού οξέος για την ελαιογόνο ζύμη *Candida* sp. 107, αλλά όχι για τη μη-ελαιογόνο *Candida utilis*, ενώ με την απουσία του κιτρικού οξέος το ανωτέρω ένζυμο υπάρχει ως ανενεργός πρωτεΐνη με M.B. $2,4 \times 10^5$ daltons, ενώ η παρουσία του κιτρικού οξέος επάγει τη συσσωμάτωση των ενζυμικών μονομερών σε ένα πολυενζυμικό ενεργό σύστημα με M.B. $7-9 \times 10^6$ daltons (Papanikolaou και Aggelis, 2011a). Στη συνέχεια, οι ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο-ομάδες και μηλονυλο-ομάδες σε μια ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη (Acyl carrier protein-ACP). Έπειτα, το ενζυμικό σύστημα της συνθέσεως των λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase-FAS) προσθέτει διαδοχικά δυο άτομα άνθρακα στη μηλονυλο-ACP, έως ότου το μήκος της αλυσίδας φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα.

Η τελική αντίδραση διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό {(Βλ. σχετικά Εικόνα 1.9.), όπου η ροή άνθρακα με το ισομερές πάχος των βελών φαίνεται ισοσκελισμένη τόσο προς τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, όσο και προς τα ενδοκυτταρικά πολυσακχαρίδια, όσο και προς τον κύκλο του Krebs. Ένζυμα: ACL: ATP-κιτρική λυάση, PGI: Ισομεράση της φωσφορογλυκόζης, PFK: Φωσφοροφρουκτοκινάση, ICDH: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, PD: Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, CS: Κιτρική συνθάση, ICL: Ισοκιτρική λυάση (προσαρμογή σχημάτων από τους Zhong και Tang, 2004; Papanikolaou και Aggelis, 2011a)}.



Εικόνα 1.9. Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια.

Η τελική αυτή αντίδραση περιλαμβάνει είτε τη μεταφορά της ακυλο-ομάδας απ' την ACP στο CoA ή την υδρόλυση της ακυλο-ACP προς ελεύθερο λιπαρό οξύ. Η στοιχειομετρία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι (Paranikolaou και Aggelis, 2011a):



Τα διάφορα συμβαίνοντα (σύνθεση πολυσακχαριτών, σύνθεση λιπιδίων μέσω ACL για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σύνθεση λιπιδίων μέσω απ' ευθείας συμπύκνωσης του ακέτυλο-CoA για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς) σε επίπεδο διάμεσου μεταβολισμού παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα της Εικόνας 1.9.

1.2.5. Τα λιπίδια των μανιταριών

Τα μανιτάρια που αποτελούν τους ανώτερους μύκητες δεν περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Συγκεκριμένα στο μυκήλιό τους φτάνουν ποσοστό μικρότερο του 10% w/w. ενώ στο καρπόσωμά τους συναντώνται ακόμα μικρότερες τιμές λίπους. Το σύνολο των ολικών λιπιδίων των ανώτερων μυκήτων ποικίλει βάσει του είδους και μπορεί να κυμανθεί από 0,6 έως και (σε ορισμένες περιπτώσεις) 37% w/w. επί ξηρού (Miric κ.α., 1985; Hiroi και Tsuyuki, 1988; Hong κ.α., 1988; Losel, 1988; Huang κ.α., 1999; Chang και Miles, 2004; Tsai κ.α., 2006). Πολλές ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν ότι η ποσότητα (σε % w/w επί ξηρού), το ποσοστό (σε % w/w επί των συνολικών λιπιδίων) των διαφόρων κλασμάτων (ουδέτερο κλάσμα NL, κλάσμα γλυκολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων G+S, κλάσμα φωσφολιπιδίων PL), καθώς επίσης και η σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αύξησης δεν είναι σταθερά, η δε φυσιολογική σημασία των μεταβολών αυτών μπορεί να συσχετιστεί με τις φάσεις της αύξησης του μικροοργανισμού και τις φυσικοχημικές μεταβολές του μέσου καλλιέργειας (π.χ. αλλαγές στο pH, στο ποσοστό κορεσμού σε οξυγόνο, κ.λ.π.). Συγκεκριμένα, το ουδέτερο κλάσμα αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες σε ποσοστό 55-80% w/w. Σημαντικό παράγοντα στην συσσώρευση λίπους πέραν των φυλογενετικών χαρακτηριστικών του κάθε στελέχους παίζει και η εξωκυτταρική διαθεσιμότητα σε άζωτο καθώς και ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος από το μικροοργανισμό (Fakas, 2007; Paranikolaou κ.α., 2007). Ο καθοριστικότερος όμως παράγοντας για την λιπογένεση του μικροοργανισμού είναι ο λόγος άνθρακα/άζωτο (C/N) του υποστρώματος. Για να έχουμε συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων πρέπει ο λόγος C/N να είναι υψηλός. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος αυτός, τόσο μεγαλύτερη και η συσσώρευση λιπιδίων μέχρι μια μέγιστη τιμή, πέραν της οποίας έχουμε μείωση (Moreton, 1988). Η αύξηση του παραγόμενου λίπους μπορεί συνεπώς να επιτευχθεί με μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου (Reusser κ.α., 1957) ή με αύξηση της συγκέντρωσης σε άνθρακα. Όσον αφορά στο πολικό κλάσμα, στα φωσφολιπίδια δηλαδή, σύμφωνα με την βιβλιογραφία κυριαρχούν η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε ποσοστό 33-50% w/w και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) σε ποσοστό 13-37 % w/w (Wassef και Hendrix, 1977; Kemp κ.α., 1984). Ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) (Paltauf και Schats, 1969; Goni κ.α., 1978). Βέβαια, η

σύνθεση των PL διαφοροποιείται ανάλογα με τα γενετικά και διατροφικά χαρακτηριστικά κάθε ευκαρυωτικού μικροοργανισμού.

1.2.6. Χημική Σύσταση λιπιδίων βασιδιομυκήτων

Το μικροβιακό λίπος είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό $\Delta^9,12\text{C}18:2$ και παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαφέρουν σε σχέση με το λίπος φυτικής ή ζωικής προέλευσης, καθώς αυτό εμφανίζει διακυμάνσεις στην σύστασή του τόσο σε ακόρεστα όσο και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα. Οι μελέτες που έχουν γίνει στα μανιτάρια είναι περιορισμένες σε σχέση με αυτές που έχουν γίνει για άλλους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε στην σύσταση των λιπαρών οξέων του *A. aegerita* βρέθηκε πως κυρίαρχο λιπαρό οξύ αποτελεί το λινελαϊκό οξύ, ακολουθεί το παλμιτικό οξύ και στην συνέχεια ελαϊκό και στεατικό (Shuai κ.α., 2012), ενώ ο λόγος ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα βρέθηκε ίσος με 3.80. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την υγεία του ανθρώπου και έχουν ισχυρό ευεργετικό αποτέλεσμα στην πρόληψη και τη διαχείριση των καρδιαγγειακών παθήσεων, της αρτηριακής πίεσης κ.λπ., ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που υπάρχουν σε υψηλότερες ποσότητες σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι συνήθως συνδεδεμένα με αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα και συχνά περιοχές που σχετίζονται με την υπέρταση (Simopoulos, 1999). Αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες σε διάφορα μανιτάρια (*Volvariella volvacea*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis*) δείχνουν πως 75% του συνόλου των λιπαρών οξέων είναι ακόρεστα με το λινελαϊκό οξύ να βρίσκεται σε ποσότητα 76% στο *L. edodes*, 70 % στο *V. volvacea*, και 69% στο *A. bisporus* (Chang και Miles, 2004).

Πίνακας 1.3. Βιβλιογραφικές αναφορές ανώτερων μυκήτων και οι αντίστοιχες τιμές που σημειώθηκαν για τη σύσταση των ολικών τους λιπιδίων σε διάφορα θρεπτικά μέσα και στο καρπόσωμα

| Είδος μύκητα | Μορφή μύκητα/ Συνθήκες καλλιέργειας | Ολικάλιπιδία (% w/w) | C 16:0 Παλμιτικό οξύ (%) | ^{Δ9} C18:1 Ελαιϊκό οξύ (%) | ^{Δ9,12} C18:2 Λινελαϊκό οξύ (%) | Κορεσμένα Λ.Ο. (% w/w) | Ακόρεστα Λ.Ο. (% w/w) | U.I. | Βιβλιογραφική αναφορά |
|--|---|----------------------|-----------------------------|--|---|------------------------|-----------------------|------|---|
| Μανιτάρια (π.χ. <i>M. conica</i> , <i>P. sajor-caju</i>) | Καρποσώματα από δάση | 0,6- 4,7 (2,6) | 4,6 - 24,7 (8,5) | (11,3) | (68,6) | 13,0– 48,0 (18,5) | 52,0– 87,0 (81,5) | - | Kavishree κ.α., 2008 |
| <i>P. sajor-caju</i> | Μυκήλιο, 10 g/L, 30 C/N | 5,7 | 24,0 | 8,0 | 61,0 | 25,0 | 73,0 | 1,3 | Nair κ.α., 1989 |
| <i>M. esculenta</i> | Καρποσώματα από δάση | - | 11,0 | 24,1 | 12,6 | - | - | - | Řezanka κ.α., 1999 |
| <i>P. ostreatus</i> | Μυκήλιο, Τύρφη 45 g/L | 3,7 3,0 | 17,0 18,4 | 18,6 18,4 | 44,9 43,2 | - | - | - | Manu-Tawiah και Martin, 1987 |

| | | | | | | | | | |
|--|--|-----|------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|--------------|----------|---------------------------------|
| | (150 rpm, 28 °C, pH=5, 8 ημ.) Καρπόσωμα | 2,2 | 16,6 | 15,2 | 36,3 | | | | |
| <i>F. velutipes</i> | Μυκήλιο σε καλλιέργεια βυθού 8 C/N 15 C/N 40 C/N | - | 13,3 | 0,7 | 4,7 | 18,4 | 5,9 | - | Bespalova κ.α., 2002 |
| <i>A. bisporus</i> <i>P. ostreatus</i> | Καρποσώματα από δάση | - | - | - | - | 27,6 20,2 | 47,2 65,0 | - | Yilmaz κ.α., 2006 |
| <i>G. applanatum</i> | Καρποσώματα από δάση | 3,1 | - | - | - | 36,0 | 63,0 | 1,3 3 | Pedneault κ.α., 2008 |
| <i>P. ostreatus</i> <i>P. pulmonarius</i> | Μυκήλια | | 13,0 – 22,78 12,29 – 23,0 | 13,0-34,0 13,0-17,0 | 42,76-65,48 45,42-59,19 | | | | Dimou κ.α., 2002 |
| <i>P. ostreatus</i> | Καρπόσωμα (27°C) | 4,2 | 13,0 | 9,5 | 68,0 | 26,5 | 80,0 | 1,8 0 | Pedneault κ.α., 2008 |
| <i>A. aegerita</i> | Καρπόσωμα | 3,3 | 13,07 | 3,03 | 78,40 | 17,93 | 82,07 | 3,8 | Suai κ.α., 2012 |
| <i>B. reticulatus</i> | Καρπόσωμα | - | 11,26 | 37,61 | 36,60 | 21,14 | 78,74 | 3,7 | Ergönül κ.α., 2013 |
| <i>L. salmonicolor</i> | Καρπόσωμα | - | 7,76 | 18,98 | 59,44 | 18,96 | 81,04 | 4,3 | |

| | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|--------------------------------------|
| <i>F. velutipes</i> | Καρπόσωμα | - | 14,56 | 16,37 | 40,87 | 20,67 | 79,33 | 3,8 | Diamantopoulou κ.α., 2014 |
| <i>P. osteatus</i> | Καρπόσωμα | - | 12,40 | 10,36 | 65,29 | 21,77 | 78,23 | 3,6 | |
| <i>P. squamosus</i> | Καρπόσωμα | - | 17,21 | 33,02 | 38,91 | 25,19 | 74,81 | 3 | |
| <i>R. anthracina</i> | Καρπόσωμα | - | 9,16 | 52,11 | 22,39 | 23,72 | 76,28 | 3,2 | |
| <i>A. aegerita</i> | Μυκήλιο | 9,6 | 24,00 | 25,5 | 49,0 | - | - | - | |
| <i>M. esculenta</i> | Μυκήλιο | 19.8 | 21.80 | 35.10 | 32.3 | - | - | - | |

1.2.7. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού ενός μείγματος στα διάφορα συστατικά του. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται η ετερογενής ισορροπία που καθιερώνεται κατά τη ροή ενός διαλύτη που ονομάζεται κινητή φάση μέσω μιας σταθερής (στατικής) φάσης για να διαχωριστούν δύο ή περισσότερα συστατικά από το υλικό που μεταφέρεται από τον διαλύτη. Η πιο κοινή μορφή χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία προσρόφησης (Tswett, 1903 ; Kuhn και Lederer, 1931). Εδώ η στατική φάση είναι συνήθως πηκτή πυριτίας (silica gel) η οποία μπορεί να περιέχει θειικό ασβέστιο ως συνδετικό μέσο για να εξασφαλίσει την πρόσφυση της πηκτής στο υπόστρωμα. Τέτοια μείγματα ονομάζονται ‘silica gel G’. Σήμερα οι περισσότεροι αναλυτές αγοράζουν προ-επικαλυμμένες πλάκες (σε γυάλινη, πλαστική ή αλουμινένια υποστήριξη) που είναι έτοιμες για άμεση χρήση (Christie, 2003). Το δείγμα που εξετάζεται, εφαρμόζεται σε ένα άκρο αυτής της στατικής φάσης και η κινητή φάση αφήνεται να ρέει διαμέσου αυτής.

Οι πολικές ενώσεις είναι αυτές που συγκρατούνται περισσότερο από την στατική φάση, ενώ οι μη πολικές ουσίες τείνουν να κινηθούν προς τα πάνω με την κινητή φάση. Ο διαχωρισμός γίνεται όταν μια ουσία σε ένα μείγμα προσροφάται περισσότερο από στη στατική φάση από ότι τα άλλα συστατικά του μείγματος. Δεδομένου ότι η προσρόφηση είναι ουσιαστικά φαινόμενο επιφάνειας, ο βαθμός διαχωρισμού εξαρτάται από την επιφάνεια του προσροφητικού που είναι διαθέσιμο.

1.2.7.1. Η Στατική Φάση

Σήμερα, υπάρχουν πολλές διαφορετικές πλάκες που διατίθενται στο εμπόριο και είναι δυνητικά χρήσιμες στον διαχωρισμό των λιπιδίων. Η πιο κοινή είναι η γυάλινη πλάκα διαστάσεων 20x20cm ή 20x10cm. Είναι ανθεκτική στα οξέα και τα αλκάλια που χρησιμοποιούνται για ως συστήματα ανάπτυξης καθώς και στα σπρέι ανίχνευσης και η ακαμψία της, την καθιστά κατάλληλη για μέτρηση της πυκνότητας. Τα φύλλα αλουμινίου και τα πλαστικά φύλλα χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως και έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να κοπούν εύκολα για να δημιουργήσουν μικρές πλάκες, εάν αυτό είναι απαραίτητο. Εκτός από το υλικό της πλάκας υπάρχουν και πολλά είδη του

υλικού ρόφησης. Παραδείγματα είναι η σκόνη κυτταρίνης, το άμυλο, τα πολυαμίδια, αλλά τα πιο δημοφιλείς για διαχωρισμούς λιπιδίων αποτελούν το silicagel, η αλουμίνα και το kieselguhr. Αυτά τα προσροφητικά μπορούν επίσης να τροποποιηθούν με εμποτισμό με άλλες ουσίες έτσι ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητοί διαχωρισμοί. Το silica gel είναι αυτό που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στους διαχωρισμούς των λιπιδίων. Τα μέσου μεγέθους σωματίδια στην παραδοσιακή TLC κυμαίνονται μεταξύ 10 μm και 50 μm, με μία αρκετά ευρεία κατανομή μεγέθους. Η στατική φάση όπως το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) είναι πολική και η κινητή φάση είναι σχετικά μη πολική. Ο Scott (1982) έχει εξετάσει το silica gel και τις ιδιότητές του, την απορρόφηση νερού της επιφάνειας της silica καθώς και την αλληλεπίδρασή της με πολικούς και μη πολικούς διαλύτες.

Πολύ σημαντικό παράγοντα στην στατική φάση αποτελεί το «προ-πλύσιμο» της πλάκας, όπως και η ρύθμιση της υγρασίας του silica gel. Οι πλάκες στην επιφάνειά τους μπορούν συλλέξουν όχι μόνο νερό αλλά και βρωμιά από τη γύρω ατμόσφαιρα. Αυτή πρέπει να αφαιρεθεί ώστε να μην σχηματίσει βρώμικες ζώνες σε ορισμένα συστήματα διαλύτη. Το στάδιο καθαρισμού είναι γνωστό ως προ-πλύσιμο. Παρέχει ένα ομοιόμορφα καθαρό υπόβαθρο πλάκας για οπτική εκτίμηση και ευνοϊκότερη γραμμή βάσης. Στη συνέχεια αφαιρείται η υγρασία με θέρμανση της πλάκας στους 120 βαθμούς για μισή ώρα. (Applied thin layer chromatography, Best practice and avoidance of mistakes).

1.2.7.2. Η Κινητή Φάση

Στην κανονική του μορφή, το silica gel είναι ένα πολικό προσροφητικό. Κατά συνέπεια, τα πολικά λιπίδια είναι πιο στενά προσροφημένα από τα μη πολικά λιπίδια λόγω των πολικών αλληλεπιδράσεων. Αυτό συχνά ονομάζεται TLC κανονικής φάσης. Στον διαχωρισμό των λιπιδίων με χρήση silica gel, τα πλέον μη πολικά λιπίδια μετατοπίζονται με ταχύτερο ρυθμό (υψηλές τιμές Rf) και τα πολικά λιπίδια με τους βραδύτερους ρυθμούς (χαμηλές τιμές Rf) (Hamilton και Hamilton, 1992). Με την αύξηση της πολικότητας του αναπτυσσόμενου συστήματος διαλύτη οι τιμές Rf του συστατικού μπορούν να αυξηθούν, οπότε η επιλογή ενός κατάλληλου συστήματος

διαλύτη είναι κρίσιμη για τον διαχωρισμό των διαφόρων κατηγοριών λιπιδίων (Πίνακες 1.4. και 1.5.).

Πίνακας 1.4. Ουδέτερα λιπίδια και τα αντίστοιχα Rf τους σε τρία συστήματα ανάπτυξης προσαρμοσμένα από τους Hamilton και Hamilton (1992)

| Λιπίδια | 1 | 2 | 3 |
|--|----------|----------|----------|
| Υδρογονάνθρακες | 0,95 | - | - |
| Εστέρες στερολών | 0,90 | 0,94 | 0,94 |
| Εστέρες κηρών | 0,90 | 0,92 | 0,94 |
| Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων | 0,65 | 0,81 | 0,94 |
| Τριακυλογλυκερόλες | 0,35 | 0,73 | 0,86 |
| Λιπαρά οξέα | 0,18 | 0,33 | 0,39 |
| Λιπαρές αλκοόλες | 0,15 | 0,28 | 0,29 |
| Στερόλες | 0,10 | 0,24 | 0,24 |
| 1,3-διακυλογλυκερόλες | 0,08 | 0,24 | 0,26 |
| 1,2-διακυλογλυκερόλες | 0,08 | 0,21 | 0,24 |
| Μονοακυλογλυκερόλες | 0,00 | 0,03 | 0,03 |
| | | | |
| Σύστημα ανάπτυξης: | | | |
| 1. Πετρελαϊκός αιθέρας: διαιθυλαιθέρας: οξικό οξύ (90:10:1 v/v) | | | |
| 2. Εξάνιο: διαιθυλαιθέρας: οξικό οξύ (80:20:2 v/v) | | | |
| 3. Εξάνιο: διαιθυλαιθέρας: οξικό οξύ (70:30:3 v/v) | | | |

Πίνακας 1.5. Πολικά λιπίδια και τα αντίστοιχα Rf τους σε δύο συστήματα ανάπτυξης προσαρμοσμένα από www.avantilipids.com

| Λιπίδια | 1 | 2 |
|---------------------------------------|----------|----------|
| Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) | 0,79 | 0,55 |
| Φωσφατιδυλογλυκερόλη | 0,60 | 0,50 |
| Φωσφατιδύλο (Διμεθυλοαιθανολαμίνη) | 0,58 | 0,56 |

| | | |
|--|------|------|
| Φωσφατιδικό οξύ | 0,55 | 0,05 |
| Φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) | 0,39 | 0,10 |
| Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) | 0,34 | 0,30 |
| Φωσφατιδυλοσερίνη (PS) | 0,33 | 0,12 |
| Κερεβροζίτες | 0,94 | 0,55 |
| Σφιγγοσίνη | 0,28 | 0,75 |
| Σφιγγομυελίνη | 0,28 | 0,13 |
| Λυσο-φωσφατιδυλογλυκερόλη | 0,54 | 0,20 |
| Λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη | 0,45 | 0,20 |
| Λυσο-φωσφατιδικό οξύ | 0,40 | 0,01 |
| Λυσοφωσφατιδυλινοσιτόλη | 0,29 | 0,03 |
| Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη | 0,22 | 0,08 |
| Λυσο-φωσφατιδυλοσερίνη | 0,18 | 0,02 |
| | | |
| Σύστημα ανάπτυξης: | | |
| 1. Χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό (65:25:4 v/v) | | |
| 2. Χλωροφόρμιο: μεθανόλη: αμμωνία 25% (65:25:4 v/v) | | |

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό απλών ουσιών όπως τα ουδέτερα λιπίδια συνήθως περιέχουν μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο, διαιθυλαιθέρα και οξικό ή μυρμηκικό οξύ σε διάφορες αναλογίες (Hamilton και Hamilton, 1992), βέβαια και άλλα συστήματα διαλύτη έχουν χρησιμοποιηθεί όπως παρατίθεται στον πίνακα παρακάτω. Αν τα δείγματα παραμένουν πίσω στη γραμμή εκκίνησης, επιλέγεται ένας διαλύτης με μεγαλύτερη δύναμη έκλουσης και αντίθετα, εάν ταξιδεύουν στο μέτωπο του διαλύτη, χρησιμοποιείται ένας ασθενέστερος διαλύτης. Η προσθήκη μίας μικρής ποσότητας οξέος (π.χ. 1% οξικό οξύ), συχνά προκαλεί σημαντική αύξηση στα Rf (Kurt, 1968). Οι τύποι των πολικών λιπιδίων που υπάρχουν σε ένα εκχύλισμα λιπιδίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή τους και υπάρχουν πολύ εμφανείς διαφορές μεταξύ φυτικών, ζωικών και μικροβιακών λιπιδίων (Hamilton και Hamilton, 1992).

Λόγω των μεγάλων διαφορών που υπάρχουν στην πολικότητα μεταξύ των κατηγοριών των πολικών λιπιδίων, δεν υπάρχει ένα ενιαίο σύστημα TLC το οποίο να μπορεί να τα διαχωρίσει πλήρως όλα από την ανάπτυξη σε μία διάσταση. Για το λόγο αυτό, ένας πιο επαρκής διαχωρισμός των πολικών λιπιδίων μπορεί να επιτευχθεί με TLC δύο διαστάσεων. Τα περισσότερα από τα συστήματα διαλυτών που περιγράφονται για τον διαχωρισμό πολικών λιπιδίων βασίζονται στη χρήση χλωροφορμίου και μεθανόλης ως κύρια συστατικά (Lepage, 1964; Skipski, κ.α., 1964; Kurt, 1968; Ruiser κ.α., 1970; Touchstone, 1992; Christie και Han, 2010; Fush κ.α., 2010). Λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν εμπορικά πρότυπα για κάθε σύνθετο λιπίδιο, η χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων χρώσης είναι συνεπώς ιδιαίτερα χρήσιμη για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πολικών λιπιδίων που διαχωρίζονται με TLC.

1.2.7.3. Εναπόθεση του Δείγματος και των Προτύπων

Η ποιότητα της ανάλυσης λιπιδίων με TLC εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσεκτική εναπόθεση του δείγματος στο προσροφητικό. Στις περισσότερες περιπτώσεις εφαρμόζονται δείγματα ως κηλίδες, 2-3 mm ή στενές ζώνες διαμέτρου 5-10 mm, 1,5-2 cm από το κάτω άκρο της πλάκας (Skipski, κ.α., 1967, Christie και Han, 2010). Τα δείγματα όπως και τα πρότυπα καλό είναι να είναι διαλυμένα σε άπολους διαλύτες (Skipski, κ.α., 1967; Marinetti, 1967; Kurt, 1968 ; Hamilton και Hamilton, 1992; Touchstone, 1992; Christie και Han, 2010). Συνήθως, χρησιμοποιείται ένα μείγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 (v/v) (Pernes κ.α., 1989). Πολύ πολικοί διαλύτες δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στην TLC για τη διάλυση στερεών δειγμάτων ή την αραίωση υγρών μιγμάτων. Αυτά δίνουν μεγάλες κηλίδες στην θέση εφαρμογής του δείγματος. Εάν είναι πραγματικά αναγκαίο, πρέπει να εφαρμόζονται πολύ μικρές ποσότητες διαδοχικά και ο διαλύτης να αφαιρείται μεταξύ της κάθε προσθήκης με ρεύμα θερμού αέρα. Προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε οι ουσίες να μην κρυσταλλώνονται στο σημείο εκκίνησης. Για να αποφευχθεί η οξείδωση, προστίθενται αντιοξειδωτικά όπως το BHT σε επίπεδο 0,01% στο δείγμα, στον διαλύτη έκλυσης ή στα αντιδραστήρια για την προστασία των λιπιδίων κατά τη διάρκεια των επόμενων αναλύσεων (Christie και Han, 2010).

Η εναπόθεση πρότυπων διαλυμάτων και προκαθορισμένων όγκων συνιστάται, ακόμη και στην αποκαλούμενη ποιοτική χρωματογραφία. Για την εναπόθεση των δειγμάτων,

διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί. Συνήθως χρησιμοποιούνται τριχοειδή σωληνίσκοι μιας χρήσης με χωρητικότητα 1-100 μL . Οι μικροσύριγγες χρησιμοποιούνται επίσης συχνά στην εναπόθεση δειγμάτων στην TLC.

Η συσκευή Linomat της Camag έχει δημιουργηθεί για την εναπόθεση δειγμάτων ως στενές ζώνες με υψηλή ακρίβεια για σωστή ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Η τεχνική του ψεκασμού με την οποία λειτουργεί το μηχάνημα επιτρέπει να εναποτίθενται σε στενή ζώνη μεγάλη συγκέντρωση (Touchstone, 1992). Τα δείγματα πρέπει να εφαρμόζονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα, επειδή το silica gel είναι υγροσκοπικό υλικό και η απορρόφηση νερού από τον αέρα προχωρά γρήγορα (Skipski, κ.α., 1967). Αν και οι κατηγορίες λιπιδίων μπορούν να ταυτοποιηθούν με αναφορά σε δημοσιευμένες τιμές Rf, η εφαρμογή προτύπων λιπιδίων, είτε ως μείγμα είτε μεμονωμένα, παράλληλα με το αναλυόμενο λιπίδιο, βοηθά σημαντικά στην ταυτοποίηση των συστατικών που υπάρχουν στο δείγμα καθώς οι τιμές Rf σε ένα εργαστήριο σε ένα δεδομένο σύστημα διαλυτών δεν είναι πάντα σταθερές λόγω πολλών παραγόντων (Hamilton και Hamilton, 1996). Έτσι, με την ανάλυση των προτύπων λιπιδίων παράλληλα με τα δείγματα γίνεται μία ακριβέστερη ταυτοποίηση.

Για ποιοτική εργασία η βέλτιστη συγκέντρωση της πρότυπης ένωσης είναι 2-5 mg / mL (ανάλογα με τον τύπο του προτύπου), η οποία επιτρέπει την εφαρμογή της απαιτούμενης ποσότητας σε όγκο 5-10 μL . Η συγκέντρωση του δείγματος θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 20-30 mg/mL. Ωστόσο, η φύση του πειράματος και ο τύπος του λιπιδίου που μελετάται συχνά καθιστά αναγκαία την παρέκκλιση από αυτά τα όρια (Skipski, κ.α., 1967).

1.2.7.4. Θάλαμος Ανάπτυξης

Μεταξύ ενός απλού βάζου με βιδωτό καπάκι και ενός αυτοματοποιημένου συστήματος πολλαπλής ανάπτυξης υπάρχει ένα ευρύ φάσμα θαλάμων ανάπτυξης TLC, που διαφέρουν μεταξύ τους στο υλικό κατασκευής, αλλά κυρίως στην τιμή, αλλά και στο χρωματογραφικό αποτέλεσμα που επιτυγχάνεται στα διάφορα πεδία εφαρμογής. Οι θάλαμοι για την "κλασική" ανερχόμενη χρωματογραφία είναι από γυαλί και έχουν καπάκι από γυαλί ή ανοξειδωτο χάλυβα. Όλοι οι αυτόματοι θάλαμοι που

χρησιμοποιούνται σήμερα στον αναλυτικό εξοπλισμό είναι ενσωματωμένοι σε μεταλλικό περίβλημα που συσκευάζεται με ηλεκτρονικά κυκλώματα (Εικόνα 1.10.) .



Εικόνα 1.10. Θάλαμοι ανάπτυξης

1.2.7.5. Συστήματα Ανίχνευσης

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της TLC είναι ότι τα διαχωρισμένα κλάσματα λιπιδίων μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν με χρήση κάποιου αντιδραστηρίου εμφάνισης. Εκτός από τις γενικές μεθόδους ανίχνευσης (θάλαμος ιωδίου), υπάρχουν επίσης ορισμένες ειδικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, τα ακόρεστα λιπίδια μπορούν να εντοπιστούν χωρίς ψεκασμό, σε στρώματα που περιέχουν δείκτη φθορισμού, με εξέταση υπό υπεριώδες φως (Kurt, 1968). Πολλά διαφορετικά αντιδραστήρια είναι σήμερα διαθέσιμα συχνά ακόμη και ως έτοιμα διαλύματα στο εμπόριο (Wang κ.α., 2003). Αυτά τα διαλύματα μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το αν η δράση τους είναι γενική ή ειδική για κάποια κατηγορία λιπιδίων και εάν είναι καταστρεπτικά ή μη-καταστρεπτικά.

1.2.7.5.α. Μη Καταστρεπτικά, Μη Ειδικά

Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η έκθεση της αναπτυγμένης πλάκας TLC σε ατμούς ιωδίου που σχηματίζουν ένα μη ομοιοπολικό, καφέ σύμπλεγμα με τα λιπίδια. Δυστυχώς, εντούτοις, τα πλήρως κορεσμένα λιπίδια χρωματίζονται δύσκολα, ενώ το ιώδιο δεν μπορεί να απομακρυνθεί πλήρως από τα πολύ ακόρεστα λιπίδια, επειδή το ιώδιο συνδέεται χημικά με τους διπλούς δεσμούς (Vioque κ.α., 1962;

Touchstone, 1992). Η χρώση με 2,7-διχλωροφλουορεσκεΐνη ή ροδαμίνη 6G (Marinetti, 1964) δίνει κίτρινες ή ροζ κηλίδες, αντίστοιχα, αν η πλάκα TLC φωτίζεται με υπεριώδη ακτινοβολία. Η ροδαμίνη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν χρησιμοποιούνται συστήματα αλκαλικών διαλυτών και η 2,7-διχλωροφλουορεσκεΐνη προτιμάται με όξινους διαλύτες λόγω της σταθερότητας των χρώσεων (Fush κ.α., 2010). Και οι δύο χρωστικές μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν αν αλλάξει η πολικότητα του διαλύτη ή το λιπίδιο (με τη συνδεδεμένη χρωστική ουσία) περάσει από μια μικρή στήλη. Αυτό ισχύει επίσης και για την χρωστική πριμουλίνη (Skipski, 1975; White κ.α., 1998) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με παρόμοιο τρόπο με τη ροδαμίνη (Kishimoto κ.α., 2001).

1.2.7.5.β. Καταστρεπτικά, Μη Ειδικά

Ο ψεκασμός της πλάκας TLC με ένα διαβρωτικό αντιδραστήριο για να καταστούν τα λιπίδια ορατά ως σκουρόχρωμες ζώνες είναι μια πολύ κοινή μέθοδος (Fush κ.α., 2010). 50% θειικό οξύ είτε σε μεθανόλη είτε σε νερό είναι ένα τυπικά χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλύτη και στη συνέχεια θέρμανση της πλάκας στους 120 °C για περίπου 1 ώρα. Τα κορεσμένα και τα ακόρεστα λιπίδια απαιτούν διαφορετικούς χρόνους. Οι εντάσεις αυτών των μαύρων σημείων μπορούν επίσης να αναλυθούν ποσοτικά χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο εξοπλισμό ή λογισμικό. Πολλά διαφορετικά αντιδραστήρια όπως το φωσφομολυβδαινικό οξύ (20%) σε αιθανόλη (Christie και Han, 2010), διχρωμικό κάλιο (5%) σε θειικό οξύ 40% ή οξικός χαλκός 3-6% σε φωσφορικό 8-10%, αναφέρθηκε επίσης ότι είναι δυνητικά χρήσιμα (Hamilton και Hamilton, 1996; Fush κ.α., 2010).

1.2.7.5.γ. Καταστρεπτικά, Ειδικά

Αυτά τα αντιδραστήρια και οι μέθοδοι για τη χρήση τους είναι συνήθως πιο περίπλοκα από τις μη ειδικές χρωστικές. Περιλαμβάνουν γενικά μια χημική ουσία ή χημικές ουσίες που αντιδρούν με συγκεκριμένες ομάδες στα λιπίδια και έχουν ως αποτέλεσμα το λιπίδιο να χρωματίζεται ή να καθίσταται ορατό με κάποιο τρόπο. Μια έρευνα των πλέον χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων συνοψίζεται στον παρακάτω Πίνακα 1.6.

Πίνακας 1.6. Ειδικά αντιδραστήρια για εμφάνιση συγκεκριμένων λιπιδιακών τάξεων

| Λιπιδιακές τάξεις | Αντιδραστήρια | Αποτελέσματα |
|---|------------------------------|--|
| Στερόλες και εστέρες στερολών | Τριχλωριούχος Σίδηρος | Δημιουργούνται κόκκινες έως κίτρινες κηλίδες. Η αντίδραση είναι ταχύτερη με την ελεύθερη στερόλη παρά με τους εστέρες (Dudzinski, 1967). Αντιδρά επίσης με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. |
| Ελεύθερα λιπαρά οξέα | 2,7 Διχλωροφλουορεσκεΐνη | Δημιουργείται ρόζ χρώμα μετά από μερικά λεπτά σε χρώμα UV (Kurt, 1968) |
| Φωσφολιπίδια | MoO ₃ /μολυβδένιο | Δημιουργούνται μπλέ κηλίδες σε λευκό φόντο (Dittmer και Lester, 1964) |
| Φωσφολιπίδια που περιέχουν ελεύθερη αμινομάδα | Νινυδρίνη | Το PE, το PS και τα αντίστοιχα λυσολιπίδια ανιχνεύονται ως κόκκινες-κίτρινες κηλίδες (Marinetti, 1964; Valls κ.α., 2002) |
| Γλυκολιπίδια | α-Ναφθόλη/θειικό οξύ | Όλα τα γλυκολιπίδια (συμπεριλαμβανομένων των κερεβροζιτών) ανιχνεύονται ως μπλε-μοβ κηλίδες σε λευκό φόντο. (Kawanami, 1967; Skipski, κ.α., 1967; Neskovic, κ.α., 1972) |

1.2.8. Μεθυλεστεροποίηση Λιπιδίων (Christie, 2012)

Για να προσδιοριστεί η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία (GC), απαιτείται η μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Για το σκοπό αυτό, τα περιεχόμενα λιπαρά οξέα των λιπιδίων μετατρέπονται στο απλούστερο ευκόλως πτητικό παράγωγο, συνήθως μεθυλεστέρες, αν και άλλοι εστέρες μπορεί να προτιμώνται για διαφορετικούς σκοπούς. Η παρασκευή τέτοιων εστέρων έχει επομένως γίνει μακράν ο πιο κοινός τύπος χημικής αντίδρασης για τους αναλυτές λιπιδίων.

1.2.8.1. Εστεροποίηση και μεθυλεστεροποίηση καταλυόμενη με οξύ

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μπορούν να εστεροποιηθούν και τα Ο-ακυλο λιπίδια, όπως τριακυλογλυκερόλες, μπορούν να μετεστεροποιηθούν με θέρμανση με μεγάλη περίσσεια άνυδρης μεθανόλης παρουσία οξέος ως καταλύτη.

Με την παρουσία νερού, η αντίδραση αναστέλλεται. Το συνηθέστερο αντιδραστήριο είναι το άνυδρο υδροχλώριο 5% (w/v) σε μεθανόλη και παρασκευάζεται συνήθως με διαβίβαση αερίου υδροχλωρίου σε ξηρή μεθανόλη. Μια απλούστερη και ασφαλέστερη διαδικασία, πιο κατάλληλη για παρασκευάσματα μικρής κλίμακας, είναι να προστεθεί ακετυλοχλωρίδιο (5 mL) βραδέως σε ψυγμένη ξηρή μεθανόλη (50 mL). Οξικός μεθυλεστέρας σχηματίζεται ως υποπροϊόν, αλλά δεν παρεμβαίνει στην μεθυλίωση καθώς βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση.

Ως εναλλακτική λύση από το μεθανολικό υδροχλώριο, ένα διάλυμα 1-2% (v/v) πυκνού θειικού οξέος σε μεθανόλη μετεστεροποιεί λιπίδια με τον ίδιο τρόπο και με τον ίδιο ρυθμό. Ακόμη, τριφθοριούχο βόριο σε μεθανόλη (12-14% w/v) χρησιμοποιείται συχνά ως ένα γρήγορο μέσο εστεροποίησης ελεύθερων λιπαρών οξέων.

1.2.8.2. Εστεροποίηση και μεθυλεστεροποίηση καταλυόμενη με βάση

Οι μέθοδοι βασικής κατάλυσης είναι πιο απλές και ταχύτερες αυτών της όξινης κατάλυσης. Τα Ο-ακυλο λιπίδια, όπως οι τριάκυλογλυκερόλες και τα φωσφολιπίδια,

μετεστεροποιούνται πολύ γρήγορα σε άνυδρη μεθανόλη παρουσία ενός βασικού καταλύτη, συνήθως μεθοξειδίου του νατρίου.

Αντίθετα, αν αντικαταστήσουμε την μεθανόλη με νερό στην εξίσωση, το προϊόν είναι ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ, δηλαδή συμβαίνει υδρόλυση. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν εστεροποιούνται υπό τέτοιες συνθήκες, οπότε πρέπει να ληφθεί μέριμνα για να αποκλειστεί το νερό από το μέσο αντίδρασης για να αποφευχθεί η εμφάνιση αυτής της ανεπιθύμητης και μη αναστρέψιμης αντίδρασης.

Διάλυμα 0,5 M μεθοξειδίου του νατρίου, παρασκευάζεται απλά διαλύοντας φρέσκο καθαρό νάτριο σε ξηρή μεθανόλη και είναι το πιο δημοφιλές αντιδραστήριο. Είναι σταθερό για μερικούς μήνες σε χαμηλή θερμοκρασία, ειδικά εάν στην παρασκευή του χρησιμοποιείται μεθανόλη χωρίς οξυγόνο, αλλά καθώς το διοξείδιο του άνθρακα απορροφάται από τον αέρα και το ανθρακικό νάτριο κατακρημνίζεται το αντιδραστήριο πάύει να είναι χρήσιμο. Το μεθοξείδιο του καλίου είναι ακόμη καλύτερος καταλύτης, αλλά το μεταλλικό κάλιο αντιδρά πολύ έντονα με μεθανόλη και πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή στην παρασκευή του αντιδραστηρίου. Επιπλέον, το υδροξείδιο του καλίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης, αλλά δεν μπορεί να κατασκευαστεί χωρίς νερό, επομένως είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για μεγάλης κλίμακας παρασκευάσματα.

Πολλές φορές για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα χρησιμοποιείται συνδυασμός των παραπάνω, όπως και γίνεται στην παρούσα μελέτη.

1.2.8.3. *In situ* μετεστεροποίηση (Cavonius κ.α. 2014)

Η “*in situ*” μετεστεροποίηση ή αλλιώς “Direct-transesterification (D-TE)” είναι μια διαφορετική αλλά πολλά υποσχόμενη μέθοδος παραγωγής εστέρων κατά την οποία η μετεστεροποίηση γίνεται απευθείας με την ελαιούχα βιομάζα, παραλείποντας ουσιαστικά την διεργασία της εκχύλισης. Πρώτη φορά μελετήθηκε από τους Harrington και D’Arcy-Evans (1985) και έκτοτε έχει μελετηθεί αρκετά από διάφορους ερευνητές. Το πεδίο εφαρμογής της είναι κατά κύριο λόγο ελαιούχοι σπόροι όπως ελαιοκράμβη, ηλιόσπορος, σόγια κ.α. αλλά η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με

επιτυχία και σε μικροβιακή κυτταρική βιομάζα που περιέχει λίπος. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται σε μικροάλγη ήδη από το 1990. Πολλοί διαφορετικοί όξινοι καταλύτες χρησιμοποιούνται στην D-TE με τους πιο διαδεδομένους να είναι το υδροχλωρικό οξύ, το θειικό οξύ και το τριφθοριούχο βόριο. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο συμπέρασμα για το ποιο δίνει πιο ακριβή αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη έχει γίνει *in situ* μετεστεροποίηση σε ξηρή βιομάζα *A. aegerita* όπως περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο.

2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενική παρουσίαση

Στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ) πραγματοποιήθηκε η υγρή ζύμωση του AMRL 103 αυτοφυή μακρομύκητα *Agrocybe aegerita*, όπου πραγματοποιήθηκαν:

- Υγρή ζύμωση του παραπάνω στελέχους για 39 ημέρες
- Μετρήσεις παραγωγής βιομάζας και παράλληλη κατανάλωση υποστρώματος
- Μετρήσεις παραγωγής ενδο-πολυσακχαριτών

2.2. Βιολογικό υλικό μακρομυκήτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το εδώδιμο φαρμακευτικό μανιτάρι *Agrocybe aegerita* το οποίο ανήκει στη κλάση των βασιδιομυκήτων. Το στέλεχος αυτό διατηρείται στη τράπεζα καλλιέργειών του Εργαστηρίου Εδώδιμων Μυκήτων του ΙΤΑΠ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και φέρει κωδικό αριθμό καταχώρησης AMRL 103 (Athens Mushroom Research Laboratory). Όλες οι καθαρές καλλιέργειες του στελέχους αναπτύχθηκαν σε PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, Darmstadt, Germany), έπειτα από επώαση 7-10 ημερών στους 26 °C.

2.3. Πειράματα ζυμώσεων βυθού σε φιάλες

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. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, εντός κωνικών φιαλών Erlenmeyer των 100 mL, πληρωμένες με 40±1 mL θρεπτικό

μέσο. Το βασικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GPYS. Για την επίτευξη του λόγου C/N=20 η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 30,0 g/L, ενώ για την επίτευξη του λόγου C/N=40 ήταν 62,4 g/L. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα χημικώς καθαρή γλυκόζη [D(+)-glucose, Alpha Aesar, Karlsruhe, Germany] και σε διάφορες αναλογίες προστίθετο εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Fluka, Steinheim, Germany) και/ή πεπτόνη (Merck, Darmstadt, Germany). Τα συστατικά αυτά περιείχαν επίσης ορισμένη ποσότητα οργανικού αζώτου και άνθρακα. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα ζύμης περιείχε 11% (w/w) άζωτο και 10% (w/w) άνθρακα, ενώ οι συγκεντρώσεις του αζώτου και του άνθρακα στην πεπτόνη ήταν 11% και 35% (w/w) αντίστοιχα και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του συνολικού C και N των υποστρωμάτων. Επιπλέον, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1., κατωτέρω, σε κάποια θρεπτικά μέσα μαζί με τα τρία παραπάνω βασικά συστατικά, προστίθετο και ένα μίγμα αλάτων, μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων. Για κάθε τιμή λόγου C/N έγιναν 10 επαναλήψεις. Οι κωνικές φιάλες με τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα μετά την αποστείρωσή τους σε αυτόκαυστο (121 °C, 20 λεπτά) εμβολιάστηκαν με ανανεωμένη καλλιέργεια μύκητα. Αυτό επιτυγχάνονταν με την προσθήκη εμβολίου 0,7 cm που περιείχε τον μύκητα νεαρής καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η συγκέντρωση του εμβολίου (ξηρή βιομάζα) ήταν ~0,10 g/L. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες επωάζονταν σε θερμοκρασία 26±1 °C έως 39 ημέρες σε επωαστικό κλίβανο (Velp, model FOC 225E, Italy) υπό στατικές συνθήκες.

Πίνακας 2.1. Σύνθεση βασικού θρεπτικού μέσου (GPYS) που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *A. aegerita* σε γρήγη ζύμωση

| Υλικό (g/L) | C/N=20 | C/N=40 |
|--------------------------------------|--------|--------|
| Γλυκόζη | 30,0 | 62,4 |
| Εκχύλισμα Ζύμης | | 2,5 |
| Πεπτόνη | | 3,5 |
| CaCO ₃ | | 1,0 |
| KH ₂ PO ₄ | | 1,0 |
| Na ₂ HPO ₄ | | 2,0 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | | 0,5 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | | 0,3 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | | 0,04 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | | 0,02 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | | 0,08 |

2.4. Χημικές Αναλύσεις

2.4.1. Προσδιορισμός γλυκόζης

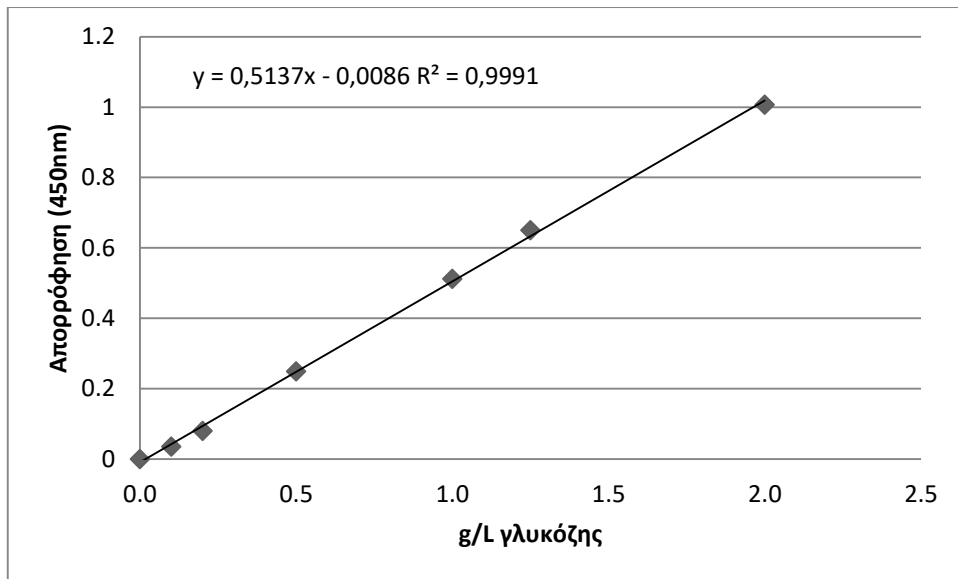
Ο προσδιορισμός των μη καταναλωθέντων αναγόντων σακχάρων από τον μύκητα, δηλαδή της γλυκόζης, στο θρεπτικό μέσο, έλαβε χώρα με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS, Miller, 1954). Η αρχή της μεθόδου είναι η αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-αμίνο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και η ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου:

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου DNS ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία: Σε 700 mL διαλύματος NaOH 0,5 N, διαλύονται αργά και με ήπια θέρμανση 10 g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος. Στη συνέχεια προστίθενται 300 g τρυγικού καλιονάτριου ($\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και το μίγμα αραιώνεται μέχρι τελικού όγκου 1000 mL. Το αντιδραστήριο έχει χρώμα σκούρο πορτοκαλί και είναι σταθερό για αρκετές ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε 0,5 mL αραιωμένου δείγματος (1:25 v/v), προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύτηκε. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο 100 °C για 5 λεπτά και ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού, αναδεύτηκαν και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής θέσεως (Jasco, V-530 UV/Vis Spectrophotometer, Japan). Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς :

$$y = 0,5137x - 0,0086, \text{ εκφρασμένη σε g/L γλυκόζης (Διάγραμμα 2.1.).}$$



Διάγραμμα 2.1. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης

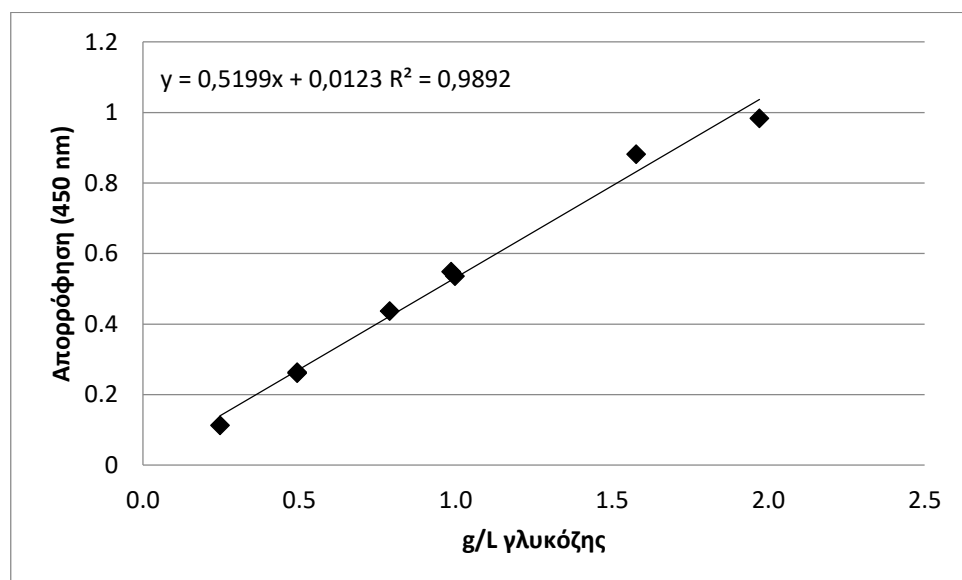
2.4.2. Συλλογή βιομάζας

Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση υπό κενό και με τη χρήση φίλτρων (Whatman No 2, Kent, England). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια τύπου MacCartey, καταγράφηκε το νωπό βάρος των μυκηλίων με ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Kern AGB, Darmstadt, Germany). Μετά τη συλλογή βιομάζας ακολούθησε λυοφιλίωση. Η προ ζυγισμένη νωπή βιομάζα καταψύχθηκε για 48 ώρες και μεταφέρθηκε στο λυοφιλιοποιητή (HetoLyoLab 3000). Η διαδικασία της λυοφιλίωσης ολοκληρώθηκε σε 24 h, ενώ μετά καταγράφηκε το ξηρό πλέον βάρος των μυκηλίων (βιομάζα) στο ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Η λυοφιλιωμένη βιομάζα τεμαχίστηκε σε μικρά τμήματα σε τη χρήση υάλινης ράβδου.

2.4.3. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Liang κ.α. (2010) και Diamantopoulou κ.α. (2014). Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής βιομάζας 100 mg εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας 20 mL 2,5M HCl (Merck) στους 100 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολούθησε ρύθμιση

του pH του εκχυλίσματος με 2,5M NaOH (Merck) και ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 100 mL. Τα ολικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν στη συνέχεια ποσοτικά με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959) και οι IPS εκφράστηκαν ως ισοδύναμα της γλυκόζης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν η: $y = 0,5199x + 0,0123$.



Διάγραμμα 2.2. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης

2.4.4. Προσδιορισμός pH

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

2.4.5. Ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους

Για την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους, ένας αριθμός αναλυτικών πειραματικών σημείων για την κάθε ζύμωση επιλέχθηκε και αναλύθηκε ποιοτικά και ποσοτικά.

2.4.6. Εκχύλιση του λίπους

Εφαρμογή της μεθόδου:

Βιομάζα 0,1 g ζυγίζεται και τοποθετείται σε σωλήνα falcon, στην συνέχεια προστίθενται 10 mL μεθανόλης και ομογενοποιείται εκ νέου με ultra turax. Προστίθενται 20 mL χλωροφόρμιο και ξανά ομογενοποιείται με ultra turax και το

falcon τοποθετείται σε περιστροφικό αναδευτήρα για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται $\frac{1}{4}$ του όγκου διάλυμα χλωριούχου καλίου 0,88% w/v και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 6000 στροφές, στους 4 °C για 6 λεπτά. Αφαιρείται η πάνω στοιβάδα με σιφόνιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου. Το περιεχόμενο του σωλήνα μεταφέρεται ποσοτικά σε προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη και αυτή τοποθετείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Στη συνέχεια, διαχέεται αέριο άζωτο στο εσωτερικό της φιάλης για την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και η φιάλη ζυγίζεται ξανά για τον υπολογισμό του ολικού λίπους. Τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε 1 mL χλωροφόρμιο το οποίο περιέχει 0,05 g/L BHT προς αποφυγή της οξείδωσής τους και αποθηκεύονται στους -4°C για περαιτέρω αναλύσεις.

2.4.7. Κλασμάτωση του λίπους

Τρεις κύριες κατηγορίες λιπιδίων μικροβιακού λίπους (ουδέτερα, γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια, φωσφολιπίδια) κλασματώθηκαν με την χρήση χρωματογραφίας στήλης (Rouser και Kritchevshy, 1967; Latge και De Bievre, 1980).

Εφαρμογή της μεθόδου:

Ζυγίζεται 1 g silica gel σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται μικρή ποσότητα χλωροφορμίου. Το περιεχόμενο αποχύνεται σε γυάλινη στήλη (5mL , τύπου SPE) η οποία περιέχει κατά τα 2/3 περίπου χλωροφόρμιο. Μετά την επικάθηση του silica ανοίγεται η στρόφιγγα προς απομάκρυνση του διαλύτη μέχρι η στάθμη να φτάσει στην επιφάνεια του silica (η οποία πρέπει πάντα να διαβρέχεται με διαλύτη). Στη συνέχεια με τη χρήση σύριγγας προστίθεται αργά το δείγμα (1 mL) με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η επιφάνεια της πηκτής. Ακολουθεί έκλυση των λιπιδίων με 3 διαλύτες: 1) 10 mL χλωροφόρμιο 2) 10 mL ακετόνης 3) 10 mL μεθανόλης και συλλέγονται τα 3 κλάσματα σε διαφορετικά φιαλίδια. Το πρώτο κλάσμα περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (NL), το δεύτερο τα γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια (GL) και το τρίτο τα φωσφολιπίδια (PL). Τέλος γίνεται εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα και τα λιπίδια επαναδιαλύονται με προσθήκη 1 mL χλωροφόρμιο/ μεθανόλη 2:1 v/v. Και τα 3 αυτά κλάσματα στη συνέχεια αναλύονται με TLC.

2.4.8. Ανάλυση των κλασμάτων λιπιδίων με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Πλάκες:

Γυάλινες και αλουμινένιες πλάκες 20x20 cm x 0,25 mm είδη επιστρωμένες με silica gel G απο Merck, Darmstadt FRG χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των κλασμάτων τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Στις πλάκες που προορίζονταν για ποσοτική ανάλυση προηγήθηκε έκπλυση της πλάκας με σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο-μεθανόλη 1:1. Όλες οι πλάκες ενεργοποιήθηκαν πριν την χρήση τους στον φούρνο στους 120 °C για 30 λεπτά.

Διαλύτες:

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας που αγοράστηκαν απο την εταιρεία Sigma-Aldrich : χλωροφόρμιο, μεθανόλη, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας, οξικό οξύ, διάλυμα αμωνίας 25%, οξικός μεθυλεστέρας, πετρελαϊκός αιθέρας. Ο διαχωρισμός των ουδέτερων λιπιδίων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα εξάνιο/διαιθυλαιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v), ενώ για καλύτερο διαχωρισμό των κηρών χρησιμοποιήθηκε σύστημα πετρελαϊκός αιθέρας/διαιθυλαιθέρας/οξικό οξύ (85:15:1,5, v/v/v). Για το διαχωρισμό των πολικών κλασμάτων (γλυκολιπίδια, σφιγγολιπίδια και φωσφολιπίδια) ως συστήματα διαλυτών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω: χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα αμωνίας 25% (65:25:4, v/v/v) και οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% w/v χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Μετά την ανάπτυξη του διαλύτη, οι πλάκες αφήνονταν να στεγνώσουν στην απαγωγό και στη συνέχεια ακολουθούσε η διαδικασία εμφάνισης των λιπιδίων.

Πρότυπα διαλύματα :

Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των κατηγοριών λιπιδίων πραγματοποιήθηκαν με πρότυπα διαλύματα αυθεντικών ουσιών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Όλες οι πρότυπες ενώσεις λιπιδίων αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich. Τα πρωτογενή πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν διαλύοντας προζυγισθείσα ποσότητα από κάθε αυθεντική ένωση σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη (1:1, v/v). Από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα δημιουργήθηκε ένα διάλυμα εργασίας σύμφωνα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις (Πίνακες 2.2. και 2.3.):

Πίνακας 2.2. Μίγμα αυθεντικών ουδέτερων προτύπων

| Πρότυπο δ/μα εργασίας | Συγκέντρωση (mg/mL) |
|---------------------------------|---------------------|
| Τριελαΐνη | 2,0 |
| Εργοστερόλη | 0,5 |
| Παλμιτικός εστέρας χοληστερόλης | 0,5 |
| Ελαϊκό οξύ | 2,0 |
| Παλμιτικός κετυλεστέρας | 0,5 |

Πίνακας 2.3. Μίγμα αυθεντικών πολικών προτύπων

| Πρότυπο δ/μα εργασίας | Συγκέντρωση (mg/mL) |
|-----------------------------|---------------------|
| Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) | 2,0 |
| Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) | 1,0 |
| Φωσφατιδυλοσερίνη (PS) | 1,0 |

Εφαρμογή των προτύπων και δειγμάτων:

Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα εφαρμόστηκαν αυτόματα με τη χρήση του μηχανήματος Linomat IV-Y χρησιμοποιώντας μία μικροσύριγγα των 100 μ L (Camag, Muttenz, Switzerland). Η αρχή της εναπόθεσης ήταν 1 cm από το κάτω άκρο της πλάκας. Ο ψεκασμός έγινε σε ζώνες πλάτους 1,5 εκατοστών. Ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό δειγμάτων στην πλάκα πραγματοποιείτο ρύθμιση στην έκταση της ζώνης και την απόσταση μεταξύ των ζωνών.

Ανάπτυξη

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε θαλάμους χρωματογραφίας της Camag σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρωματογραφία διακόπηκε όταν το μέτωπο του διαλύτη ήταν 1 cm από το άνω άκρο της πλάκας.

Αντιδραστήρια ανίχνευσης διαχωρισμένων λιπιδίων:

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού με TLC, για τον ποσοτικό προσδιορισμό όλων των τάξεων, οι πλάκες ψεκάστηκαν με διάλυμα θειικού χαλκού 10% w/v σε διάλυμα

φωσφορικού οξέος 10% v/v και οι ζώνες των λιπιδίων εμφανίστηκαν (καστανόμαυρη χροιά) μετά από θέρμανση επί 10-15 λεπτά στους 180 °C.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των διαφόρων λιπιδίων, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αντιδραστήρια.

Συγκεκριμένα για το ουδέτερο κλάσμα:

- Διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου
2g FeCl₃ διαλύονται σε 83 mL βουτανόλης και 15 mL πυκνού H₂SO₄

Με το διάλυμα αυτό και θέρμανση 10 λεπτών στους 120 °C εμφανίζονται αρχικά με μωβ χρώμα τα λιπίδια που περιέχουν στερόλη. Με περαιτέρω θέρμανση εμφανίζονται με ελαφρύ καφέ χρώμα και τα υπόλοιπα λιπίδια.

Για τα πολικά λιπίδια :

- Διάλυμα Dittmer (Ryu και MacCoss, 1979)

Διάλυμα Α. Το οξείδιο του μολυβδαινίου (4 g) διαλύεται βραδέως με βρασμό σε 70% v/v θειικό οξύ (100 mL).

Διάλυμα Β. Στο διάλυμα Α (50 mL) προστίθενται κονιοποιημένο μολυβδαίνιο (0.18 g) και το μίγμα θερμαίνεται υπό κάθετο ψυκτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού.

Διάλυμα Γ. Τα διαλύματα Α και Β αναμιγνύονται (1:1) με 100 mL απιονισμένο νερό.

Το τελικό διάλυμα ψεκασμού αποτελείται από 1 όγκο του διαλύματος Γ 2 όγκους νερό και 0.75 όγκους οξικού οξέος και φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη για 3-4 μέρες πριν την χρήση του (απο καφέ γίνεται μπλέ).

Με το διάλυμα αυτό οι ζώνες των φωσφολιπιδίων λαμβάνουν κυανή χρώση μέσα σε 10 λεπτά από τον ψεκασμό.

- Διάλυμα Νινυδρίνης
1,5g νινυδρίνης διαλύονται σε 5 mL οξικού οξέος και 500 mL 95% v/v αιθανόλης

Με το διάλυμα αυτό και θέρμανση 10 λεπτών στους 120 °C εμφανίζονται με ροζ χρώμα τα λιπίδια που περιέχουν α-αμινομάδα.

- Διάλυμα α-ναφθόλης
0,5 g α-ναφθόλης διαλύονται σε διάλυμα νερού μεθανόλης 1:1 v/v.

Μετά τον ψεκασμό της πλάκας το διάλυμα αυτό, αφήνεται να στεγνώσει στην απαγωγό για 10 λεπτά και στη συνέχεια ψεκάζεται με π.διάλυμα H_2SO_4 95% w/w. Ακολουθεί θέρμανση στους 120 °C μέχρι οι ζώνες των γλυκολιπιδίων να λάβουν μωβ χροιά ενώ αυτές που περιέχουν φώσφορο να λάβουν καστανοκίτρινη χροιά.

2.4.9. Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου (Rouser κ.α., 1970)

Πειραματική Πορεία:

Τα δείγματα λιπιδίων μεταφέρθηκαν σε καθαρούς γυάλινους σωλήνες και ο διαλύτης εξατμίστηκε πλήρως υπό ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, 0,65 mL υπερχλωρικού οξέος (70%) προστέθηκε στους σωλήνες. Τα λιπίδια χωνεύθηκαν με θέρμανση για περίπου 30 λεπτά (έως ότου εξαφανίστηκε το κίτρινο χρώμα) σε αμμόλουτρο στους 180 °C με το άνω μισό του κάθε σωλήνα να εκτείνεται έξω από το αμμόλουτρο για να αποτραπεί η απώλεια ατμών υπερχλωρικού οξέος. Μετά την ψύξη των σωλήνων, προστέθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 3,3 mL απ. νερού, 0,5 mL υδατικού διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου (2,5 % w/v) και 0,5 mL υδατικού διαλύματος ασκορβικού οξέος (10 % w/v). Η προσθήκη των αντιδραστηρίων έγινε γρήγορα και με ακρίβεια με μηχανικά σιφόνια, ενώ το περιεχόμενο του σωλήνα αναμιγνυόταν μετά από κάθε προσθήκη με κυκλοαναμείκτη. Το χρώμα αναπτύχθηκε με θέρμανση για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο και οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων των προτύπων) καταγράφηκαν ενάντι τυφλού διαλύματος που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός λιπιδίων στα 800 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000.

Πολύ σημαντικό για την παραπάνω μέθοδο είναι τα σκεύη να έχουν εκπληθεί πριν την χρήση με διάλυμα νιτρικού οξέος 1% v/v καθώς τα απορρυπαντικά περιέχουν κάποια ποσότητα φωσφόρου.

Η περιεκτικότητα σε φωσφόρο των δειγμάτων υπολογίστηκε με βάση καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα KH_2PO_4 (δισόξινου φωσφορικού καλίου).

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων αρχικά παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα KH_2PO_4 (1000 μg / mL) και με αραιώση αυτού παρασκευάστηκε διάλυμα

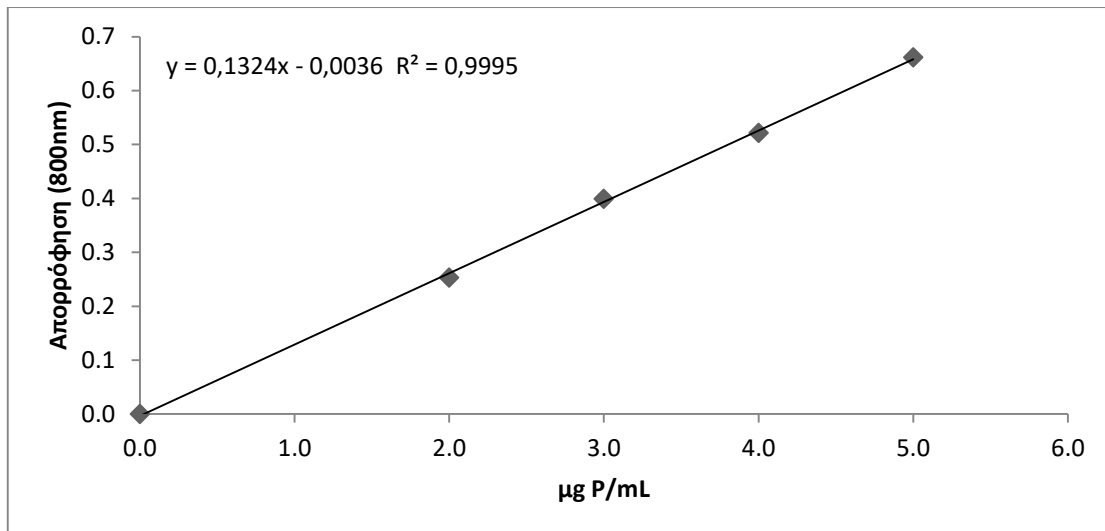
KH₂PO₄ (100 μg/ mL). Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τα πρότυπα διαλύματα με τον παρακάτω τρόπο:

Πίνακας 2.4. Μέθοδος παρασκευής προτύπων διαλυμάτων

| μL δ/τος KH ₂ PO ₄ (100 μg/ mL) | μg P | μmole P | Προσθήκη νερού μέχρι τα 3,3 mL (mL + μL) | Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων |
|---|------|---------|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 3+300 | 0,5 mL υδατικού διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου (2,5 % w/v) και 0,5 mL υδατικού διαλύματος ασκορβικού οξέος (10 % w/v). |
| 10 | 1 | 0,03 | 3+290 | |
| 20 | 2 | 0,06 | 3+280 | |
| 30 | 3 | 0,09 | 3+270 | |
| 40 | 4 | 0,13 | 3+260 | |
| 50 | 5 | 0,16 | 3+250 | |

Η χώνεψη των προτύπων δεν ήταν απαραίτητη πριν την προσθήκη αντιδραστηρίων.

Η ποσότητα φωσφολιπιδίων των δειγμάτων υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την ποσότητα του φωσφόρου επί 25 (Διάγραμμα 2.3.).



Διάγραμμα 1.3. Πρότυπη καμπύλη KH_2PO_4

2.4.10. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σακχάρων στο λίπος

Τα ολικά σάκχαρα στα λιπίδια έχουν γενικά προσδιοριστεί με τη μέθοδο φαινόλης-θειικού οξέος (Dubois, 1956). Σε αυτή τη μέθοδο, το πυκνό θειικό οξύ διασπά τους τυχόν πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και δισακχαρίτες σε μονοσακχαρίτες. Οι πεντόζες ακολούθως αφυδατώνονται σε φουρφουράλη και εξόζες σε υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Αυτές οι ενώσεις αντιδρούν στη συνέχεια με τη φαινόλη για να παράξουν ένα κίτρινο χρυσό χρώμα το οποίο μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος δίνει καλά αποτελέσματα μόνο με υδρολύματα γλυκολιπιδίων που είναι υδατοδιαλυτά, αλλά ευρέθη ότι δίνει ασυνεπή και μη επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται σε άθικτο μικροβιακό έλαιο.

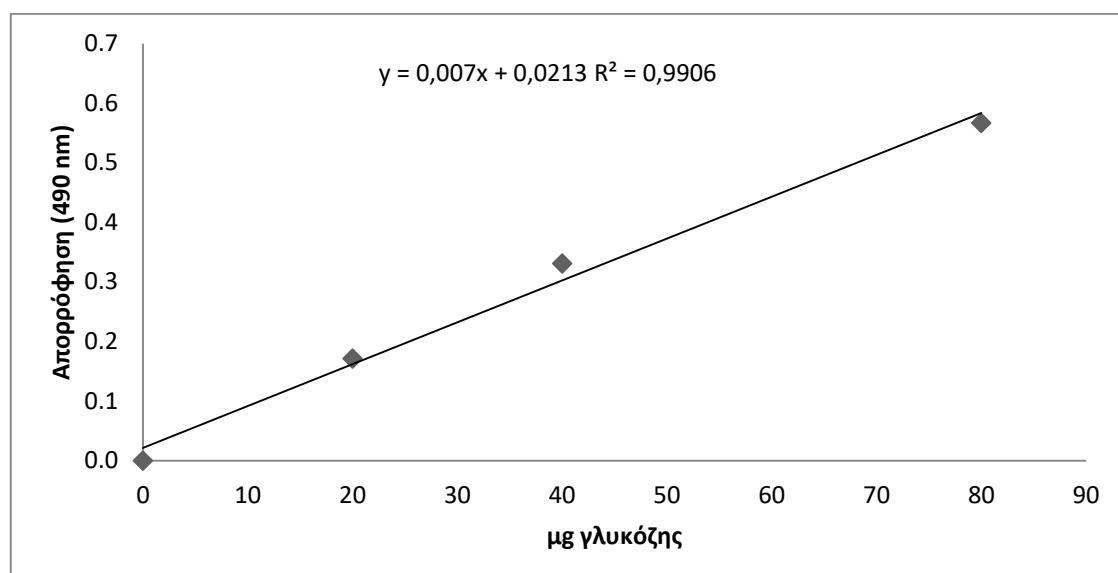
Σε αυτή τη μελέτη ακολουθήθηκε μια τροποποίηση αυτής της μεθόδου στα δείγματα λιπιδίων για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σακχάρων σε κλάσματα γλυκολιπιδίων-σφιγγολιπιδίων (Kushwaha και Kates, 1980).

Πειραματική Πορεία :

Δείγμα λιπιδίων που περιέχει τουλάχιστον 30-60 μg σακχάρου (ως εξόζη) μεταφέρεται σε γυάλινους σωλήνες και ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mL απ. νερού και 1 mL υδατικού διαλύματος φαινόλης 5% w/w σε απιονισμένο απεσταγμένο H_2O .

Οι προσθήκες έγιναν με ακρίβεια με μηχανικά σιφόνια και το περιεχόμενο του σωλήνα αναμίχθηκε απαλά με το χέρι, διασφαλίζοντας ότι η μεμβράνη του λιπιδίου στον πυθμένα του σωλήνα παραμένει αδιατάρακτη.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL πυκνού θεικού οξέος (H₂SO₄) με μηχανικό σιφόνιο, γρήγορα και απευθείας στο κέντρο του σωλήνα. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο. Μετά το βρασμό, τα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν για 30 λεπτά και η απορρόφηση του πορτοκαλί-χρυσού χρώματος (συμπεριλαμβανομένων των πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης) προσδιορίστηκε στα 490 nm σε ένα φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000 έναντι τυφλού δείγματος. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα των δειγμάτων υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη γλυκόζης (Διάγραμμα 2.4.).



Διάγραμμα 2.4. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης

2.4.11. Προσδιορισμός ολικών λιπιδίων ως μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων με απευθείας μετεστεροποίηση στη βιομάζα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για την μετεστεροποίηση στη βιομάζα του μανιταριού βασίζεται στην ISO 12966-2 (Methanolic NaOH and Sulfuric acid / Basic-Acidic transesterification). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει 2 στάδια. Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον ενώ το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των ακυλογλυκερολών, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των αντίστοιχων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων.

Ταυτόχρονα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετασχηματίζονται στους αντίστοιχους σάπωνες που αντιδρούν με διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου. Στο δεύτερο στάδιο, οι σάπωνες μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Πειραματική πορεία

Ποσότητα λυοφιλωμένης βιομάζας περίπου 20 mg ζυγίζεται (με ακρίβεια 0,1 mg) σε σωλήνες με πώμα στους οποίους προηγουμένως έχει προστεθεί και εξατμιστεί ο διαλύτης υπο ρεύμα αζώτου ποσότητα 50 μL δ/τος τριενδεκανούλο γλυκερόλης (10 mg/mL σε χλωροφόρμιο). Στη συνέχεια προστίθενται 50 μL εσωτερικού προτύπου εννεναοϊκού μεθυλεστέρα (10 mg/mL σε χλωροφόρμιο), 500 μL τολουόλιο και 1 mL μεθανολικού διαλύματος NaOH 0.3 mol/L με το επαναληπτικό σιφώνιο. Με ρεύμα αζώτου εκδιώκεται το οξυγόνο, πωματίζονται οι σωλήνες, αναδεύονται στον κυκλοαναδευτήρα και θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 85 °C για 20 λεπτά. Κατόπιν, τα δείγματα ψύχονται και προστίθενται 2 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλείνης με αποτέλεσμα να αποκτούν ροζ χρώμα. Ακολουθεί προσθήκη περίσσειας δ/τος θεικού οξέος 1 mol/L σε μεθανόλη (~ 600 μL) και εκ νέου θέρμανση στο υδατόλουτρο για 20 λεπτά. Αφού τα δείγματα ψυχθούν, προστίθενται 2 mL υδατικού διαλύματος NaCl 40% w/v και αναδεύονται. Τέλος, οι μεθυλεστέρες εκχυλίζονται με 2 mL εξάνιο, γίνεται ανάδευση και η πάνω φάση παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο στο οποίο έχει προστεθεί άνυδρο θειικό νάτριο για την απορρόφηση υπάρχουσας υγρασίας.

2.4.12. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – προσδιορισμός FAMES

Οι μεθυλεστέρες (FAMES) που παρασκευάστηκαν όπως περιεγράφηκε ανωτέρω αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία. Το σύστημα αέριου χρωματογράφου τύπου GC2010 plus (Shimadzu) περιελάμβανε αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας. Ο όγκος έγχυσης δείγματος ήταν 1 μL σε λειτουργία διαμοιρασμού 1:10. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με σταθερή γραμμική ταχύτητα 29 cm/s. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 250 °C και 270 °C αντιστοίχως. Ο διαχωρισμός των μεθυλεστέρων πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη DB-Wax (30m x 0,25mm, df 0,25 μm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν το ακόλουθο:

Πίνακας 2.5. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα αέριας χρωματογραφίας

| Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας (° C /min) | Θερμοκρασία (° C) | Χρόνος παραμονής (min) |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| - | 100 | 1 |
| 25 | 200 | 1 |
| 5 | 240 | 2 |
| 5 | 250 | 6 |

Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση μίγματος αυθεντικών ουσιών (CRM 47885 – 37 Component FAME mix, Supelco). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των FAMES, βασίστηκε στη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου (τριενδεκανοϋλογλυκερόλη) χρησιμοποιώντας το εμβαδό των κορυφών και τους αντίστοιχους συντελεστές απόκρισης για κάθε λιπαρό οξύ.

Από την ποσότητα των μεθυλεστέρων, υπολογίστηκε με χρήση συντελεστών η ποσότητα των λιπαρών οξέων και των τριακυλογλυκερολών στη βιομάζα. Το σύνολο των τριακυλογλυκερολών αποτέλεσε τα ολικά λιπίδια της βιομάζας (AOAC 996.06).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη της φυσιολογίας, με έμφαση στην ικανότητα αύξησης και βιοσύνθεση λιπιδίων, ενός αυτοφυούς στελέχους του μακρομύκητα *Agrocybe aegerita* κατά την καλλιέργειά του σε υγρό θρεπτικό μέσο με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, λίπους, ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων (εκχύλιση, κλασμάτωση, TLC) και η σύσταση των λιπαρών οξέων του ενδοκυτταρικού λίπους (GC) μελετήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε σαν κύρια πηγή άνθρακα 30 g/L (C/N=20) και 62,4 g/L (C/N=40) γλυκόζη.

Προκειμένου να εξεταστεί η φυσιολογική-βιοχημική συμπεριφορά του μακρομύκητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις υποστρώματος, διεξήχθη μελέτη της κινητικής αύξησής του και μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Κατανάλωση γλυκόζης (Glc , g/L)
- Παραγωγή βιομάζας (X , g/L), λίπους (L , g/L) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L)

Υπολογίστηκαν ακόμα οι ακόλουθες παράμετροι:

- Συντελεστής απόδοσης βιομάζας λόγω κατανάλωσης γλυκόζης (g βιομάζας/g καταναλωθείσας γλυκόζης - $Y_{X/Glc}$)
- Συντελεστής απόδοσης λίπους λόγω κατανάλωσης γλυκόζης (g λίπους/ g καταναλωθείσας γλυκόζης - $Y_{L/Glc}$)
- Ποσοστό Λίπους στην συνολική ξηρή βιομάζα (Y_{LX} %, w/w)

3.1. Καλλιέργεια του *Agrocybe aegerita* σε εμπορική γλυκόζη ($S_0 = 30$ g/L και $S_0 = 62,4$ g/L)

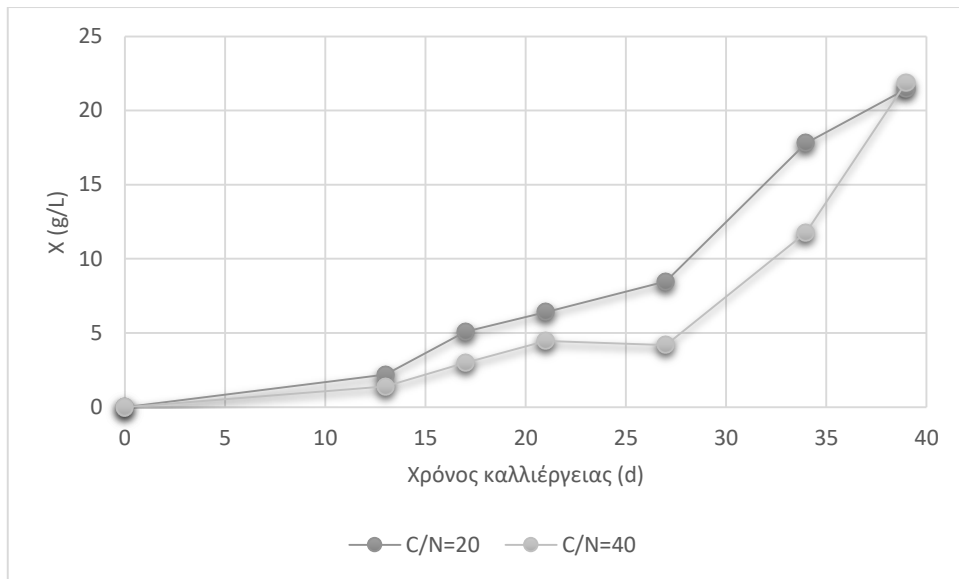
3.1.1. Παράμετροι ανάπτυξης και βιοσύνθεση λίπους

Μελέτες της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης καθώς επίσης και της παραγωγής λίπους και ενδοπολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχαν ως κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη με αρχική συγκέντρωση 30 g/L με λόγο C/N = 20, pH 5,7 και 62,4 g/L με λόγο C/N = 40 και pH 5,9. Σημειώνεται πως το pH παρέμεινε σχετικά σταθερό σε όλες τις ημέρες της ζύμωσης 5,7-6,1. Το *A. aegerita* αναπτύχθηκε για 39 μέρες, σε στατική κατάσταση, σε πλήρως αερόβιες συνθήκες και τα αποτελέσματα που αφορούν τις μέγιστες τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν παρουσιάζονται με υπογράμμιση στον παρακάτω Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Κινητική του μακρομύκητα *A. aegerita* σε υγρή καλλιέργεια με πηγή άνθρακα την αναλυτική γλυκόζη σε δυο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υπό στατικές, θερμοκρασία 26 °C, pH = 5,7, πλήρως αερόβιες συνθήκες.

| Αρχικός λόγος C/N | Glc ₀ (g/L) | Χρόνος (ημ) | X (g/L) | Glc _c (g/L) | IPS (g/L) | Y _{IPS/x} (% w/w) | Y _{IPS/Glc} (% w/w) | L (g/L) | Y _{L/x} (% w/w) |
|-------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|---------------------------|--------------|-------------------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------|
| 20 | 27,8 | 39 ⁿ | <u>21,4</u> | 2,2 | <u>13,5</u> | <u>63,0</u> | 0,52 | <u>0,9</u> | <u>4,2</u> |
| 20 | 27,8 | 34 ⁿ | 17,8 | 11,77 | 11,1 | 62,3 | <u>0,7</u> | 0,6 | 3,4 |
| 40 | 60,9 | 39 ⁿ | <u>21,9</u> | <u>30</u> | <u>13,9</u> | <u>63,5</u> | 0,45 | <u>0,7</u> | 3,0 |
| 40 | 60,9 | 34 ⁿ | 11,78 | 45 | 7,36 | 62,5 | <u>0,46</u> | 0,5 | <u>3,9</u> |

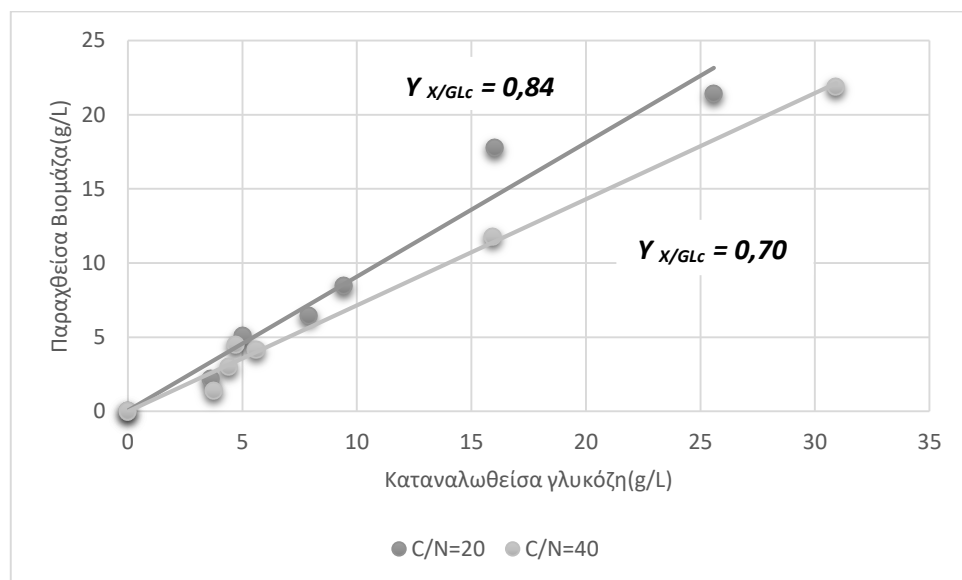
Στη συνέχεια παρατίθενται διαγράμματα για τις δύο συγκεντρώσεις υποστρώματος στα οποία γίνεται σύγκριση της παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών, συντελεστών απόδοσης βιομάζας και λίπους ως προς το υπόστρωμα καθώς και περιεκτικότητα λίπους στην βιομάζα.



Διάγραμμα 3.1. Συγκριτική απεικόνιση της παραγωγής βιομάζας X (g/L) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με $C/N=20$ με $C/N=40$. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

Στις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας παρατηρείται μια μικρή παραγωγή βιομάζας με μεγαλύτερη αύξηση αυτή του υποστρώματος με $C/N=20$. Από της 27^η μέχρι την 39^η ημέρα παρατηρείται μία έκρηξη στην παραγωγή βιομάζας και στις δύο περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας να έχει παραχθεί η ίδια ποσότητα βιομάζας (23 g/L). Θα πρέπει να σημειωθεί πως ποσοτικά δεδομένα σχετιζόμενα με την παραγωγή μυκηλιακής μάζας από τον *A.aegerita* σε υγρή καλλιέργεια είναι πολύ περιορισμένα. Ακόμη, η καλλιέργεια του *A. aegerita*, σε παρόμοιο υπόστρωμα, έδωσε αποτελέσματα παραχθείσας βιομάζας (4,2 g/L τη δέκατη ημέρα της καλλιέργειας; Lomberh κ.α., 2002, 0,8 g/L την δέκατη έκτη ημέρα της καλλιέργειας; Diamantopoulou κ.α. (2012) και 9,5 g/L την εικοστή τέταρτη ημέρα της καλλιέργειας; Diamantopoulou κ.α. (2014)) σε σχέση με την παρούσα εργασία (2-6 g/L, 16^η-24^η ημέρα αντίστοιχα GPYS). Όμως, όταν προστέθηκε εκχύλισμα καλαμποκιού η συγκέντρωση μυκηλιακής μάζας αυξήθηκε πολύ (τελική συγκέντρωση ~17 g/L). Περαιτέρω, σε πείραμα των Kim κ.α. (2005) η παραγωγή βιομάζας του μακρομύκητα *A. cylindracea* αριστοποιήθηκε με στατιστική μέθοδο πειραματικού σχεδιασμού (orthogonal matrix method) και η τελική συγκέντρωση βιομάζας σε πειράματα αναδευόμενων φιαλών έφτασε μέχρι και τα ~20-25 g/L. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιώντας το αριστοποιημένο θρεπτικό μέσο, η καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα όγκου 5 L είχε ως αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση

μυκηλιακής μάζας να είναι της τάξης των 12 g/L. Επίσης, από μελέτες της Διαμαντοπούλου κ.α (2012, 2014) βρέθηκε παραγωγή ξηρής βιομάζας μυκηλίου μέχρι 22,5 g/L.



Διάγραμμα 3.2. Συγκριτική απεικόνιση της απόδοσης σε βιομάζας προς την καταναλωθείσα γλυκόζη $Y_{x/Glc}$ (g/g) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με $C/N=20$ με $C/N=40$. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

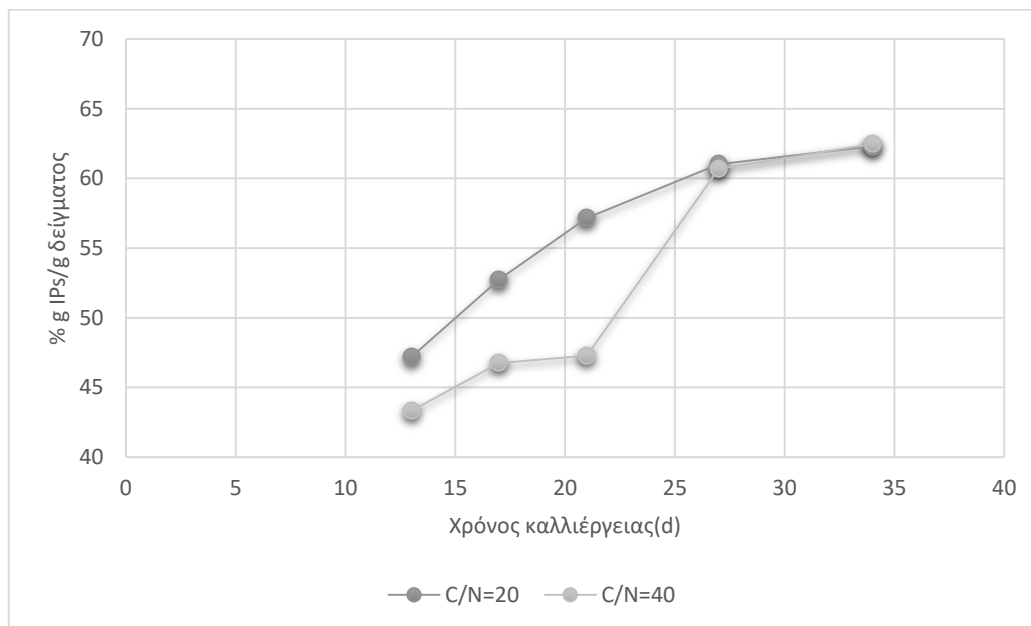
Ο συντελεστής απόδοσης της βιομάζας ως προς την καταναλωθείσα γλυκόζη με τιμή 0,84 στην περίπτωση του $C/N = 20$ είναι μεγαλύτερος από αυτόν του υποστρώματος με μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης 0,70. Το ανωτέρω φυσιολογικό δεδομένο πιθανώς συνδέεται με φαινόμενα παρεμπόδισης από το υπόστρωμα (γλυκόζης) για τις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης λόγω της αυξημένης οσμωτικής πίεσης, με απόρροια ανάλωση μέρους της διαθέσιμης γλυκόζης προς κάλυψη της ενέργειας συντήρησης (energy of maintenance requirements) των μυκηλίων του μακρομύκητα. Βέβαια στην παρούσα μελέτη οι παρεμποδίσεις αυτές δεν είναι τόσο μεγάλες ώστε να επιρεάσουν σημαντικά στην παραγωγή βιομάζας. Σε ακριβώς αντίστοιχες παρατηρήσεις οδηγήθηκαν και οι Tang και Zhong (2002) οι οποίοι πραγματοποίησαν καλλιέργειες του μύκητα *G. lucidum* σε υποστρώματα με αυξανόμενη αρχική συγκέντρωση λακτόζης και ο συντελεστής

απόδοσης βιομάζας προς αναλωθείσα λακτόζη μειώθηκε από 0,40 g/g σε 0,28 g/g όταν η αρχική συγκέντρωση λακτόζης αυξήθηκε από τα 20 στα 65 g/L. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα οδηγήθηκαν και οι Fang και Zhong (2002) σε μελέτη τους για τον ίδιο μύκητα και για αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης από 20 έως 65 g/L. Περαιτέρω, αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και κατά την καλλιέργεια του *T. sinense* σε υποστρώματα με βάση τη σακχαρόζη σε υγρές καλλιέργειες αναδευόμενων φιαλών. Η συγκέντρωση της ξηράς μυκηλιακής μάζας αυξήθηκε αξιοσημείωτα (από 12,5 σε 24,0 g/L) όταν η αρχική συγκέντρωση σακχαρόζης αυξήθηκε από τα 20 στα 125 g/L, αλλά ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας παρουσίασε κατακόρυφη πτώση (από 0,60 σε 0,28 g/g), προφανώς λόγω παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος (Tang κ.α., 2008).

Πέρα από το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκαν πολύ ικανοποιητικές συγκεντρώσεις ξηράς μυκηλιακής μάζας (π.χ. $X \geq 20$ g/l), ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το καταναλωθέν σάκχαρο ήταν (αρκετά ή και ιδιαίτερα) ικανοποιητικός.

Από προηγούμενες μελέτες που έγιναν από τους Diamantopoulou κ.α., 2012,2014 σε καλλιέργειες που έλαβαν χώρα με τους μακρομύκητες *A. aegerita* και *F. velutipes* ο συντελεστής απόδοσης $Y_{X/Glc}$ (γλυκόζη ήταν το σάκχαρο που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες αυτές) έλαβε τιμές της τάξης του $\sim 0,70$ g/g. Σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. *M. esculenta*, *G. applanatum* και *V. voluacea*) ο συντελεστής απόδοσης έλαβε τιμές της τάξης των $\sim 0,45-0,60$ g/g, σε μία από τις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν (*P. pulmonarius*), ο συνολικός συντελεστής απόδοσης $Y_{X/Glc}$ ήταν πραγματικά άριστος ($\sim 0,9$ g/g), ανεξαρτήτως από την εφαρμογή ή όχι ανάδευσης στο μέσο της καλλιέργειας. Αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης ξηράς βιομάζας προς το αναλωθέν σάκχαρο είναι $\sim 0,8$ g/g (Fakas κ.α., 2008; Koutinas κ.α., 2009; Vamvakaki κ.α., 2010), είναι ευκόλως αντιληπτό το γεγονός ότι μέρος και λοιπών οργανικών συστατικών τα οποία βρίσκονταν στο μέσο καλλιέργειας (π.χ. πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε αρχικές συγκεντρώσεις 3,5 και 2,5 g/l) αναλώθηκαν από το μύκητα αυτό ως πηγές άνθρακα (πιθανώς αντίστοιχα φαινόμενα έλαβαν χώρα και σε άλλους μύκητες). Σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης γλυκόζης προς το αναλωθέν σάκχαρο έχει λάβει αντίστοιχες (ή συνήθως μικρότερες) τιμές σε σχέση με τις μέγιστες τιμές (π.χ. 0,8-0,9 g/g) που επιτεύχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Εξαιρέσεις όπου πραγματικά υψηλές τιμές του συντελεστή απόδοσης βιομάζας έχουν ληφθεί (της τάξης των 0,70-0,9 g/g), αναφέρονται από τους Maziero κ.α. (1999) για τους μύκητες *Tricholoma crassum* και *Lepista* sp. κατά την αύξησή τους στη γλυκόζη, από τους Confortin κ.α. (2008) σε καλλιέργειες του μύκητα *P. sajor-caju* σε μηχανικώς αναδεδυμένους βιοαντιδραστήρες με πληθώρα σακχάρων χρησιμοποιούμενων ως υλικών εκκίνησης της ζύμωσης, από τους Tang και Zhong (2004) για την καλλιέργεια του *G. lucidum* στη λακτόζη υπό μη αναδεδυμένες συνθήκες και από τους Diamantopoulou κ.α. (2014) σε καλλιέργειες του μακρομύκητα *A. aegerita* και *P. pulmonarius* όταν αυτοί καλλιεργήθηκαν σε γλυκόζη υπό στατικές συνθήκες. Γενικώς, για ένα μεγάλο αριθμό μακρομυκήτων που μελετήθηκαν (π.χ. *Agaricus* sp., *F. velutipes*, *L. edodes*, *Ganoderma* sp., *Pleurotus* sp.), τιμές του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας προς το αναλωθέν υπόστρωμα ήταν της τάξης των ~0,3-0,6 g/g (Nair κ.α., 1989; Babitskaya κ.α., 2005; Tang και Zhong, 2002; André κ.α., 2010; Tang κ.α., 2011).

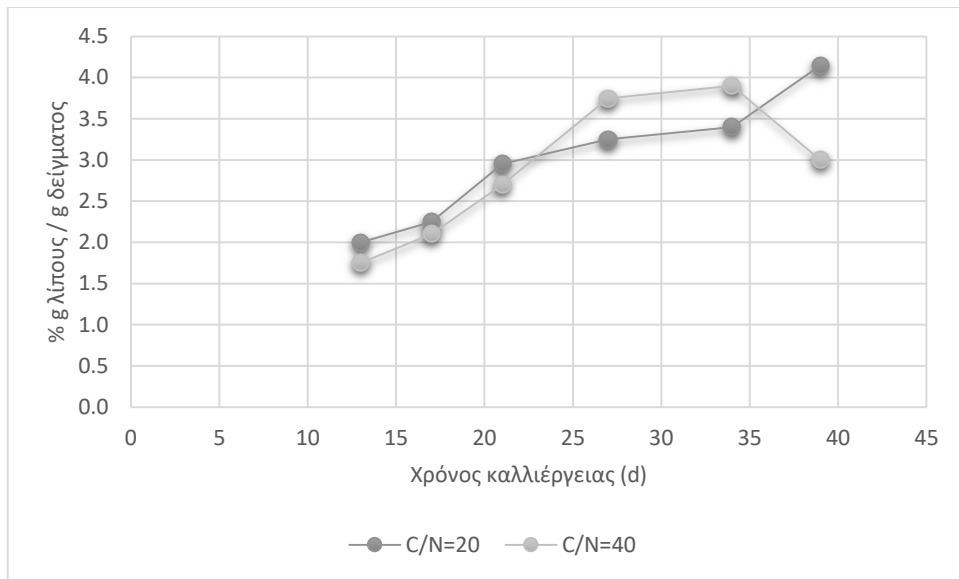


Διάγραμμα 3.3. Συγκριτική απεικόνιση της παραγωγής ενδοπολυσακχατιτών IPS (% w/w) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με C/N=20 με C/N=40. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

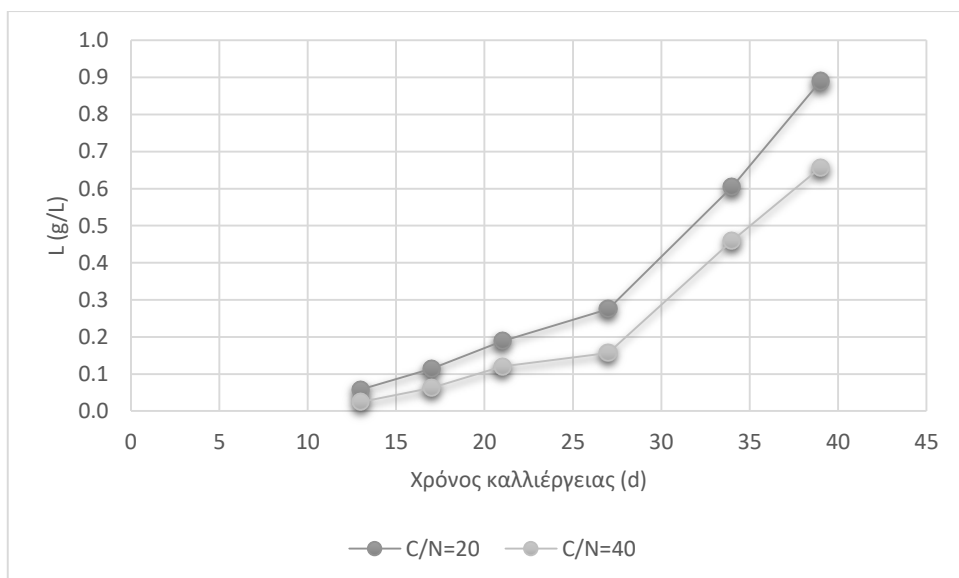
Και στα δύο υποστρώματα ο μακρομύκητας συνθέτει μεγάλη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών μέχρι 63% της ξηρής βιομάζας. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα

κατέληξαν και οι Diamantopoulou κ.α. (2014) για τον μακρομύκητα *A. aegerita* με ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών 60,4%. Αυτό υποδεικνύει και την φαρμακευτική πλευρά του μανιταριού. Οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών έχουν αποδειχθεί ότι ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση του σώματος, αντί της άμεσης κυτταροτοξικής επίδρασης στα καρκινικά κύτταρα σύμφωνα με τον Mizuno (1995). Συνεπώς, αυτοί οι πολυσακχαρίτες, που είναι απομονωμένοι από εδώδιμα και φαρμακευτικά είδη που ανήκουν σε Ασκομύκητες ή Βασιδιομύκητες, έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε φάρμακα που μπορεί να είναι καρκινοστατικά, αντιφλεγμονώδη, αντιϊικά, υπογλυκαιμικά, υποτασικά και αντιθρομβωτικά (Mizuno 1995; Ikekawa 2001; Xiao κ.α. 2002).

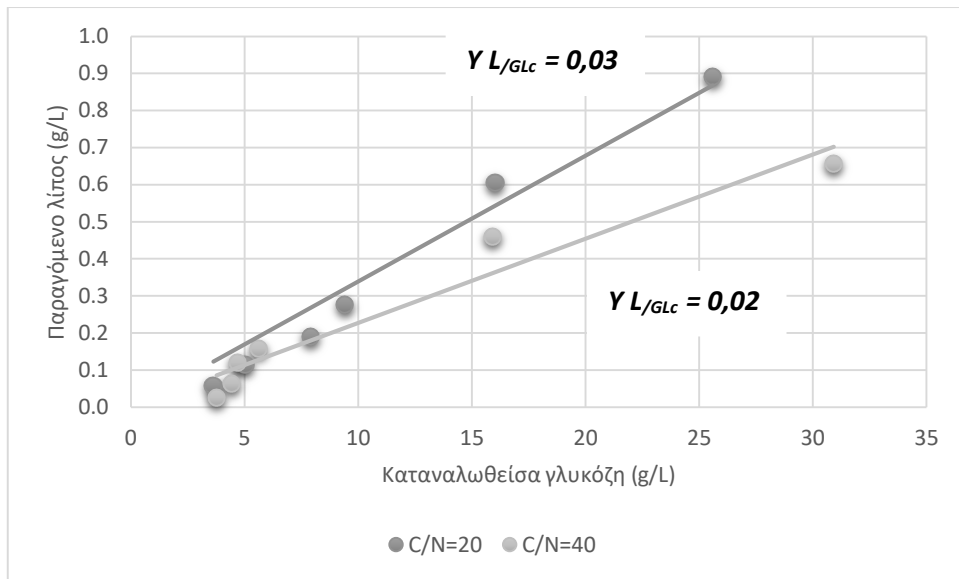
Η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών και εξόχως ουσιωδών και διαφορετικών ρόλων τον οποίο δύνανται να παίζουν τα λιπίδια στο μικροβιακό κύτταρο. Πολλές ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν ότι η ποσότητα (σε % w/w επί ξηράς μικροβιακής μάζας), το ποσοστό (σε % w/w επί των συνολικών λιπιδίων) των διαφόρων κλασμάτων (ουδέτερο κλάσμα, κλάσμα G+S, κλάσμα PL), καθώς επίσης και η σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων κατά τη διάρκεια της μικροβιακής αύξησης δεν είναι σταθερά, η δε φυσιολογική σημασία των μεταβολών αυτών μπορεί να συσχετιστεί με τις φάσεις της αύξησης του μικροοργανισμού, τις φυσικοχημικές μεταβολές του μέσου καλλιέργειας (π.χ. αλλαγές στο pH, στο ποσοστό κορεσμού σε οξυγόνο, κ.λ.π.), καθώς επίσης και με «βαθύτερες» βιοχημικές και κυτταρολογικές αλλαγές του μικροοργανισμού (π.χ. ηλικία ή τραυματισμός του μυκηλίου, «στρες» του μικροοργανισμού λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών ή συσσώρευσης αντι-μεταβολιτών ή παρεμποδιστικών συστατικών στο περιβάλλον της αύξησης, κ.λ.π.) (Losel, 1988; Fakas κ.α., 2009a; Papanikolaou και Aggelis, 2011a). Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά της λιπογένεσης έχουν περιγραφεί για λίγους μύκητες και ακόμα λιγότερους βασιδιομύκητες και περιορίζονται κυρίως στην ανάλυση των καρποσωμάτων (Yokokawa, 1980; Nair κ.α., 1990), ενώ τα άρθρα που αναφέρονται στην παραγωγή λιπιδίων σε καλλιέργειες βυθού είναι περιορισμένου αριθμού.



Διάγραμμα 3.4. Συγκριτική απεικόνιση της παραγωγής λίπους (% w/w) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με C/N=20 με C/N=40. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.



Διάγραμμα 3.5. Συγκριτική απεικόνιση της παραγωγής λίπους L (g/L) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με C/N=20 με C/N=40. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.



Διάγραμμα 3.6. Συγκριτική απεικόνιση της απόδοσης σε λίπος προς την καταναλωθείσα γλυκόζη $Y_{L/Glc}$ (g/g) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με $C/N=20$ με $C/N=40$. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

Το λίπος στο μυκήλιο του μανιταριού δεν ξεπερνά το 4,5% επί ξηρής βιομάζας. Ποσοστό σαν αυτό είναι φυσιολογικό για έναν μη ελαιογόνο μικροοργανισμό. Στην περίπτωση της μικρής ποσότητας γλυκόζης στο υπόστρωμα παρατηρούμε πως υπάρχει μεγαλύτερη συσσώρευση λίπους τις πρώτες 21 μέρες της καλλιέργειας από το υπόστρωμα με την μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης. Αντίθετα τις υπόλοιπες μέρες παρατηρείται το αντίθετο. Η ποσότητα του λίπους δεν ξεπερνά το 1 g/L σε καμία από τις δύο περιπτώσεις που εξετάστηκαν και ο συντελεστής απόδοσης είναι πολύ μικρός της τάξης 0,02-0,03.

Σε πολλές περιπτώσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, εδώδιμοι και φαρμακευτικοί μύκητες όπως οι *A. aegerita*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. sajor-caju*, *Stropharia aeruginosa*, *Phellinus* spp., *F. velutipes*, *Boletus* spp., *L. edodes*, *M. esculenta*, *G. frondosa*, *V. bombycina* κ.λ.π., κατά τη μυκηλιακή φάση της αύξησης τους έχουν αναφερθεί να περιέχουν συνολικά λιπίδια σε ποσοότητες $\leq 10\%$ w/w, επί ξηράς μυκηλιακής μάζας καθώς και άλλοι όπως ο *M. esculenta* που έχει αναφερθεί να περιέχει συνολικά λιπίδια σε ποσοότητες $> 10\%$ (Nair κ.α., 1990; Dembitsky κ.α., 1992; Cheung, 1997; Bespalova κ.α., 2002; Dimou κ.α., 2002; Pedneault κ.α., 2006, 2007; André κ.α., 2010; Diamantopoulou κ.α. 2012,2014).

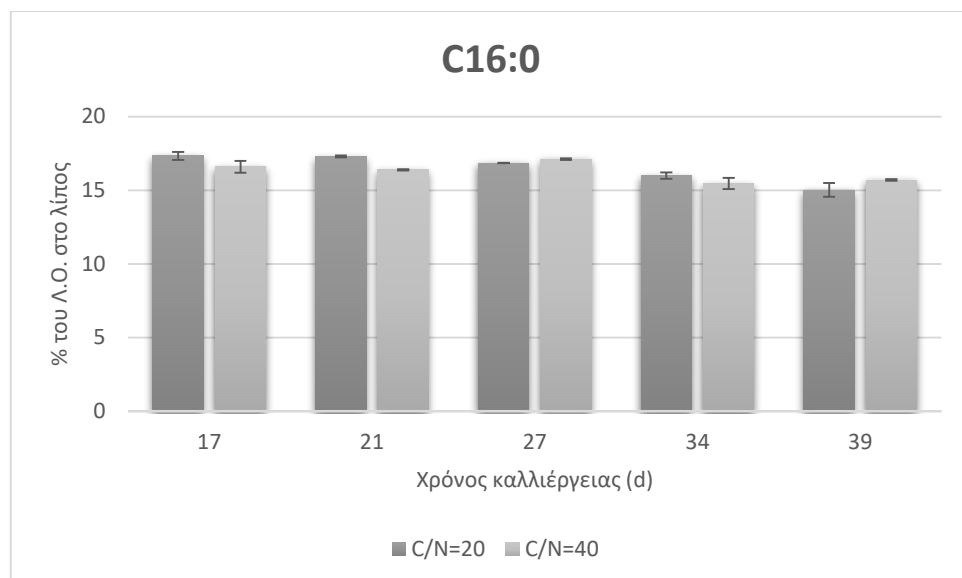
3.1.2. Ανάλυση λιπιδίων

Η σύσταση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων μελετήθηκε με αέρια χρωματογραφία στις διάφορες ημέρες καλλιέργειας όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα και διάγραμματα. Τα κύρια λιπαρά οξέα ήταν το παλμιτικό (16:0), το στεατικό (18:0), το ελαιικό (18:1) και το λινελαϊκό οξύ (18:2),

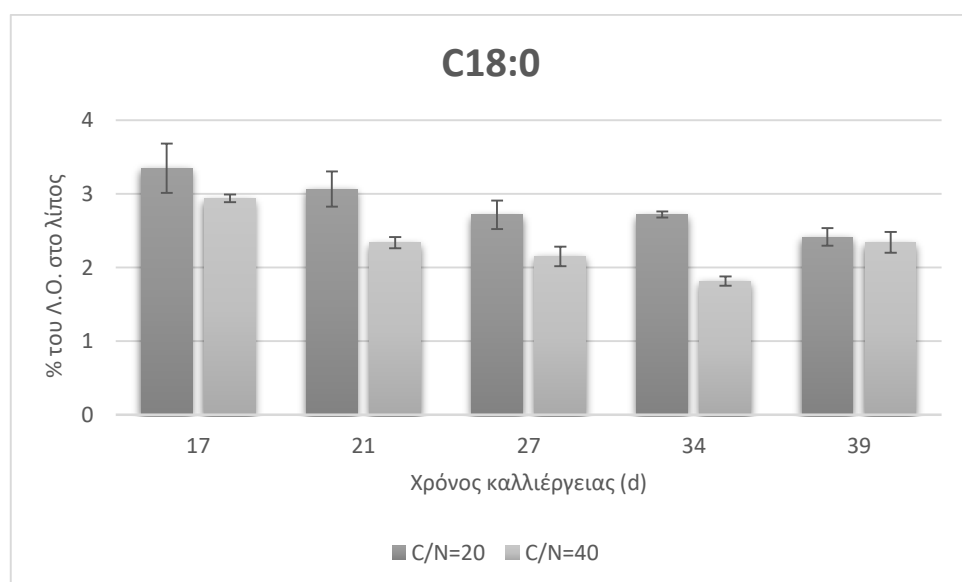
Πίνακας 3.2. Σύσταση λιπαρών οξέων (% w /w) του *A. aegerita* σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g / L και 62,4 g/L.

| | Ημέρες καλλιέργειας | 13 | 17 | 21 | 27 | 34 | 39 |
|---|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Κύρια λιπαρά οξέα | | | | | | |
| Glc₀ = 30 g/L C/N= 20 | C12:0 | 0,22 | 0,15 | 0,13 | 0,10 | 0,08 | 0,06 |
| | C13:0 | 0,27 | 0,35 | 0,22 | 0,21 | 0,15 | 0,11 |
| | C14:0 | 0,35 | 0,31 | 0,17 | 0,24 | 0,21 | 0,20 |
| | C15:0 | 0,36 | 0,35 | 0,32 | 0,30 | 0,21 | 0,29 |
| | C16:0 | 16,39 | 17,34 | 17,29 | 16,85 | 16,00 | 15,02 |
| | C18:0 | 2,44 | 3,35 | 3,07 | 2,72 | 2,72 | 2,42 |
| | ^{Δ9}C18:1 | 5,88 | 13,56 | 18,60 | 22,82 | 26,49 | 26,04 |
| | ^{Δ9,12}C18:2 | 73,12 | 63,89 | 58,86 | 55,87 | 52,89 | 54,58 |
| | Άλλα | 0,98 | 0,72 | 1,34 | 0,89 | 1,25 | 1,28 |
| | Βαθμός ακορεστότητας | 3,9 | 3,5 | 3,7 | 3,9 | 4,1 | 4,5 |
| Glc₀ = 62,4 g/L C/N= 40 | C12:0 | - | 0,19 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,13 |
| | C13:0 | - | 0,28 | 0,24 | 0,26 | 0,19 | 0,19 |
| | C14:0 | - | 0,44 | 0,39 | 0,33 | 0,25 | 0,26 |
| | C15:0 | - | 0,35 | 0,32 | 0,30 | 0,21 | 0,29 |
| | C16:0 | - | 16,60 | 16,39 | 17,11 | 15,46 | 15,70 |
| | C18:0 | - | 2,94 | 2,34 | 2,15 | 1,82 | 2,34 |
| | ^{Δ9}C18:1 | - | 11,32 | 21,26 | 24,15 | 32,47 | 28,40 |
| | ^{Δ9,12}C18:2 | - | 66,98 | 57,42 | 54,24 | 47,51 | 51,32 |
| | Άλλα | - | 0,90 | 1,51 | 1,33 | 1,98 | 1,36 |
| | Βαθμός ακορεστότητας | - | 3,77 | 3,97 | 3,87 | 4,43 | 4,22 |

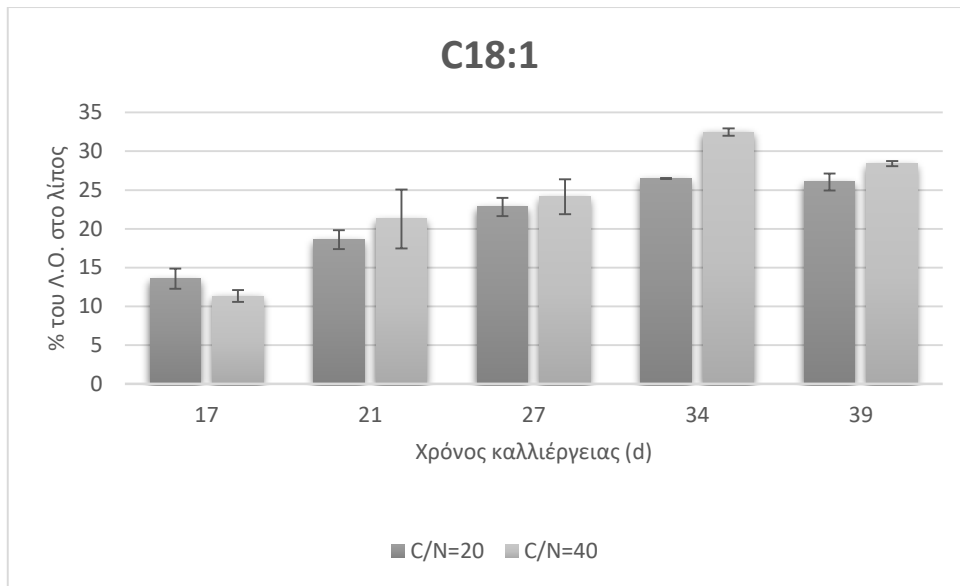
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτενής ανάλυση σχετική με την σύσταση σε ΛΟ των συνολικών λιπιδίων που παράχθηκαν από τον μακρομύκητα *A. aegerita*.



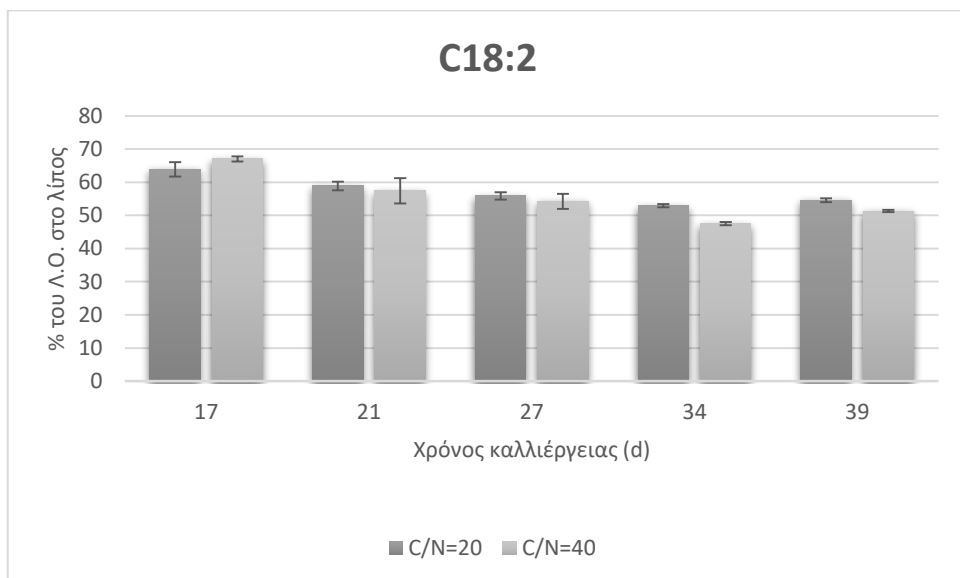
Διάγραμμα 3.9. Συγκριτική απεικόνιση του % ποσοστού παλμιτικού οξέος επί του συνόλου Λ.Ο του *A. aegerita* κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε δύο υποστρώματα με διαφορετικό λόγο C/N.



Διάγραμμα 3.10. Συγκριτική απεικόνιση του % ποσοστού στεατικού οξέος επί του συνόλου Λ.Ο του *A. aegerita* κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε δύο υποστρώματα με διαφορετικό λόγο C/N.



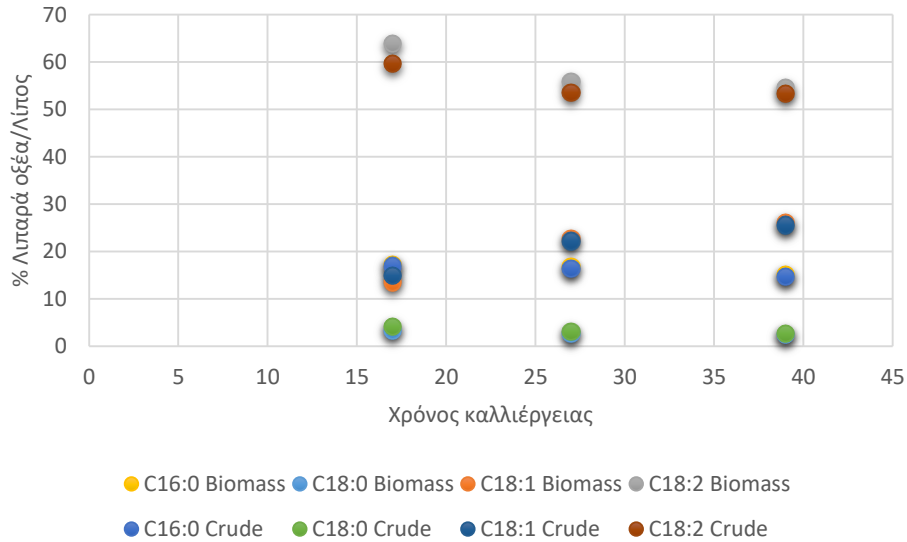
Διάγραμμα 3.11. Συγκριτική απεικόνιση του % ποσοστού ελαιϊκού οξέος επί του συνόλου Λ.Ο του *A. aegerita* κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε δύο υποστρώματα με διαφορετικό λόγο C/N



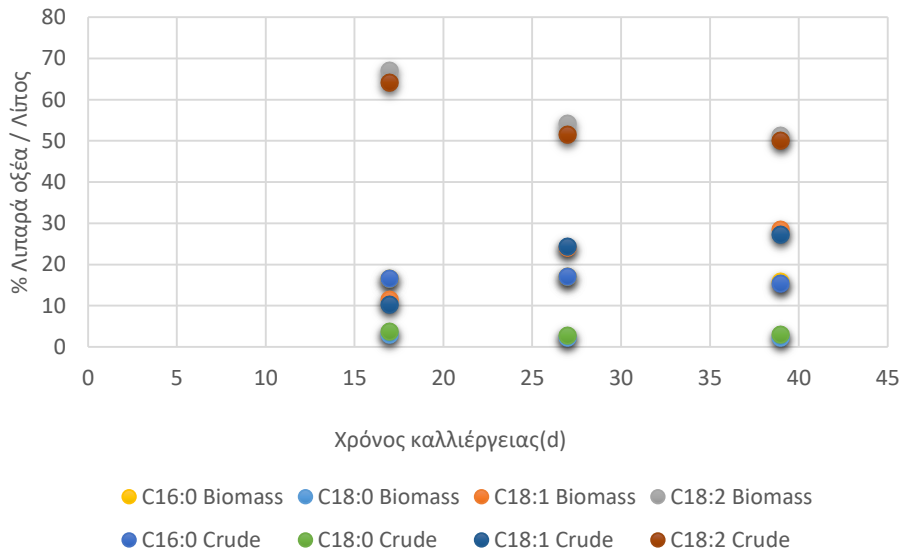
Διάγραμμα 3.12. Συγκριτική απεικόνιση του % ποσοστού λινελαϊκού οξέος επί του συνόλου Λ.Ο του *A. aegerita* κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του σε δύο υποστρώματα με διαφορετικό λόγο C/N

Από την μελέτη αυτή των Λ.Ο. παρατηρήθηκε πως η μεγάλη ποσότητα γλυκόζης του υποστρώματος δεν προκαλεί κάποια διαφορά στην σύσταση του λίπους του μακρομύκητα. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο της απευθείας μετεστεροποίησης σε βιομάζα, πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά σε τρεις

ημέρες της ζύμωσης, μεταστεροποίηση των λιπιδίων που εκχυλίστηκαν βάσει της μεθόδου Folch κ.α. (1957) και ακολούθως προσδιορισμός των μεθυλεστέρων (Διάγραμμα 3.13.).



Διάγραμμα 3.13. Σύγκριση των λιπαρών οξέων (% w/w) του *A.aegerita* σε τρεις διαφορετικές ημέρες καλλιέργειας στο υπόστρωμα με C/N=20, όπως αυτά προέκυψαν από μετεστεροποίηση σε βιομάζα και σε crude λίπος αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.14. Σύγκριση των λιπαρών οξέων (% w/w) του *A. aegerita* σε τρεις διαφορετικές ημέρες καλλιέργειας στο υπόστρωμα με C/N=40, όπως αυτά προέκυψαν από μετεστεροποίηση σε βιομάζα και σε crude λίπος αντίστοιχα.

Παρατηρείται πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη σύσταση του λίπους σε ελεύθερα λιπαρά οξέα όταν η μετεστεροποίηση γίνεται στη βιομάζα αντί του λίπους που είναι η συνήθης διαδικασία.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας καθώς το κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι λινελαϊκό οξύ με ποσοστό 50-70% και ακολουθούν το παλμιτικό, το στεατικό, το ελαϊκό. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η αύξηση του ελαϊκού οξέος κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και στις δύο περιπτώσεις καθώς αυτό ξεκινά με ποσοστό 10-12% και καταλήγει να υπάρχει σε ποσοστό 25-30% του λίπους. Διαφωνούν βέβαια με τα αποτελέσματα της μελέτης των Shuai κ.α (2012) οι οποίοι υποστηρίζουν πως δεύτερο κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το παλμιτικό και με των Diamantopoulou κ.α. 2014 που υποστηρίζουν πως το στεατικό οξύ βρίσκεται σε ποσότητα < 0,4%. Σημαντικό είναι επίσης πως ο βαθμός ακορεστότητας αυξάνεται κατά την διάρκεια της μυκηλιακής αύξησης.

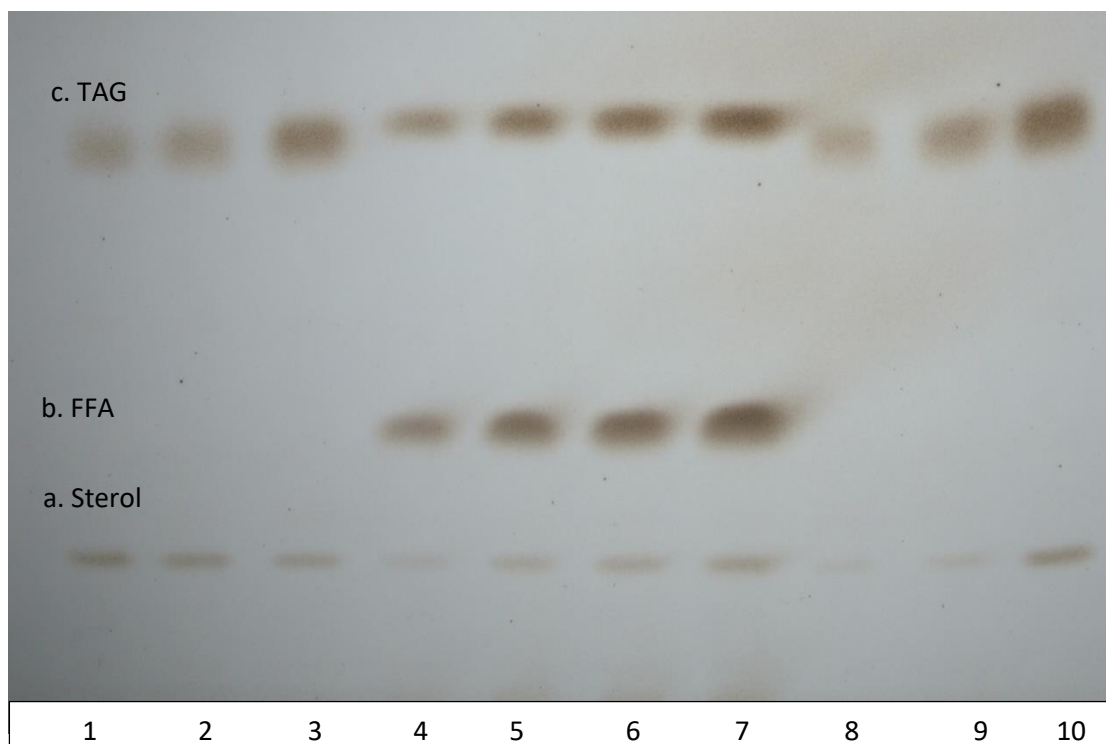
Επίσης, στην παρούσα εργασία κατέστη φανερό ότι η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης (αυξανόμενοι λόγοι C/N 20-40) στις καλλιέργειες *A. aegerita* επιρέασε στην ακορεστότητα των παραγόμενων ΛΟ, αυξάνοντας την ακορεστότητά τους. Λίγο πιο ακόρεστα ήταν τα ΛΟ στον λόγο C/N=40 από αυτά στον λόγο C/N=20.

Η βιβλιογραφία αναφέρει επίσης ότι η σύσταση σε ΛΟ του κυτταρικού λίπους για την περίπτωση των μυκήτων εξαρτάται από το είδος μύκητα, το στάδιο αύξησής του, καθώς επίσης και τις συνθήκες καλλιέργειας (όπως λ.χ. η πηγή άνθρακα και αζώτου του μέσου ανάπτυξης, το pH της καλλιέργειας, η θερμοκρασία επώασης και ο κορεσμός σε οξυγόνο του μέσου καλλιέργειας -Weete, 1980; Ratledge, 1997; Ratledge και Wynn, 2002; Papanikolaou και Aggelis, 2011α,β). Από τη βιβλιογραφία είναι γενικά αποδεκτό ότι στους ανώτερους μύκητες τα ακόρεστα λιπαρά οξέα υπερισχύουν έναντι των κορεσμένων. Συγκεκριμένα, το παλμιτικό οξύ κυριαρχεί στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, το ελαϊκό οξύ στα μονοακόρεστα και το λινελαϊκό οξύ στα πολυακόρεστα, ενώ το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στο σύνολο τους είναι το λινελαϊκό. Τα κύρια λιπαρά οξέα που συναντιόνται στα καρποσώματα και τα μυκήλια των ανώτερων μυκήτων είναι το παλμιτικό, το στεατικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ (Yilmaz κ.α. 2006; Kavishree κ.α. 2008; Kalac 2009; Diamantopoulou κ.α. 2012, 2014). Εκτός από τα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα, υπάρχουν και άλλα που παράγονται μονάχα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. είδος μύκητα, λόγος C/N, ανάδευση, διάρκεια

καλλιέργειας) και καταγράφονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις π.χ. μυριστικό, λινολενικό, παλμιτελαϊκό. Οι Bespalova κ.α. (2002) ανέφεραν ότι ο λόγος C/N δεν επηρεάζει μόνο τη λιπογένεση, αλλά και την ποσοστιαία σύσταση του λίπους, καθώς επίσης και την παρουσία ή όχι κάποιων λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά. Οι Dimou κ.α. (2002) ανέφεραν για το μύκητα *P. ostreatus* ότι δεν βρέθηκαν λιπαρά οξέα με μακριές ακόρεστες αλυσίδες χωρίς διατροφική αξία ή οξέα όπως το α-λινολενικό με μη επιθυμητά τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Περαιτέρω δε, ο συντελεστής ακορεστότητας των ΛΟ των κυτταρικών λιπιδίων εξαρτάται σε πολλές περιπτώσεις από το ποσοστό της λιπογένεσης, καθώς έχει δείχτει ότι όσο μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων συντίθενται στα μυκήλια των μυκήτων, τόσο το λίπος αυτό είναι λιγότερο πλούσιο σε πολυακόρεστα ΛΟ και αντιστρόφως (Kopova κ.α., 1987; Kavadia κ.α., 2001; Bespalova κ.α., 2002; Paranikolaou κ.α., 2004; Fakas κ.α., 2006; Vamvakaki κ.α., 2010). Επίσης, επειδή η ακορεστότητα των λιπαρών οξέων μπορεί να αυξηθεί με μείωση της θερμοκρασίας (Song και Cho, 1991; Pedneault κ.α., 2007) ή να ελαττωθεί (Li κ.α., 1992) απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση των λιπαρών οξέων για ταξινομικούς κ.α. λόγους (Pedneault κ.α., 2007). Οι Kavishree κ.α. (2008) πρότειναν ως επιπρόσθετο βοηθητικό εργαλείο για την ταξινόμηση ειδών του ίδιου γένους, το λόγο λινελαϊκό/ελαϊκό οξύ.

3.1.2.1. Ποσοτική ανάλυση λιπιδίων με TLC

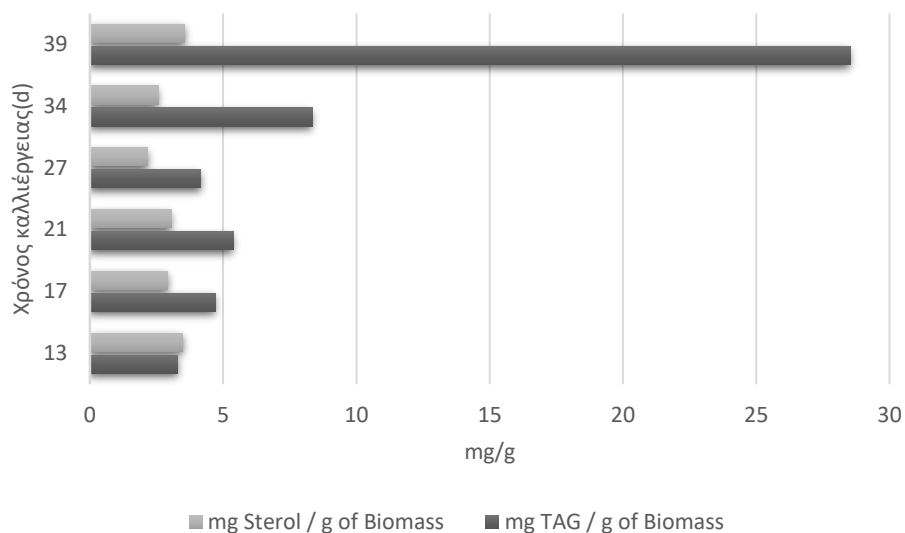
Πέρα από τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων, έγινε προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού των τριακυλογλυκερολών και των στερολών από το κλάσματων ουδετέρων λιπιδίων (NL) καθώς επίσης και των φωσφολιπιδίων (PL) που απομονώθηκαν με χρωματογραφία στήλης. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκε ψηφιακή φωτογραφία της πλάκας TLC και έπειτα επεξεργάστηκε με κατάλληλο λογισμικό. Σε πλάκα TLC εναποτίθενται πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης καθώς και τα δείγματα απο τις διάφορες μέρες καλλιέργειας του μανιταριού. Με την χρήση των προτύπων δημιουργείται καμπύλη βαθμονόμησης με την εξίσωση της οποίας υπολογίζονται και οι τιμές των αγνώστων.



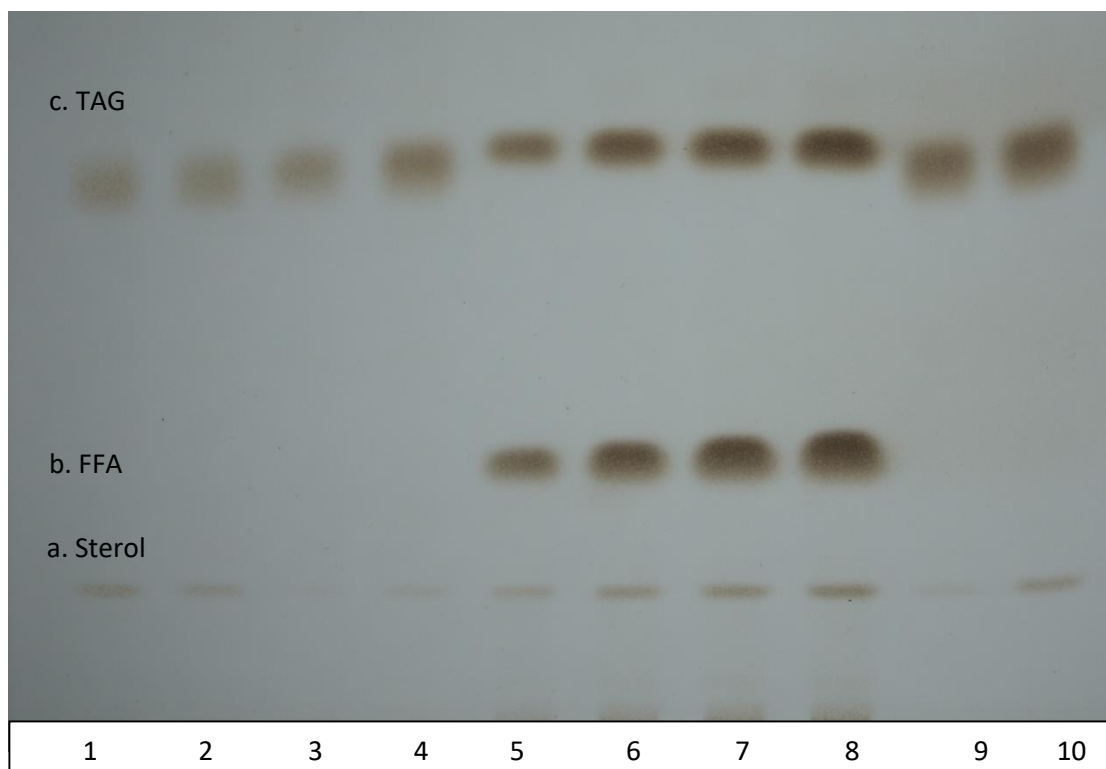
Εικόνα 3.1. Διαχωρισμός ουδέτερων λιπιδίων με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: *n*-εξάνιο /δυεθλαιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, *v/v/v*). Σύστημα αντίχνευσης: Cupric (θειικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.3. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | Μίγμα προτύπων | 4 |
| 5 | Μίγμα προτύπων | 8 |
| 6 | Μίγμα προτύπων | 12 |
| 7 | Μίγμα προτύπων | 16 |
| 8 | C/N = 20 Ημέρα 27 | 15 |
| 9 | C/N = 20 Ημέρα 34 | 15 |
| 10 | C/N = 20 Ημέρα 39 | 15 |



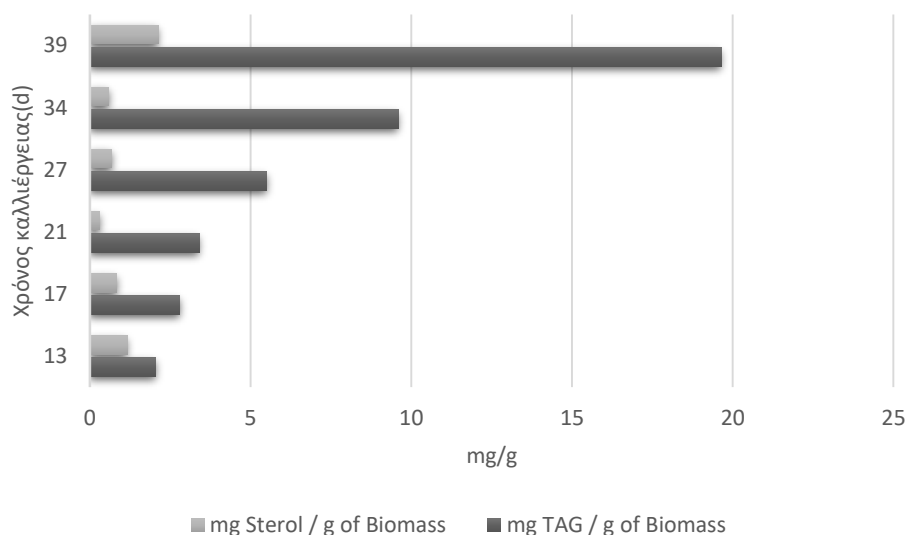
Διάγραμμα 3.15. Παρουσίαση της συγκέντρωσης των στερολών και των τριακυλογλυκερολών του *A.aegerita* (mg/g βιομάζας) σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L.



Εικόνα 3.2. Διαχωρισμός ουδέτερων λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: *n*-εξάνιο /δνεθλαιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: *Cupric* (θειικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

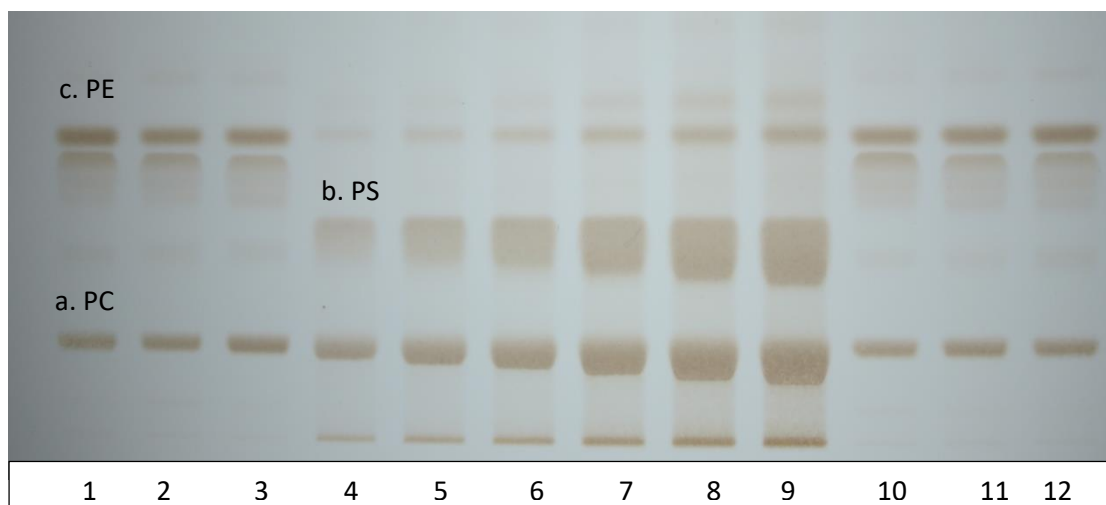
Πίνακας 3.4. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 40 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 40 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 40 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | C/N = 40 Ημέρα 27 | 4 |
| 5 | Μίγμα προτύπων | 8 |
| 6 | Μίγμα προτύπων | 12 |
| 7 | Μίγμα προτύπων | 16 |
| 8 | Μίγμα προτύπων | 15 |
| 9 | C/N = 40 Ημέρα 34 | 15 |
| 10 | C/N = 40 Ημέρα 39 | 15 |



Διάγραμμα 3.16. Παρουσίαση της συγκέντρωσης των στερολών και των τριακυλογλυκερολών του *A. aegerita* (mg/g βιομάζας) σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 62,4 g/L.

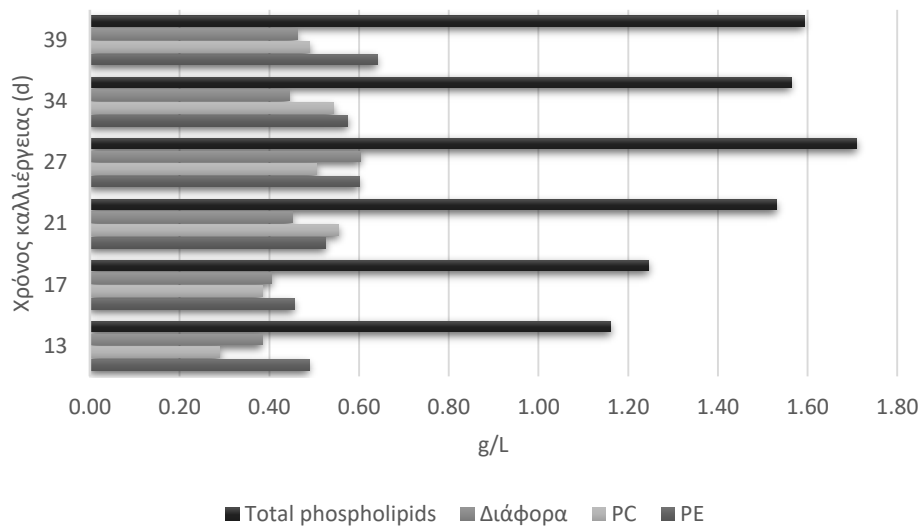
Και στις δύο καλλιέργειες το κύριο λιπίδιο στο ουδέτερο κλάσμα είναι οι τριάκυλογλυκερόλες οι οποίες αυξάνονται με τις ημέρες της καλλιέργειας και ακολουθούν οι στερόλες οι οποίες τείνουν να μειώνονται.



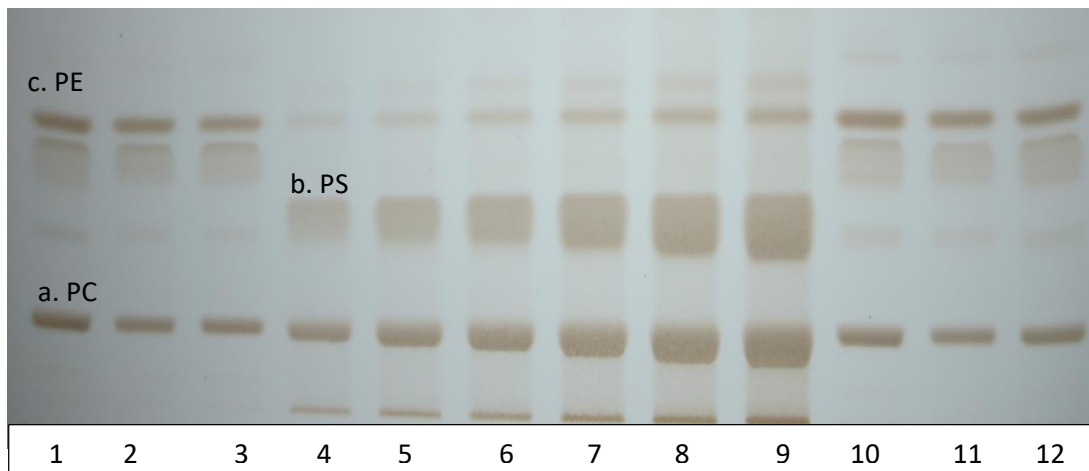
Εικόνα 3.3. Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Cupric (θειικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.5. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 | 12 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 17 | 12 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 21 | 12 |
| 4 | Μίγμα προτύπων | 4 |
| 5 | Μίγμα προτύπων | 6 |
| 6 | Μίγμα προτύπων | 8 |
| 7 | Μίγμα προτύπων | 12 |
| 8 | Μίγμα προτύπων | 16 |
| 9 | Μίγμα προτύπων | 20 |
| 10 | C/N = 20 Ημέρα 27 | 12 |
| 11 | C/N = 20 Ημέρα 34 | 12 |
| 12 | C/N = 20 Ημέρα 39 | 12 |



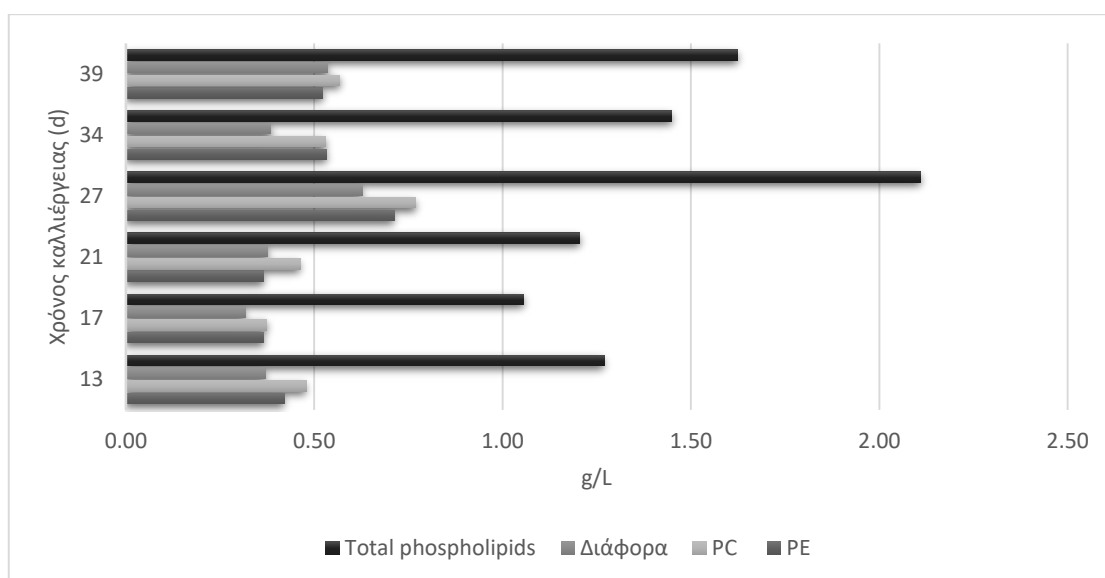
Διάγραμμα 3.17. Παρουσίαση της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων του *A. aegerita* σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L.



Εικόνα 3.4. Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/ μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Cupric (θεικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.6. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

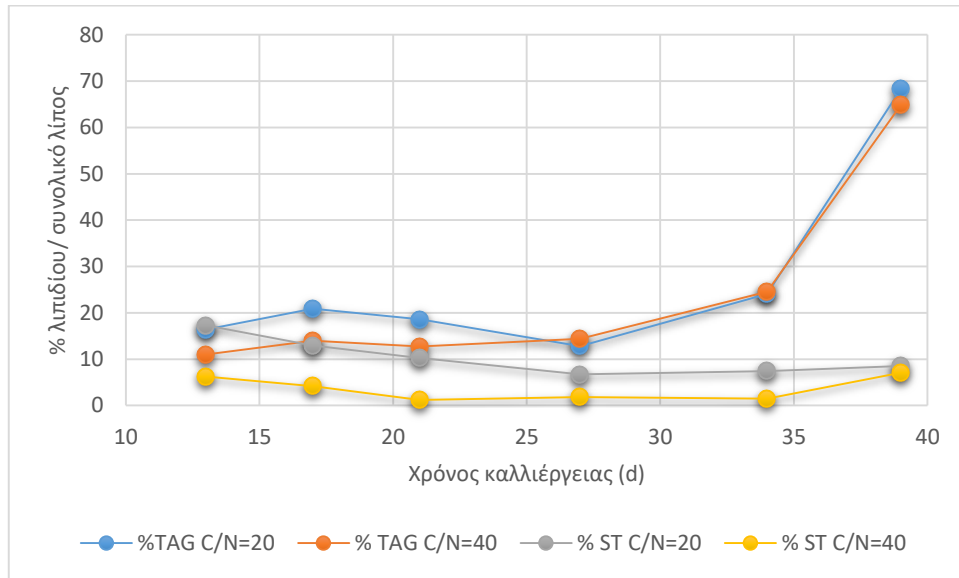
| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 | 12 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 17 | 12 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 21 | 12 |
| 4 | Μίγμα προτύπων | 4 |
| 5 | Μίγμα προτύπων | 6 |
| 6 | Μίγμα προτύπων | 8 |
| 7 | Μίγμα προτύπων | 12 |
| 8 | Μίγμα προτύπων | 16 |
| 9 | Μίγμα προτύπων | 20 |
| 10 | C/N = 20 Ημέρα 27 | 12 |
| 11 | C/N = 20 Ημέρα 34 | 12 |
| 12 | C/N = 20 Ημέρα 39 | 12 |



Διάγραμμα 3.18. Παρουσίαση της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων του *A. aegerita* σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 62,4 g/L.

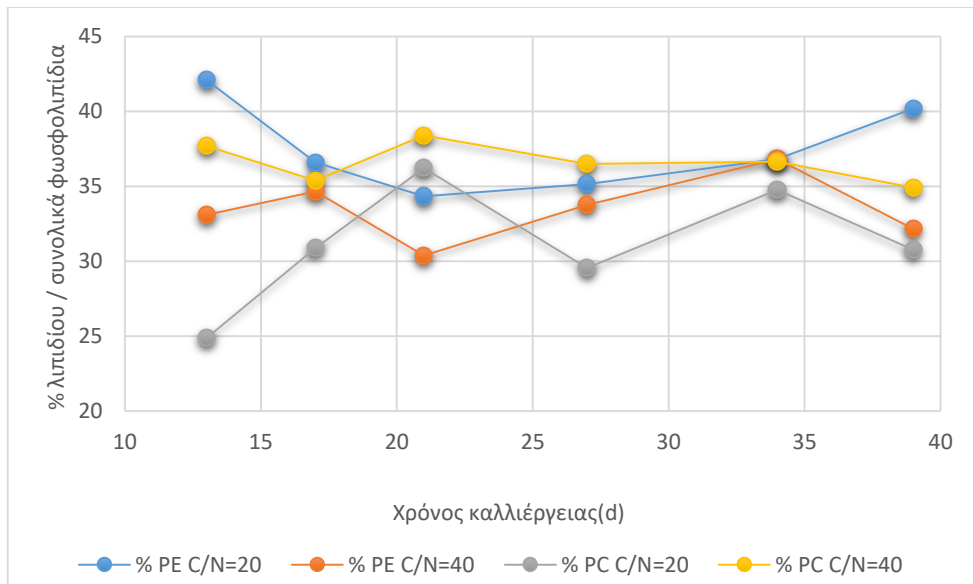
Και στις δύο καλλιέργειες η μεγαλύτερη ποσότητα φωσφολιπιδίων (2,1 g/L) παρατηρείται την 27 ημέρα της καλλιέργειας, γεγονός που μπορεί να συνδέεται με την μεγάλη παραγωγή βιομάζας τις επόμενες ημέρες, καθώς τα φωσφολιπίδια σχετίζονται με την δημιουργία και την καλή λειτουργία των μεμβρανών των κυττάρων.

Όσον αφορά στην ανάλυση των διαφόρων λιπιδίων του μακρομύκητα, λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα για τις δύο καλλιέργειες :



Διάγραμμα 3.19. Συγκριτική απεικόνιση του ποσοστού των κυρίαρχων ουδέτερων λιπιδίων (TAG και Στερόλες) στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με C/N=20 με C/N=40. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

Για τα ουδέτερα λιπίδια, οι τριακυλογλυκερόλες ξεκινούν και στις δύο περιπτώσεις από ποσοστό 10-20% στις πρώτες μέρες της καλλιέργειας και φτάνουν τα 70% την τελευταία. Σημαντική αύξηση φαίνεται να υπάρχει από την 34 ημέρα και μετά, στην οποία έχουμε και την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση υποστρώματος. Οι στερόλες αποτελούν και στις δύο περιπτώσεις μικρή ποσότητα του λίπους <10%.



Διάγραμμα 3.20. Συγκριτική απεικόνιση του ποσοστού των κυρίαρχων φωσφολιπιδίων (PE και PC) στα συνολικά φωσφολιπίδια στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας του *A. aegerita* στα υποστρώματα με C/N=20 με C/N=40. Συνθήκες καλλιέργειας όπως ορίζονται στον Πίνακα 3.1.

Και στις δύο περιπτώσεις η PE κυμαίνεται από 38-42% ενώ η PC από 25-33%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο υπόστρωμα με C/N=20 κατά κύριο λόγο το μανιτάρι συνθέτει μεγαλύτερη ποσότητα PE από PC ενώ στο υπόστρωμα με C/N=40 έχουμε το αντίθετο.

Σημαντικό παράγοντα στην συσσώρευση λίπους πέραν των φυλογενετικών χαρακτηριστικών του κάθε στελέχους παίζει και η εξωκυτταρική διαθεσιμότητα σε άζωτο καθώς και ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος από το μικροοργανισμό (Fakas, 2007; Papanikolaou κ.α., 2007). Ο καθοριστικότερος όμως παράγοντας για την λιπογένεση του μικροοργανισμού είναι ο λόγος άνθρακα/άζωτο (C/N) του υποστρώματος. Για να έχουμε συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων πρέπει ο λόγος C/N να είναι υψηλός. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος αυτός, τόσο μεγαλύτερη και η συσσώρευση λιπιδίων μέχρι μια μέγιστη τιμή, πέραν της οποίας έχουμε μείωση (Moreton, 1988). Η αύξηση του παραγόμενου λίπους μπορεί συνεπώς να επιτευχθεί με μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου (Reusser κ.α., 1957) ή με αύξηση της συγκέντρωσης σε άνθρακα. Στην παρούσα μελέτη δεν το είδαμε αυτό αλλά αξίζει να σημειωθεί πως τα παραπάνω ισχύουν κυρίως για ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Όσον αφορά στο πολικό κλάσμα, στα φωσφολιπίδια δηλαδή, σύμφωνα με την

βιβλιογραφία κυριαρχούν η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε ποσοστό 33-50% κ.β. και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) σε ποσοστό 13-37 % w/w(Wassef και Hendrix, 1977; Kemp κ.α., 1984). Ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά η φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI) και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) (Paltauf και Schats, 1969; Goni κ.α., 1978). Βέβαια, η σύνθεση των PL διαφοροποιείται ανάλογα με τα γενετικά και διατροφικά χαρακτηριστικά κάθε ευκαρυωτικού μικροοργανισμού.

3.1.2.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου

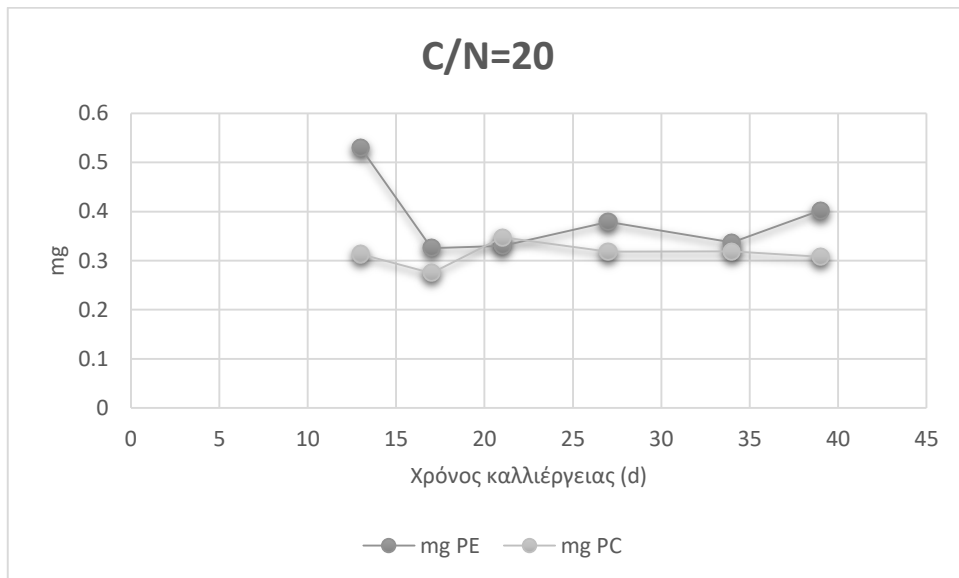
Ο προσδιορισμός του φωσφόρου πραγματοποιήθηκε στο αρχικό εκχύλισμα των λιπιδίων του μανιταριού με στόχο να υπολογιστούν τα ολικά φωσφολιπίδια, δεδομένου ότι υπάρχουν απώλειες λόγω κλασμάτωσης. Για να εξεταστεί η ποσότητα του φωσφόρου στο έλαιο που παράγεται από αυτό το στέλεχος χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος για τον προσδιορισμό του φωσφόρου περιεχόμενου στα δείγματα λιπιδίων (Rouser κ.α., 1970). Η ποσότητα φωσφολιπιδίων υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την ποσότητα του φωσφόρου με 25 (Βλ. στη συνέχεια Πίνακα 3.7.) και παρατηρήθηκε πως τα φωσφολιπίδια κατά κύριο λόγο μειώνονται κατά την ανάπτυξη του μακρομύκητα και στα δύο υποστρώματα.

Πίνακας 3.7. Περιεκτικότητα φωσφόρου και φωσφολιπιδίων κατά τη συσσώρευση λιπιδίων του *A. aegerita* κατά την ανάπτυξή του σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L και 62,5 g/L.

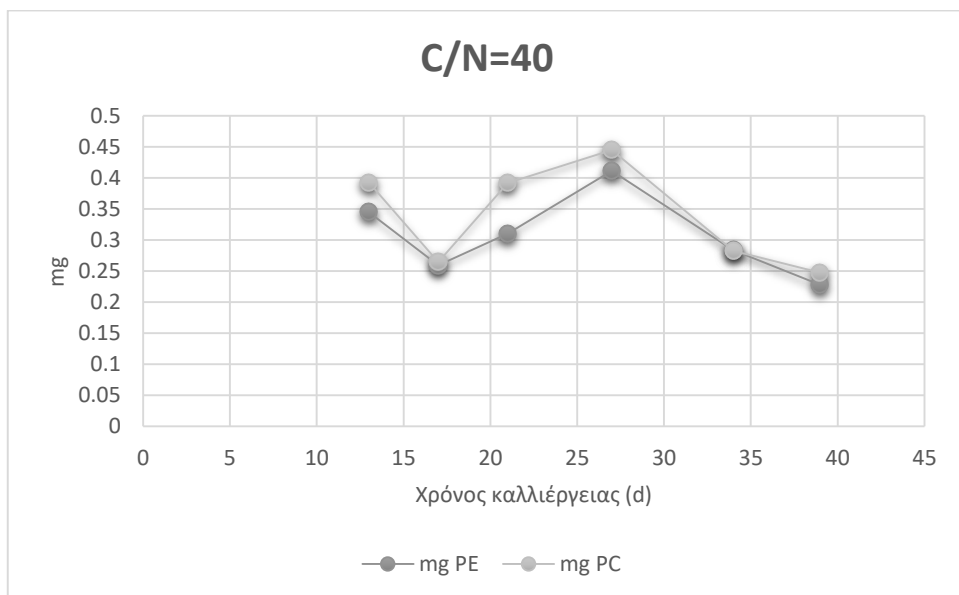
| | Ημέρες (d) | Ολικά λιπίδια (g/L) | μg P /mg ολικών λιπιδίων | mg φωσφολιπιδίων /g ολικών λιπιδίων | Φωσφολιπίδια (g/L) |
|--------------|------------|---------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Glc = 30 g/L | 13 | 2,10 | 1,21 | 599 | 1,26 |
| | 17 | 2,34 | 0,77 | 379 | 0,89 |
| | 21 | 3,06 | 0,63 | 313 | 0,96 |
| | 27 | 3,34 | 0,65 | 322 | 1,08 |
| | 34 | 3,57 | 0,52 | 256 | 0,92 |
| | 39 | 4,30 | 0,47 | 233 | 1,00 |
| | 13 | 2,11 | 1,06 | 521 | 1,04 |
| | 17 | 1,52 | 0,74 | 368 | 0,75 |

| | | | | | |
|-----------------------|-----------|------|------|-----|------|
| Glc = 62,4 g/L | 21 | 2,07 | 0,74 | 367 | 1,02 |
| | 27 | 2,47 | 0,62 | 308 | 1,22 |
| | 34 | 1,56 | 0,39 | 190 | 0,77 |
| | 39 | 1,43 | 0,46 | 229 | 0,71 |

Από τους δύο παραπάνω προσδιορισμούς του φωσφόρου προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για τα κύρια φωσφολιπίδια PE και PC που υπάρχουν στον μακρομύκητα. Σχετικά αποτελέσματα δεν βρέθηκαν στην βιβλιογραφία:



Διάγραμμα 3.21. Παρουσίαση της ποσότητας των δύο κυρίαρχων φωσφολιπιδίων του *A. aegerita* στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας στο υπόστρωμα με τα 30 g/L γλυκόζη.



Διάγραμμα 3.22. Παρουσίαση της ποσότητας των δύο κυρίαρχων φωσφολιπιδίων του *A. aegerita* στις διάφορες ημέρες της καλλιέργειας στο υπόστρωμα με τα 62,4 g/L γλυκόζη.

3.1.2.3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός σακχάρων στα λιπίδια του μακρομύκητα

Οι διάφορες εξόζες που βρίσκονται στη δομή των λιπιδίων προσδιορίστηκαν και εκφράστηκαν ως γλυκόζη (mg/g ολικών λιπιδίων) σύμφωνα με μία τροποποίηση της μεθόδου φαινόλης-θειικού οξέος σύμφωνα με τους Kushwaha και Kates,(1980). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5., παρατηρείται μέγιστη περιεκτικότητα σε γλυκόζη και ως εκ τούτου των γλυκολιπιδίων στην μέση του χρόνου καλλιέργειας του μακρομύκητα. Δεν βρέθηκε κάτι σχετικό στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 3.8. Η ποσότητα σακχάρων κατά τη συσσώρευση λιπιδίων του *A. aegerita* κατά την ανάπτυξή του σε μέσο που περιέχει εμπορική γλυκόζη σε αρχική συγκέντρωση 30 g/L και 62,4 g/L.

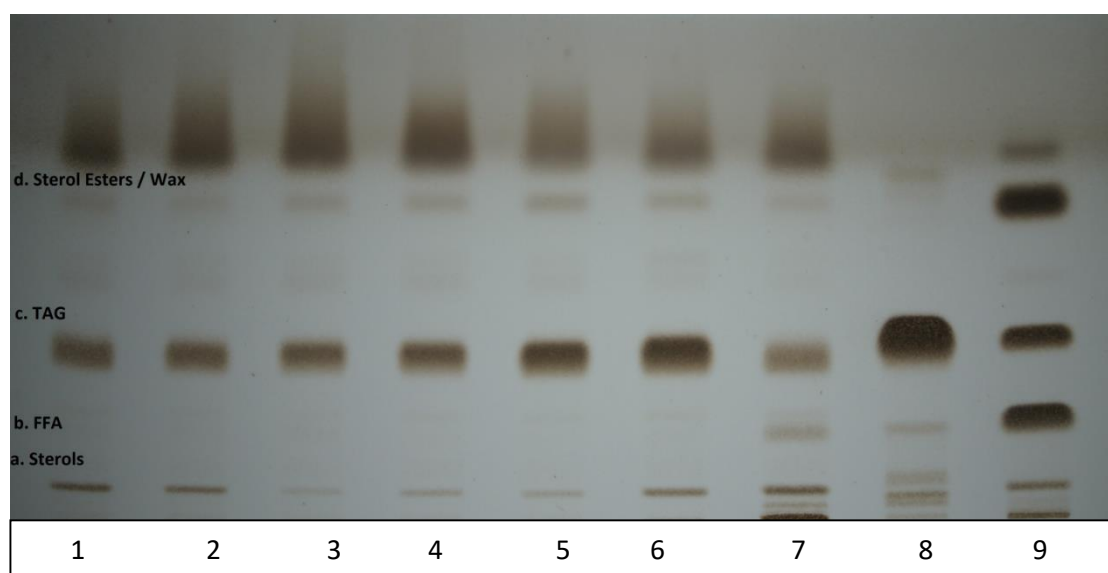
| | Ημέρες (d) | Ολικά λιπίδια (mg/mL) | mg γλυκόζης /g λιπιδίων |
|-----------------------|------------|-----------------------|-------------------------|
| Glc = 30 g/L | 13 | 2,10 | 0,06 |
| | 17 | 2,34 | 0,06 |
| | 21 | 3,06 | 0,03 |
| | 27 | 3,34 | 0,03 |
| | 34 | 3,57 | 0,03 |
| | 39 | 4,30 | 0,02 |
| Glc = 62,4 g/L | 13 | 2,00 | 0,02 |
| | 17 | 2,04 | 0,02 |
| | 21 | 2,79 | 0,04 |
| | 27 | 3,95 | 0,02 |
| | 34 | 4,05 | 0,01 |
| | 39 | 3,10 | 0,01 |

3.1.2.3 Ποιοτική ανάλυση τάξεων λιπιδίων του μακρομύκητα *A. aegerita* με TLC

Η εφαρμογή της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) στο διαχωρισμό των ουδέτερων και των πολικών λιπιδίων κλασμάτων λιπιδίων του *A. aegerita* σε διαφορετικά συστατικά πραγματοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις επόμενες ενότητες.

Ουδέτερα λιπίδια

Εστέρες στερολών, στερόλες, κηροί, ελεύθερα λιπαρά οξέα, ακυλογλυκερόλες και άλλα παρόμοια λιπίδια μπορούν να διαχωριστούν ως τάξεις με την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας σε κατηγορίες ενώσεων με διαφορετικές πολικότητες, ανάλογα με τον τύπο και τον αριθμό των λειτουργικών τους ομάδων (Stahl, 1969). Η μονοδιάστατη TLC με τους διαλύτες που προαναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο: n-εξάνιο / διαιθυλαιθέρας / οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v) οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό του κλάσματος των ουδέτερων λιπιδίων του μανιταριού, όπως φαίνεται στα ακόλουθα σχήματα. Η ταυτοποίηση των τάξεων των ουδέτερων κατηγοριών λιπιδίων έγινε με αυθεντικά πρότυπα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον πίνακα καθώς και με εκλεκτικά αντιδραστήρια εμφάνισης.



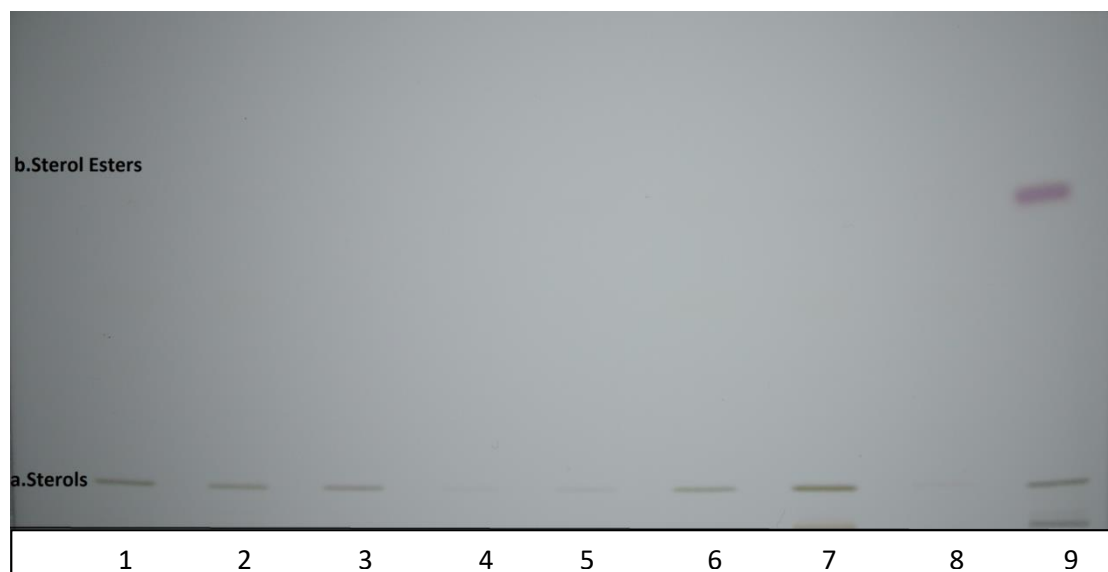
Εικόνα 3.5. Διαχωρισμός ουδέτερων λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): α. Στερόλες R_f (0,08) β. Ελεύθερα λιπαρά οξέα R_f (0,21) γ. TAG R_f (0,53) δ. Εστέρες Στερολών και κηροί R_f (0,71). Σύστημα διαλυτών: n-εξάνιο /διεθυλαιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Cupric (θειικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.9. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|-------------|-------------------|------------------------------|
| 1 | C/N = 40 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 40 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 40 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | C/N = 40 Ημέρα 27 | 15 |
| 5 | C/N = 40 Ημέρα 34 | 15 |
| 6 | C/N = 40 Ημέρα 39 | 15 |
| 7 | Λίπος | 15 |
| 8 | Ελαιόλαδο 1% | 10 |
| 9 | Μίγμα προτύπων | 10 |

Τα κλάσματα ουδέτερου λιπιδίου από διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης, μία εναπόθεση από λίπος, μία από ελαιόλαδο, μία από πρότυπο διάλυμα και οι όγκοι των κηλίδων τους (μL) περιγράφονται στον Πίνακα 3.13. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5., η ταυτοποίηση των κατηγοριών λιπιδίων του μανιταριού πραγματοποιήθηκε με σύγκριση με τα διαθέσιμα αυθεντικά πρότυπα. Αυτά τα κλάσματα αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (TAG) όπως φαίνεται στο σχήμα και σε μικρότερο βαθμό από άλλες ουδέτερες ενώσεις όπως στερόλες π.χ. χοληστερόλη (CL) και κηρούς (Waxes) ενώ το crude περιέχει και λίγα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), τα οποία δεν περάσαν στο κλάσμα των ουδετέρων.

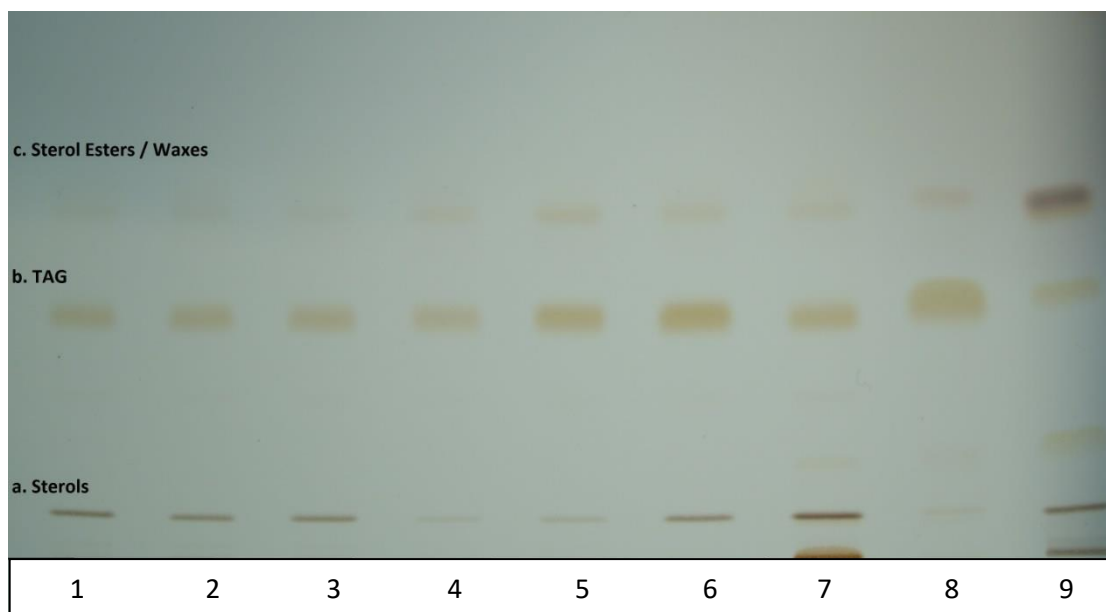
Το διάλυμα Cupric (10% θεικού χαλκού σε 10% φωσφορικού οξέος) αποτελεί γενικό αντιδραστήριο εμφάνισης των λιπιδίων.



Εικόνα 3.6. Διαχωρισμός ουδέτερων λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): α. Στερόλες R_f (0,08) β. Εστέρες Στερολών R_f (0,71). Σύστημα διαλυτών: *n*-εξάνιο /δουαιθυλιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Ferric Chloride(τριχλωριούχος σίδηρος) θέρμανση στους 120 °C για 2 λεπτά.

Πίνακας 3.10. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 40 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 40 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 40 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | C/N = 40 Ημέρα 27 | 15 |
| 5 | C/N = 40 Ημέρα 34 | 15 |
| 6 | C/N = 40 Ημέρα 39 | 15 |
| 7 | Λίπος | 15 |
| 8 | Ελαιόλαδο 1% | 10 |
| 9 | Μίγμα προτύπων | 10 |



Εικόνα 3.7. Διαχωρισμός ουδέτερων λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): α. Στερόλες $R_f(0,08)$ β. TAG $R_f(0,53)$ γ. Εστέρες Στερολών και κηροί $R_f(0,71)$. Σύστημα διαλυτών: *n*-εξάνιο /δνεθυλαιθέρας/οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Ferric Chloride(τριχλωριούχος σίδηρος) θέρμανση στους 120 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.11. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 40 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 40 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 40 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | C/N = 40 Ημέρα 27 | 15 |
| 5 | C/N = 40 Ημέρα 34 | 15 |
| 6 | C/N = 40 Ημέρα 39 | 15 |
| 7 | Λίπος | 15 |
| 8 | Ελαιόλαδο 1% | 10 |
| 9 | Μίγμα προτύπων | 10 |

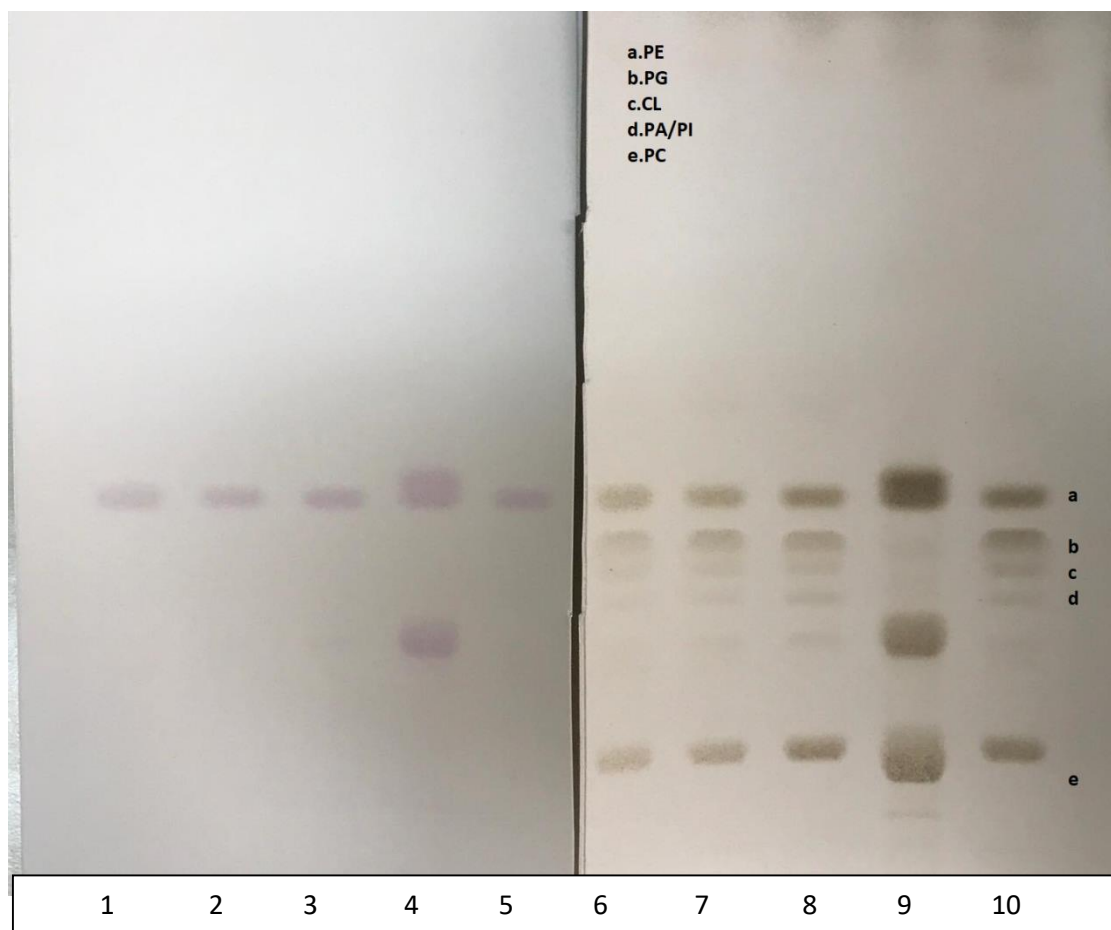
Τα κλάσματα ουδέτερου λιπιδίου από διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης και οι όγκοι των κηλίδων τους (μL) περιγράφονται στον πίνακα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6. , η ταυτοποίηση των κατηγοριών λιπιδίων του μακρομύκητα πραγματοποιήθηκε με σύγκριση με τα διαθέσιμα αυθεντικά πρότυπα. Αυτά τα κλάσματα αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (TAG) και σε μικρότερο βαθμό από άλλες ουδέτερες ενώσεις όπως στερόλες π.χ. χοληστερόλη (CL) και κηρούς (Waxes) όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα.

Σε αυτό το σύστημα διαλυτών, οι πιο πολικές τάξεις λιπιδίων, όπως οι CL, FFA προσροφώνται πιο έντονα στη στατική φάση και επομένως μετατοπίζονται σε μικρότερο βαθμό (τιμές Rf, ίσες με 0,08 και 0,21 αντίστοιχα) συγκριτικά με τις λιγότερο πολικές τάξεις λιπιδίων όπως οι TAG και CE (τιμές Rf, ίσες με 0,53, 0,71 αντίστοιχα). Η ένταση κάθε ζώνης είναι ανάλογη με την ποσότητα κάθε ουσίας.

Με το αντιδραστήριο του τριχλωριούχου σιδήρου βάφονται με ροζ-μωβ χρώμα οι στερόλες και οι εστέρες στερολών. Όπως φαίνεται στην πρώτη εικόνα (Εικόνα 3.6.), η οποία αναφέρεται στην εμφάνιση των λιπιδίων έπειτα από πολύ μικρό χρονικό διάστημα θέρμανσης, τα κλάσματα των λιπιδίων του μανιταριού περιέχουν στερόλες αλλά δεν περιέχουν εστέρες στερολών. Στην συνέχεια (Εικόνα 3.7.) με περαιτέρω θέρμανση, εμφανίζονται και τα υπόλοιπα λιπίδια με καφέ χρώμα. Έτσι διαπιστώνεται πως στα κλάσματα περιέχονται στερόλες, τριακυλογλυκερόλες και κηροί καθώς αυτές οι μπάντες μπορούν να ταυτοποιηθούν με την χρήση του προτύπου.

Πολικά κλάσματα λιπιδίων

Η μονοδιάστατη TLC με τους διαλύτες που προαναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v), οδηγεί σε διαχωρισμό των πολικών λιπιδίων όπως φαίνεται στις ακόλουθες εικόνες. Η ταυτοποίηση του κλάσματος φωσφολιπιδίων έγινε με αυθεντικά πρότυπα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον πίνακα. Για την ταυτοποίηση των φωσφολιπιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Dittmer και Νινυδρίνης και για τα γλυκολιπίδια χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο αντίχνευσης α-ναφθόλης.

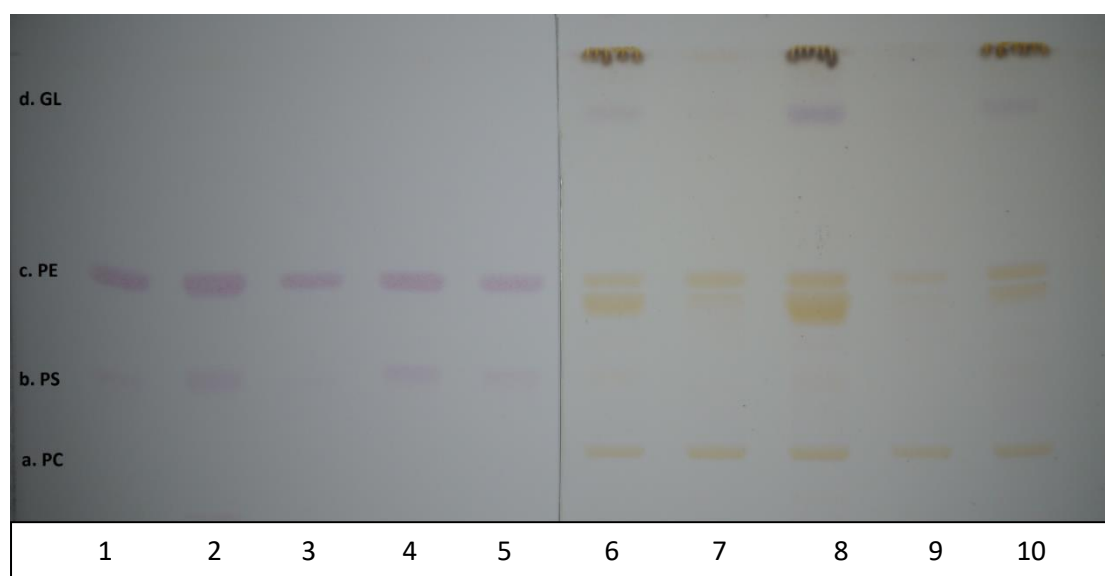


Εικόνα 3.8. Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Αριστερά διάλυμα νινυδρίνης με θέρμανση στους 120 °C για 10-15 λεπτά, δεξιά διάλυμα Cupric (θειικός χαλκός) θέρμανση στους 180 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.12 Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|-------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 | 15 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 17 | 15 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 21 | 15 |
| 4 | Μίγμα προτύπων | 10 |
| 5 | C/N = 20 Ημέρα 27 | 15 |
| 6 | C/N = 20 Ημέρα 13 | 20 |
| 7 | C/N = 20 Ημέρα 17 | 20 |

Κλάσματα φωσφολιπιδίων από διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης, πρότυπο διάλυμα με PE, PC και PS και οι όγκοι των κηλίδων τους (μL) περιγράφονται στον Πίνακα 3.12. Στην παραπάνω Εικόνα 3.8. έχουν χρησιμοποιηθεί δύο χρώσεις. Αριστερά με το αντιδραστήριο νινυδρίνης, η οποία έχει την ιδιαιτερότητα πως βάφει με ροζ χρώμα τα λιπίδια που έχουν στη δομή τους α αμινομάδα. Έτσι, γίνεται ταυτοποίηση της PE με Rf (0,54). Δεξιά με το αντιδραστήριο θειικού χαλκού το οποίο είναι ένα γενικό αντιδραστήριο για την εμφάνιση των λιπιδίων. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ταυτοποίηση και της PC με Rf (0,15) αλλά και της μικρής ποσότητας PS με Rf (0,27). Παρατηρείται η ύπαρξη και άλλων λιπιδίων τα οποία λόγω έλλειψης προτύπων μπορεί να θεωρηθεί με την χρήση των Rf πως είναι PG (Rf 0,42) , CL (Rf 0,38) και PA/PI με (Rf 0,3) αντίστοιχα.



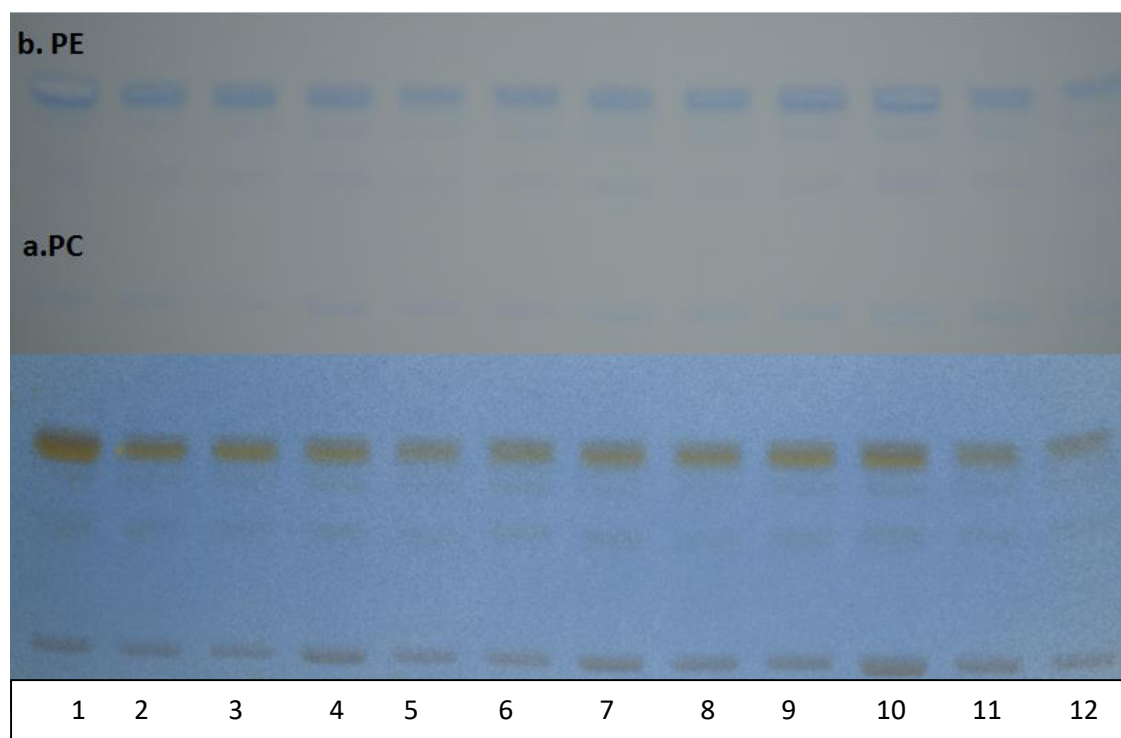
Εικόνα 3.9. Διαχωρισμός πολικών λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Αριστερά διάλυμα νινυδρίνης με θέρμανση στους 120 °C για 10-15 λεπτά, δεξιά διάλυμα ναφθόλης/θειικού οξέος θέρμανση στους 120 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακας 3.13. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|-------------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 phospho | 20 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 13 crude | 20 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 34 phospho | 20 |
| 4 | C/N = 20 Ημέρα 34 crude | 20 |
| 5 | C/N = 20 Ημέρα 21 crude | 20 |
| 6 | C/N = 20 Ημέρα 21 crude | 20 |
| 7 | C/N = 20 Ημέρα 13 phospho | 20 |
| 8 | C/N = 20 Ημέρα 13 crude | 20 |
| 9 | C/N = 20 Ημέρα 34 phospho | 20 |
| 10 | C/N = 20 Ημέρα 34 crude | 20 |

Κλάσματα φωσφολιπιδίων από διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης, το αντίστοιχο crude λίπος οι όγκοι των κηλίδων τους (μL) περιγράφονται στον Πίνακα 3.13. Στην παραπάνω Εικόνα 3.9. έχουν χρησιμοποιηθεί δύο διαφορετικές εκλεκτικές χρώσεις. Αριστερά με χρώση με διάλυμα νινυδρίνης η οποία έχει την ιδιαιτερότητα πως βάφει με ροζ χρώμα τα λιπίδια που έχουν στη δομή τους α αμινομάδα. Προηγουμένως με την χρήση προτύπου παρατηρήθηκε πως τα κύρια φωσφολιπίδια στο κλάσμα είναι το PE με Rf (0,54) και το PC με Rf (0,15). Από αυτά με την χρώση της νινυδρίνης εμφανίζεται μόνο το PE. Δεξιά χρησιμοποιήθηκε χρώση με διάλυμα α- ναφθόλης το οποίο είναι εκλεκτικό αντιδραστήριο για την εμφάνιση των γλυκολιπιδίων με μωβ χρώμα ενώ τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια βάφονται καφέ. Η ζώνη που βάφεται με Rf (0,9) πιθανόν είναι MGPG, αλλά λόγω έλλειψης προτύπου ταυτοποίηση της ένωσης δεν δύναται να πραγματοποιηθεί.

Ειδικό αντιδραστήριο για την εμφάνιση των φωσφολιπιδίων όπως προαναφέρθηκε είναι το αντιδραστήριο Dittmer.



Εικόνα 3.10 Διαχωρισμός φωσφολιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Σύστημα διαλυτών: οξικός μεθυλεστέρας/προπανόλη/χλωροφόρμιο/μεθανόλη/διάλυμα 0,25% χλωριούχο κάλιο (25:25:25:10:9, v/v/v/v). Σύστημα ανίχνευσης: Dittmer πάνω χωρίς θέρμανση 10 λεπτά μετά τον ψεκασμό, κάτω θέρμανση στους 120 °C για 10-15 λεπτά.

Πίνακα 3.14. Συνθήκες εναπόθεσης δειγμάτων και προτύπων στο χρωματογράφημα.

| Ζώνη | Δείγμα | Όγκος εναπόθεσης (μL) |
|------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | C/N = 20 Ημέρα 13 phospho | 20 |
| 2 | C/N = 20 Ημέρα 17 phospho | 20 |
| 3 | C/N = 20 Ημέρα 21 phospho | 20 |
| 4 | C/N = 20 Ημέρα 27 phospho | 20 |
| 5 | C/N = 20 Ημέρα 34 phospho | 20 |
| 6 | C/N = 20 Ημέρα 39 phospho | 20 |
| 7 | C/N = 40 Ημέρα 13 phospho | 20 |
| 8 | C/N = 40 Ημέρα 17 phospho | 20 |
| 9 | C/N = 40 Ημέρα 21 phospho | 20 |
| 10 | C/N = 40 Ημέρα 27 phospho | 20 |
| 11 | C/N = 40 Ημέρα 34 phospho | 20 |
| 12 | C/N = 40 Ημέρα 39 phospho | 20 |

Κλάσματα φωσφολιπιδίων από όλες τις ημέρες της καλλιέργειας και οι όγκοι των κηλίδων τους (μL) περιγράφονται στον Πίνακα 3.14 . Η παραπάνω Εικόνα 3.10. έχει ψεκαστεί με αντιδραστήριο Dittmer. Σε χρόνο δέκα λεπτών μετά τον ψεκασμό τα φωσφολιπίδια βάφονται μπλέ. Στη συνέχεια, με θέρμανση της πλάκας το φόντο γίνεται μπλέ και τα φωσφολιπίδια βάφονται καφέ.

4. Συμπεράσματα της μελέτης

- Η μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης (62,4 g/L) στο υπόστρωμα δεν έδρασε παρεμποδιστικά στην παραγωγή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών, αλλά ούτε και στην βιοσύνθεση και σύσταση των λιπιδίων του *A. aegerita*.
- Η μετεστεροποίηση σε βιομάζα είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος, καθώς το αποτέλεσμα της δεν διαφέρει σημαντικά από την μετεστεροποίηση σε crude λίπος και γίνεται εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων.
- Οι κύριες κατηγορίες ουδέτερων λιπιδίων του μακρομύκητα είναι οι στερόλες και οι τριακυλογλυκερόλες και των πολικών λιπιδίων είναι το PE και το PC. Στις πρώτες μέρες της καλλιέργειας, ο μακρομύκητας συνθέτει πολλά φωσφολιπίδια στη συνέχεια υπερτερούν οι τριακυλογλυκερόλες.
- Τα ακόρεστα ΛΟ αποτέλεσαν το ~80%, w/w των ολικών λιπαρών οξέων, ενώ τα κορεσμένα μόνο το ~20%, w/w.
- **Ο μακρομύκητας *A.aegerita*** έδειξε πως έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί παράγοντας μεγάλη ποσότητα βιομάζας σε υπόστρωμα που περιέχει μεγάλη ποσότητα σακχάρου. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό εύρημα, καθώς θα μπορούσε να καλλιεργηθεί και σε απόβλητα πλούσια σε σάκχαρα όπως είναι αυτά των αρτοποιειών ή των βιομηχανιών παρασκευής παιδικών τροφών και να παραχθεί κάποιο προϊόν το οποίο έχει υψηλότερη αξία όπως είναι ένα edώδιμο και φαρμακευτικό μανιτάρι.
- **Ο μακρομύκητας *A. aegerita*** παράγει μεγάλη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (~65%) κάτι που υποδεικνύει την δυνατότητα χρήσης του στον τομέα της φαρμακευτικής, αυξάνοντας έτσι την αξία του εκτός από τρόφιμο και ως φαρμακευτικό προϊόν, κάτι που θα το καθιστούσε μοναδικό διατροφικό ελληνικό προϊόν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggelis, G., Pina, M., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Graille, J., Galzy, P., Martin, P. and Peraud, J., (1987). Production d'huiles riches en acide g-linolenique par diverses souches de Phycomycetes. *Oleagineux*, 1987, 42, 379-386.
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2009). Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences* 9 (6), 468-478.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M. and Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crop and Products* 31, 407-416.
- Babitskaya, V.G., Shcherba V.V., Puchkova T.A. and Smirnov, D.A. (2005). Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: Factors affecting their production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2 (41), 169-173.
- Bespalova, L.A., Makarov O.E., Antonyuk L.P. and Ignatov V.V. (2002). Lipogenesis in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* cultivated on different media. *Applied Biochemistry and Microbiology* 4 (38), 349-354.
- Brennan, P.J., Losel, D.M., (1978). *Advances in Microbial Physiology* 17, 47-180.
- Cavonius L.R., Carlsson N.G., Undeland I., (2014). Quantification of total fatty acids in microalgae: comparison of extraction and transesterification methods, *Anal Bioanal Chem* (2014) 406:7313–7322.
- Cerv, G. (1993). *Phospholipids Handbook*. Dekker, New York.
- Chang, S. and Miles, P. (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.
- Christie, W. (2003). *Lipid Analysis*, 3rd ed. The Oily Press, Ayr, Scotland.
- Cohen, Z., Ratledge, C. (2005). *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 2005.
- Deinstrop E. (2007). *Applied Thin-Layer Chromatography, Best Practice and Avoidance of Mistakes*, second, Revised and Enlarged Edition.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A. (2012). Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various Mushroom Species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 536-551.

- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A. (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and Biosystem Engineering* 37, 1385-1400.
- Dimou, D., Georgala, A., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2002). Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus spp.* and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, Volume 106, Issue 8, 925-929.
- Dimou, D., Zervakis, G. and Polemis, E. (2008). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: IV. Macrofungi from *Abies cephalonica* forests and other intermixed tree species (Oxya Mt., central Greece). *Mycotaxon* 104: 39–42.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Eds., Cohen, Z., Ratledge, C., Champaign, I, Illinois: AOCS Press, 2005, 1–20.
- Ergönül, P., Akata, I., Kalyoncu, F., Ergönül, B. (2013). Fatty Acid Composition of Six Wild Edible Mushroom Species, *Scientific World Journal* 4 pages.
- Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme Microb. Technol.* 2007, 40, 1321–1327.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnol.* 2006, 73, 676-683.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2008). Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1062-1070.
- Fang, Q-H. and Zhong, J-J. (2002 α). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226(1), 497-509.
- Fuchs, B., Suß, R., Nimptsch, A., Schiller, J. (2009). Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectroscopy directly combined with thin layer chromatography (TLC), A review of the current state, *Chromatographia*, 69, 95-105.
- Hamilton, R. and Hamilton, S. (1992). *Lipid analysis, A practical Approach*, IRL press, Oxford.
- Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care.
- Illingworth, R., Rose, A., Beckett, A. (1973). Changes in the Lipid Composition and Fine Structure of *Saccharomyces cerevisiae* During Ascus Formation. *Journal of Bacteriology* 1973 Jan; 113(1), 373-386.
- J Food Sci Technol* (October 2015) 52(10):6711–6718 DOI 10.1007/s13197-015-1783-6
- Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113, 9-16.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B., Shashirekha, M. and Rajarathan, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry* 106, 597-602.
- Kemp, P., Landre, D.J. and Orpin, C.G. (1984). The lipids of the rumen fungus *Piromonas communis*. *Journal General Microbiology*, 130, 27-37.
- 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.
- Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T. and Moriyama, T. (2001). *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 281, 657.

- Konova, I., Rudakova L., Pan'kina O. and Ovsyannikova M. (1987). Lipogenesis in *Cunninghamella japonica* on Physiologically Different Media. *Izvestiya Akademii Nauk.* 3, 346-352.
- Koutinas, A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A. and Bosnea, L. (2009). Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100, 3734-3739.
- Kurt, R., Ed., (1968). *Thin Layer Chromatography*, 2nd ed., Verlag Chemie, Academic Press, New York, 1968.
- Laskin, A., Bennett, J., Gadd, G. *Advances in Applied Microbiology*, volume 51.
- Lomberh, M., Solomko, E., Buchalo, A. and Kirchhoff, B. (2002). Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures. In *Mushroom Biology and Mushroom Products* (J.E. Sánchez, G. Huerta and E. Montiel eds), pp. 279-287, UAEM, Cuernavaca.
- Losel, D. (1988). Fungal lipids. In *Microbial Lipids* (C. Ratledge, and S.G. Wilkinson eds), pp. 699-805, Academic Press, London.
- Lull, C., Wichers, H. and Savelkoul, H. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation* 2, 63–80.
- Matilla, P., Vaananen, P., Konko, K., Aro, H., and Jalava, T. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland, 50, 6419-6422, 2002.
- Mizuno, T. (1995). Bioactive biomolecules of mushrooms: food functions and medicinal effects of mushroom fungi. *Food Reviews International* 11, 7-21.
- Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 9-30.
- Moreton, R., Ed., (1988). Physiology of lipid accumulation. In *Single Cell Oil*. Longmans Scientific and Technical. Harlow, UK, 1988, 11–27.
- Nair, N., Holley, M., Song, C. and Cho, K. (1990). Lipid metabolism of *Pleurotus sajor-caju*. *Annual Appliance of Microbiology* 116, 455-462.
- Nair, N., Song, C., Jiang, J., Vine, J., Tattum, B. and Cho, K. (1989). Lipid profile of *Pleurotus sajor-caju*. *Annals of Applied Biology* 114, 167-176.
- Ngai, P.H., Zhao, Z, Ng, T.R. Agrocycin: an antifungal peptide from edible mushroom *A. cylindracea*. *Peptides*. 2005, 26:191–196.
- Ouzouni, P.K., Petridis, D., Koller, W.D, Riganakos, K.A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115, 1575-1580.
- 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.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I., (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 80, 215– 224.
- Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M. and Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1138-1150.
- Pedneault, K., Angers, P., Avis, T.J., Gosselin, A. and Tweddell, R.J. (2007). Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures. *Mycological Research* 111, 1228-1234.
- Penn State, New Method Shows Mushrooms a Top Source for One Antioxidant, September 12, 2005
- Pernes, J.F., Nurit, Y., Detteaulme, M., Lipids: thin-layer chromatography separation in twelve fractions by three successive unidirectional developments on the same plate, *Journal of Chromatography*, 181, 254, 1980.

- Ratledge, C. (1988). Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. In: Single cell oils. Ed., Moreton, R.S., Harlow: Longmans, 33–70.
- Ratledge, C., (2005). Single cell oils for the 21st century. In: Single cell oils.
- Ratledge, C., Wynn, J., (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 2002, 51, 1-51.
- Ren, 2014. Anticancer ability of mushroom polysaccharides. Ph.D. thesis. School of Chemical Sciences. The University of Auckland, Auckland, New Zealand.
- Rouser, G., Kritchevsky, G., (1967). *Lipid Chromatographic analysis*, Vol. I: 99-112.
- Ryu, E.K., MacCoss M., Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives on thin-layer chromatogram, *Journal of lipid research* 1979 20: 561-563.
- Skipski, V.P., Smolowe, A.F. and Barclay, M. (1967). Separation of neutral glycosphingolipids and sulfatides by thin-layer chromatography. *J. Lipid. Res.* 1967 July;8(4), 295.
- Song, C.H. and Cho, K.Y. (1991). Effect of low temperature shock treatment on sporophore initiation, lipid profile and nutrient transport in *Lentinula edodes*. *Mycologia* 83 (1), 24-29.
- Stamets, P. (2000). *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley.
- Stryer, L., Tymoczko, J. and Berg, J. (2012). *Biochemistry* 7th edition.
- Tang, Y.-J. and Zhong, J.-J. (2004). Modeling the kinetics of cell growth and ganoderic acid production in liquid static cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* 21 (3), 259-264.
- Tang, Y.-J. and Zhong, J.-J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 20-28.
- Touchstone, J.C., Ed., (1992). *Practice of Thin Layer Chromatography*, 3rd ed., Wiley-Interscience, New York.
- Vioque, E., Holman, R.T. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 522.
- Wang, Y., Krull, I.S., Liu, C., Orr, J.D., *Chromatogr. J.* (2003). *B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003, 3, 793.
- Wassef, M.K. and Hendrix, J.W. (1977). Ceramide aminoethylphosphonate in the fungus *Pythium prolatum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 486 (1), 172-178.
- 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.
- Weete J. D., Weber, D. J., (1980). *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms*, Plenum Press.
- White. T., Bursten. S., Frederighi, D., Lewis, R.A., Nudelman, E., *Anal.* (1998). *Biochem.*,10, 109.
- Xiao, J., Jiang, N., Liang, Z. and Liu, A., (2002). Research advancements in edible and medicinal fungal polysaccharides. *Chem Life*, 22:148-51.
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Turkecul, I. and Elmastas, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99, 168-174.
- Yokokawa, H. (1980). Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of 10 species of Polyporaceae. *Phytochemistry* 19 (12), 2615-2618.
- 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.

Παράρτημα με φωτογραφίες



Φωτογραφία 1 C/N = 20 13 ημέρα



Φωτογραφία 2 C/N= 40 13 ημέρα



Φωτογραφία 3 C/N=20 21 ημέρα



Φωτογραφία 4 C/N= 40 21 ημέρα



Φωτογραφία 5 C/N=20 34 ημέρα



Φωτογραφία 6 C/N= 40 34 ημέρα