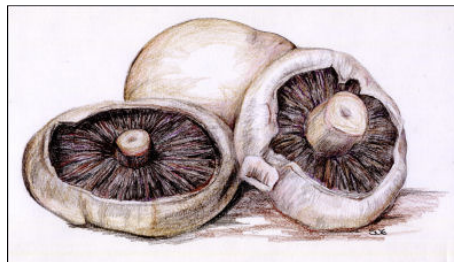




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ



Διπλωματική Εργασία
ΤΣΑΛΤΑΚΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
ΤΖΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Κωνσταντίνας Τζιά.

Αρχικά, ευχαριστώ ιδιαίτερα την κα Κ. Τζιά για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική υποστήριξη και την πολύτιμη καθοδήγηση στα στάδια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, οφείλω τις ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες και επιστημονικούς συνεργάτες του εργαστηρίου και ειδικότερα στην Δρ. Β. Γιάννου και τους υποψήφιους διδάκτορες Σ. Χανιώτη και Π. Σιαμανδούρα για τη στενή συνεργασία και την προθυμία τους να επιλύσουν κάθε απορία μου. Ευχαριστώ πολύ και τους συνοδοιπόρους υποψήφιους διπλωματικούς που βοήθησαν ο καθένας με τον τρόπο του στην ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος.

Ευχαριστώ και την εταιρία «Δίρφυς» για τη δωρεάν προμήθεια των μανιταριών *Lentinula edodes*.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την οικογένεια και τους φίλους μου για τη σταθερή συμπαράστασή τους, υπομονή, ενθάρρυνση και βοήθεια που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια και φυσικά στο διάστημα εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αθήνα, Ιούνιος 2016

Τσαλτάκη Χρυσούλα

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	6
Abstract	8
Εισαγωγή	10
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Κεφάλαιο 1: Μανιτάρια	11
1.1 Μύκητες	11
1.1.1 Μυκήλια	12
1.1.2 Φυσιολογία – Μορφολογία	14
1.2 Κύκλος Ζωής Μανιταριών	15
1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά	17
1.3.1 <i>Ganoderma Lucidum</i> : Γανόδερμα	18
1.3.2 <i>Lentinula Edodes</i> : Λεντινούλα	19
1.3.3 <i>Grifola Frondosa</i> : Maitake	20
1.3.4 Τρούφες	21
1.3.4.1 <i>Tuber Melanosporum</i>	22
1.3.4.2 <i>Tuber Aestivum</i>	23
Κεφάλαιο 2: Θρεπτικά – Βιοδραστικά Συστατικά	25
2.1 Θρεπτική Αξία	25
2.2 Σύσταση	26
2.2.1 <i>Ganoderma Lucidum</i>	29
2.2.2 <i>Lentinula Edodes</i>	30
2.2.3 <i>Grifola Frondosa</i>	32
2.2.4 <i>Tuber Melanosporum</i>	34
2.2.5 <i>Tuber Aestivum</i>	35
2.3 Αξιόλογα Συστατικά – Ρόλος	37
Κεφάλαιο 3: Απομόνωση Αξιόλογων Συστατικών	44
3.1 Πρωτεΐνες	44
3.1.1 Τεχνολογία Παραλαβής Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων	45
3.1.1.1 Παραλαβή Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων	46
3.1.1.2 Τεχνολογία Απομόνωσης Πρωτεϊνών – Παραλαβή Πρωτεϊνικών Υπερσυμπυκνωμάτων	47
3.1.2 Κλασματοποίηση Πρωτεϊνών	52

3.1.3 Ειδική Τεχνολογία Απομόνωσης Πρωτεϊνών Από Μανιτάρια	52
3.2 Πολυσακχαρίτες	53
3.2.1 Τεχνολογία Παραλαβής Υδατανθρακικών Προϊόντων	54
3.2.2 Ειδική Τεχνολογία Απομόνωσης Πολυσακχαριτών Από Μανιτάρια	58
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Κεφάλαιο 4: Πειραματικό Μέρος	60
4.1 Σκοπός	60
4.2 Υλικά – Εξοπλισμός	60
4.2.1 Πρώτες Ύλες	60
4.2.2 Όργανα – Συσκευές	61
4.3 Πειραματική Διαδικασία	62
4.3.1 Προκατεργασία Δειγμάτων Μανιταριών	62
4.3.2 Απελαίωση	64
4.3.3 Παραλαβή Πρωτεϊνικών Προϊόντων (Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων)	65
4.3.4 Παραλαβή Υδατανθρακικών Προϊόντων (Υδατανθρακικών Συμπυκνωμάτων β-γλυκανών)	69
4.4 Αναλύσεις – Προσδιορισμοί	72
4.4.1 Προσδιορισμός Περιεχόμενου σε Πρωτεΐνες – Kjeldahl	72
4.4.2 Προσδιορισμός Περιεχόμενου σε Ολικές και β-γλυκάνες	75
4.4.3 Μέτρηση Υγρασίας Πρώτων Υλών	77
4.5 Σχεδιασμός Πειραμάτων – Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	78
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα – Συζήτηση	80
5.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	80
5.1.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης	80
5.1.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού Σημείου (pI)	81
5.1.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	82
5.1.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών	83
5.2 <i>Lentinula Edodes</i>	86
5.2.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης	86
5.2.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού Σημείου (pI)	86
5.2.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	89
5.2.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών	90
5.3 <i>Grifola Frondosa</i>	93
5.3.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης	93

5.3.2 Προσδιορισμός Ισηλεκτρικού Σημείου (pI)	93
5.3.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	95
5.3.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών	97
5.4 <i>Tuber Melanosporum</i>	99
5.4.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης	99
5.4.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	100
5.4.3 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών	101
5.5 <i>Tuber Aestivum</i>	102
5.5.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης	102
5.5.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών	103
5.5.3 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών	104
5.6 Συνολικά Αποτελέσματα Σύστασης Μανιταριών	106
5.6 Συνολικά Αποτελέσματα Απομόνωσης Αξιόλογων Συστατικών	107
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα – Προτάσεις	110
6.1 Συγκριτικά Αποτελέσματα – Στατιστική Επεξεργασία	110
6.1.1 Συγκριτικά Αποτελέσματα Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων	110
6.1.2 Συγκριτικά Αποτελέσματα Υδατανθρακικών Συμπυκνωμάτων	110
6.2 Συνολικά Συμπεράσματα – Προτάσεις	111
Κεφάλαιο 7: Παράρτημα	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση πέντε ειδών εδώδιμων μανιταριών, που θεωρούνται εναλλακτικά σε σχέση με τα ευρέως καταναλισκόμενα, ως προς τα βασικότερα θρεπτικά και βιοδραστικά τους συστατικά, ειδικότερα τις πρωτεΐνες, τις γλυκάνες και το έλαιο. Συγκεκριμένα, τα μανιτάρια που αξιολογήθηκαν είναι τα ακόλουθα: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* όπως και δύο είδη τρούφας, τα *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*. Τα εναλλακτικά αυτά μανιτάρια επιλέχθηκαν για δύο λόγους που αφορούν τη θρεπτικότητα αλλά και διαθεσιμότητά τους στην αγορά. Λόγω λοιπόν της υψηλής θρεπτικότητας και δράσης των βιοδραστικών συστατικών αυτών των μανιταριών ενάντια σε πολλές χρόνιες ασθένειες, επιχειρήθηκε η απομόνωσή τους με κλασικές αλλά και σύγχρονες μεθόδους.

Τα μανιτάρια *L. edodes*, *T. melanosporum* και *T. aestivum* προμηθεύτηκαν σε νωπή μορφή, επομένως η προκατεργασία τους περιέλαβε άλεση, ξήρανση με κατάψυξη ώστε να μην υποβαθμιστούν τα βιοδραστικά τους συστατικά, καθώς και άλεση και κοσκίνιση ώστε να προκύψουν σωματίδια ομοιόμορφου μεγέθους. Στις τρούφες *T. melanosporum* και *T. aestivum* ακολούθησε απελαίωση μετά την κοσκίνιση, ώστε οι επακόλουθες διεργασίες εκχύλισης πρωτεϊνών και γλυκανών να μην παρεμποδιστούν από το έλαιο που βρίσκεται σε υψηλή περιεκτικότητα γενικώς στις τρούφες. Αντίθετα, τα μανιτάρια *G. lucidum* και *G. frondosa* προμηθεύτηκαν σε αφυδατωμένη μορφή, επομένως η προκατεργασία τους περιέλαβε μόνο το στάδιο της κοσκίνισης. Προσδιορίστηκε η υγρασία των αφυδατωμένων μανιταριών, ώστε όλα τα προσδιοριζόμενα μεγέθη να αναχθούν επί ξηρού βάρους.

Η απελαίωση πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση με χρήση πετρελαϊκού αιθέρα ως διαλύτη και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα των αξιολογούμενων μανιταριών σε έλαιο. Η παραλαβή των πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της κλασικής τεχνικής της υδατικής εκχύλισης και καταβύθισης στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών. Οι παράγοντες που αξιολογήθηκαν ήταν το pH εκχύλισης (ουδέτερο ή βασικό) και ο καθαρισμός του παραλαμβανόμενου πρωτεϊνικού συμπυκνώματος με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης ή ακετόνης. Για την παραλαβή συμπυκνωμάτων υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκαν δύο σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης, με υπέρηχους και μικροκύματα και αξιολογήθηκαν ως προς τον χρόνο εκχύλισης. Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Kjeldahl, ενώ ο προσδιορισμός του περιεχομένου σε ολικές και β-γλυκάνες πραγματοποιήθηκε με χρήση έτοιμου ενζυμικού kit.

Αξιολογώντας την αρχική σύσταση των μελετώμενων μανιταριών, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες έχει η τρούφα *T. melanosporum* (23.9%) με τα *L. edodes* και *T. aestivum* (22.5% και 18.2% αντίστοιχα) να ακολουθούν, ενώ την υψηλότερη περιεκτικότητα σε έλαιο τα *G. lucidum* (3.3%), *G. frondosa* (3.3%) και *L. edodes* (3.2%). Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες έχει το *G. frondosa* (44.2%) με τα *L. edodes* και *G. lucidum* (38.3% και 26.9-27.7% αντίστοιχα) να ακολουθούν. Οι αντίστοιχες τιμές περιεκτικότητας σε β-γλυκάνες είναι 42.2%, 37.5% και 23.3-26.3% για τα *G. frondosa*, *L. edodes* και *G. lucidum* αντίστοιχα.

Όσον αφορά την παραλαβή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, οι εκχυλίσες πραγματοποιήθηκαν με πολύ υψηλές αποδόσεις. Η μέγιστη απόδοση εκχύλισης που επιτεύχθηκε άγγιξε το 83.9% από το *G. frondosa*, που υποδεικνύει ότι τα μανιτάρια είναι ικανές πρώτες ύλες για την εκχύλιση πρωτεϊνών. Τα συμπυκνώματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη παρελήφθησαν από τα είδη *G. lucidum*, *T. aestivum* και *L. edodes* (51.7%, 51.6% και 51.3% αντίστοιχα). Σε όλα τα είδη μανιταριών, η εκχύλιση σε ουδέτερο pH παρότι δεν επέφερε μείωση της απόδοσης εκχύλισης, προκάλεσε αξιοσημείωτη μείωση της ποσότητας του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος, με αποτέλεσμα να ελαττωθούν οι τιμές των υπόλοιπων συντελεστών απόδοσης (απόδοση απομόνωσης και ολική απόδοση).

Πολύ υψηλές τιμές απόδοσης εκχύλισης επιτεύχθηκαν και κατά την παραλαβή υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων, τόσο ολικών γλυκανών όσο και β-γλυκανών και η μέγιστη τιμή που επιτεύχθηκε ήταν η απόδοση εκχύλισης 69.1%, από το *L. edodes* που είχε γενικότερα τις υψηλότερες τιμές απόδοσης εκχύλισης, με τα *G. frondosa* και *T. aestivum* (59.3% και 46.7% αντίστοιχα) να ακολουθούν. Παρόλα αυτά, δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση γλυκανών, καθώς τα περισσότερα συμπυκνώματα δεν ξεπέρασαν σε περιεκτικότητα γλυκανών τις πρώτες ύλες που σημαίνει ότι απαιτείται περισσότερη διερεύνηση των σταδίου απομόνωσης και καθαρισμού των υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων.

Ανάλογα με το είδος του μανιταριού φαίνεται πως μεταβάλλεται σημαντικά η απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών, η ολική απόδοση και η απόδοση βάρους του παραλαμβανόμενου πρωτεϊνικού συμπυκνώματος, όχι όμως η απόδοση απομόνωσης πρωτεϊνών ή η περιεκτικότητα (καθαρότητα) του συμπυκνώματος σε πρωτεΐνη. Σχετικά με την απομόνωση των υδατανθρακικών συστατικών και την παραλαβή των συμπυκνωμάτων τους, ανάλογα με το είδος μανιταριού φαίνεται πως μεταβάλλεται η απόδοση εκχύλισης γλυκανών, η απόδοση απομόνωσης, η ολική απόδοση, η απόδοση βάρους αλλά και η περιεκτικότητα των ολικών και β-γλυκανών. Η περιεκτικότητα β-γλυκανών στα συμπυκνώματα εξαρτάται επίσης από τη μέθοδο εκχύλισης, με την εκχύλιση με μικροκύματα να δίνει καλύτερα αποτελέσματα (22.2% με μικροκύματα και 19.0% με υπέρηχους).

Τα καλύτερα αποτελέσματα παραλαβής υδατανθρακικών προϊόντων εμφάνισε το *G. frondosa*, καθώς παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές αποδόσεων αλλά και %περιεκτικότητας σε γλυκάνες στα συμπυκνώματά του, επομένως αξίζει περισσότερης διερεύνησης. Το ίδιο μανιτάρι εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα και κατά την παραλαβή πρωτεϊνικών προϊόντων, επομένως αξίζει να εξεταστούν και άλλες μέθοδοι παραλαβής των πρωτεϊνών από τα εκχυλίσματά τους, όπως υπερδιήθηση ή απευθείας παραλαβή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με ξήρανση με ψεκασμό.

Λέξεις-κλειδιά: μανιτάρι, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες, γλυκάνες, συμπυκνώματα, εκχύλιση, απομόνωση

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate five types of alternative edible mushrooms as to the most important nutrients and bioactive components, especially proteins, glucans and oil. Specifically, the mushrooms which were evaluated are the following: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* and two species of truffle, *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum*. These alternative mushrooms were chosen for two reasons of nutritiousness and their availability on the market. Based on their high nutritiousness and action of bioactive ingredients of these fungi against many chronic diseases, we attempted their isolation via classical and modern methods.

The *L. edodes*, *T. melanosporum* and *T. aestivum* mushrooms were supplied in fresh form, so the pretreatment included milling, freeze-drying so as not to deteriorate their bioactive components and also grinding and sieving to obtain uniformly sized particles. On truffles *T. melanosporum* and *T. aestivum* the pretreatment included defatting followed after sieving. The aim of the defatting was to facilitate the subsequent processes of protein and glucan extraction by the oil which is in high content generally in truffles. In contrast, mushrooms *G. lucidum* and *G. frondosa* were supplied in a dehydrated form, so their pretreatment only included the step of sieving.

The defatting was performed by extraction using petroleum ether as solvent and the oil content of the evaluated mushrooms was determined. The isolation of protein concentrates was performed through the conventional technique of aqueous extraction and precipitation at the isoelectric point of proteins. The evaluated agents were the extraction pH (neutral or basic) and purification-washing method of the isolated protein concentrate with a propanol-2 or acetone aqueous solution. To obtain carbohydrate concentrates, two modern extraction techniques were used, ultrasonic assisted extraction and microwave assisted extraction and they were evaluated regarding the extraction time. The determination of the protein content was performed via Kjeldahl analysis, while the determination of the total and beta-glucan content was carried out using an enzymatic kit.

Evaluating the initial composition of the mushrooms, the truffle *T. melanosporum* had the highest protein content (23.9%) and was followed by *L. edodes* and *T. aestivum* (22.5% and 18.2% each), while *G. lucidum* (3.3%), *G. frondosa* (3.3%) and *L. edodes* (3.2%) had the highest oil content. *G. frondosa* (44.2%) had the highest total and beta-glucan content and was followed by *G. lucidum* and *L. edodes* (38.3% and 26.9-27.7 each).

Regarding the process for protein isolation and protein concentrates production, extractions were performed with very high yields. The maximum extraction yield achieved reached 83.9% by *G. frondosa*, indicating that mushrooms are able raw materials for protein extraction. The concentrates with the highest protein content were isolated from the species *G. lucidum*, *T. aestivum* and *L. edodes* (51.7%, 51.6% and 51.3% each). In all mushroom species, the extraction at neutral pH, although did not entail reduction of the extraction efficiency, caused a remarkable decrease in the received amount of the concentrate, resulting in reduced values of the other performance factors (isolation yield and total yield).

During the process for carbohydrate isolation, very high extraction efficiency values were achieved (total glucan and beta-glucan concentrates) and the maximum extraction yield reached 69.1%, by *L. edodes* which generally had the highest extraction efficiency values, with *G. frondosa* and *T. aestivum* (59.3% and 46.7% each) to follow. However, it was not possible to isolate glucans, as the glucan content of the most concentrates did not exceed the glucan content of the raw materials. This means that more investigation of the isolation and purification stages of carbohydrate concentrates is needed.

Depending on the species of mushroom, the protein extraction yield, the total yield and the received weight yield of the protein concentrate appears to be significantly affected, but not the protein isolation yield or the protein content (purity) of the concentrate. Regarding the carbohydrate isolation and the production of the carbohydrate concentrates, the glucan extraction yield, isolation yield, total yield, weight yield and total glucan and beta-glucan content seem to vary, depending on the mushroom species. The beta-glucan content of the concentrates also depends on the extraction method with the microwave assisted extraction giving better results (22.2% microwave and 19.0% ultrasonic assisted extraction).

G. frondosa showed the best results regarding carbohydrate products, as it showed the highest yield values and % glucan content in its carbohydrate concentrates, therefore it deserves more investigation. The same mushroom also showed the best protein product results, therefore it is worth investigating other methods of protein isolation from the protein extracts, such as ultrafiltration or directly isolating the protein extract by spray drying.

Keywords: mushroom, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, proteins, carbohydrates, polysaccharides, glucans, isolates, extraction, isolation

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία τάση από τη μεριά των καταναλωτών προς τη σύνδεση μεταξύ διατροφής και υγείας, προτιμώντας τρόφιμα που προσφέρουν καλή ισορροπία στον οργανισμό. Οι ιατρικές και οικονομικές ανάγκες για την υγεία αυξάνονται και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην προληπτική προσέγγιση, παρά τη θεραπευτική. Η έρευνα στρέφεται λοιπόν στη σχέση μεταξύ των φυσικών συστατικών των τροφίμων και της θρεπτικής τους αξίας. Ως αποτέλεσμα, η έρευνα οδήγησε στην ανάπτυξη προϊόντων τροφίμων που εξυπηρετούν τις ανάγκες αυτές των καταναλωτών για υγεία και θρεπτικότητα.

Με ανάλογο τρόπο προέκυψαν τα λειτουργικά τρόφιμα, δηλαδή τρόφιμα ή ποτά που παρέχουν οφέλη στην υγεία, πέραν της θρεπτικής τους αξίας, τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση ώστε να αυξηθεί η περιεκτικότητα ωφέλιμων συστατικών. Πολλά φυσικά προϊόντα μπορούν να θεωρηθούν λειτουργικά τρόφιμα, χάρη σε φυτικές ίνες, βιταμίνες και ανόργανα συστατικά που ενδεχομένως περιέχουν και η βιομηχανία προχωρά ένα βήμα παραπέρα εμπλουτίζοντας και ενισχύοντας τα επεξεργασμένα τρόφιμα με συστατικά τροφίμων που θεωρείται ότι προσφέρουν επιπλέον οφέλη στην υγεία.

Τα μανιτάρια συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία. Είναι υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά. Λόγω της παρουσίας των περισσότερων βασικών αμινοξέων, οι πρωτεΐνες τους είναι υψηλής ποιότητας, πολύ ανώτερες από τις φυτικές πρωτεΐνες, πλησιάζοντας την ποιότητα των ζωικών πρωτεϊνών. Επίσης, είναι πλούσιες πηγές διαιτητικών ινών, βιταμινών και ανόργανων συστατικών.

Πέραν όμως της υψηλής θρεπτικής τους αξίας, έχουν πολλές ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου, καθώς εμφανίζουν προληπτική δράση ενάντια σε χρόνιες ασθένειες, όπως καρκίνο, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν αντιβακτηριακή δράση και μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Είναι χαρακτηριστικό το παράδειγμα πολυσακχαριτών και συγκεκριμένα β-γλυκανών, που βρίσκονται γενικώς σε υψηλό ποσοστό στα μανιτάρια και έχει αποδειχτεί η δράση τους κατά του καρκίνου. Αυτές είναι όμως μερικές μόνο από τις ευεργετικές ιδιότητες των μανιταριών, καθώς η έρευνα αποδεικνύει συνεχώς νέες ευεργετικές και προληπτικές τους δράσεις.

Επιπλέον, πέρα από τα ευρέως καταναλισκόμενα μανιτάρια, όπως *Agaricus*, *Pleurotus* κ.α., ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν αποκτήσει πρόσφατα και τα εναλλακτικά μανιτάρια τόσο διεθνώς όσο και στη χώρα μας, όπως τα: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται βιβλιογραφικά στοιχεία για τα εν λόγω είδη μανιταριών, όσον αφορά τη βοτανολογία, τη σύστασή τους σε θρεπτικά και βιοδραστικά συστατικά και τις αντίστοιχες ευεργετικές δράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου. Επίσης εξετάζεται η τεχνολογία απομόνωσης των αξιόλογων βιοδραστικών συστατικών τους, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι β-γλυκάνες, είτε με τη συμβατική τεχνολογία ή με μεθόδους που έχουν εφαρμοστεί ειδικά στα μανιτάρια, με σκοπό την παραλαβή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων πλούσιων σε β-γλυκάνες.

1. ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Ορισμός

Το μανιτάρι είναι ένας μακρομύκητας που έχει χαρακτηριστικό καρπόσωμα, επίγειο ή υπόγειο και αρκετά μεγάλο μέγεθος ώστε να είναι ορατό με γυμνό μάτι και η συλλογή του να μπορεί να γίνει χειρωνακτικά. ^[1]

Τα μανιτάρια δεν είναι απαραίτητα Βασιδιομύκητες ή σαρκώδη ή εδώδιμα. Μπορούν να είναι Ασκομύκητες, να φυτρώνουν υπογείως, να έχουν μη σαρκώδη υφή και δεν είναι υποχρεωτικά εδώδιμα. Επομένως, ο ορισμός αυτός από τους Chang και Miles (1992), δεν είναι πλήρης αλλά είναι ενδεχομένως αποδεκτός ως εφαρμόσιμος όρος για την εκτίμηση/αξιολόγηση του πλήθους των μανιταριών της Γης.

Τα μανιτάρια μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: (1) σαρκώδη και εδώδιμα μανιτάρια (*Agaricus bisporus*), (2) μανιτάρια που θεωρείται ότι διαθέτουν ιατρικές ιδιότητες για εφαρμογές (*Ganoderma lucidum*), (3) εκείνα που έχει αποδειχτεί ότι είναι δηλητηριώδη (*Amanita phalloides*) και (4) μία μικτή κατηγορία που περιλαμβάνει έναν πολύ μεγάλο αριθμό μανιταριών των οποίων οι ιδιότητες παραμένουν λιγότερο συγκεκριμένες. ^[2]

1.1 ΜΥΚΗΤΕΣ

Υπάρχουν περισσότερα είδη μυκήτων, βακτηρίων και πρωτόζωων σε μία μόνο κουταλιά χύμα, από ότι είδη φυτών και σπονδυλωτών ζώων σε όλη τη Βόρειο Αμερική. Μεταξύ αυτών, δηλαδή των μικροοργανισμών (οργανισμοί με μέγεθος μικρότερο από 0.1 mm), οι μύκητες είναι οι μεγάλοι ανακυκλωτές του πλανήτη μας, αποσυνθέτοντας μεγάλα οργανικά μόρια σε απλούστερες μορφές, οι οποίες με τη σειρά τους θρέφουν άλλα μέλη του οικοσυστήματος. Οι μύκητες θα έλεγε κανείς ότι είναι οι οργανισμοί που βρίσκονται στη διεπιφάνεια ανάμεσα στη ζωή και το θάνατο. ^[3]

Τα μανιτάρια, η κοινή ονομασία μίας μεγάλης ομάδας εδώδιμων μυκήτων, είναι ένα πολύ κοινό και δημοφιλές προϊόν τροφίμου. Το αναπαραγωγικό τους τμήμα ή καρπόσωμα συνήθως βρίσκεται πάνω από το έδαφος. Πρόκειται για το τμήμα που χρησιμοποιείται κοινώς για κατανάλωση. Αυτό που όμως αποκαλείται μανιτάρι, δεν είναι παρά ένα τμήμα της δομής του μύκητα. Λόγω του μοναδικού αρώματος και της ιδιόμορφης γεύσης, πολλά άγρια μανιτάρια καταναλώνονται παραδοσιακά. Ωστόσο, λίγα μόνο είδη μανιταριών καλλιεργούνται εκτενώς σε εμπορική βάση. ^{[2],[4]}

Οι μύκητες τείνουν να κυριαρχούν σε εδάφη υψηλής οργανικής ύλης και λιγότερο σε ανόργανα, εντατικώς διαχειριζόμενα εδάφη.

Εμπλέκονται σε μία πληθώρα λειτουργικών ρόλων, που περιλαμβάνουν διάφορες βιολογικές, χημικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις και έχουν υψηλή οικολογική και οικονομική σημασία.

Με βάση την ζωολογική διαίρεση, οι μύκητες διακρίνονται σε Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες, Χυτριομύκητες, Δευτερομύκητες και Ζυγομύκητες. Ενώ τα βρώσιμα μανιτάρια, όπως οι τρούφες και οι μορχέλες ανήκουν στους Ασκομύκητες, οι περισσότεροι εμπορικά καλλιεργούμενοι εδώδιμοι μύκητες, συμπεριλαμβανομένων των *agaricus*, *lentinula* και *pleurotus*, ανήκουν στους Βασιδιομύκητες. ^{[4],[5]}

Τα βασικά χαρακτηριστικά των μυκήτων είναι τα εξής: είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, ετερότροφοι, κυρίως αερόβιοι, αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους σαπροτροφικά, βιοτροφικά ή συμβιωτικά και αναπαράγονται με σπόρια. Παρουσιάζουν ομοιότητες με τους φυτικούς οργανισμούς, καθώς διαθέτουν κυτταρικά τοιχώματα και χυμοτόπια, αλλά αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν ή να συνθέσουν οργανικές ουσίες. Με τους ζωικούς οργανισμούς μοιάζουν γιατί είναι ετερότροφοι και δεν διαθέτουν πλαστίδια στην μικροσκοπική τους δομή. ^[6]

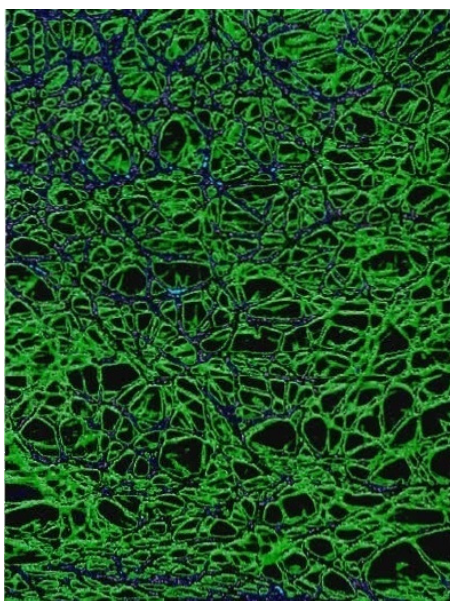
Ένα βασικό χαρακτηριστικό των νηματοειδών μυκήτων είναι η μορφή ανάπτυξής τους, που αποτελείται από νηματοειδείς υφές οι οποίες αναπτύσσονται μέσω ακραίας επέκτασης και περιοδικής διακλάδωσης, ώστε να δημιουργούν ένα μυκήλιο που διαχέεται στο περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας (χώρα, κόμποστ, ξύλινος κορμός ή άλλο λιγνοκυτταρινικό υλικό). Η διάμετρος μίας υφής ποικίλει ανάλογα με την ηλικία, το είδος και τις θρεπτικές συνθήκες, αλλά τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 3-10 μm. Σε ακραίες περιπτώσεις, έχουν μετρηθεί μέχρι και 2 km υφής /g χώματος, σε ορισμένα εδάφη. ^{[2],[5]}

1.1.1 Μυκήλια

Το σώμα των μυκήτων (θαλλός) αποτελείται από το μυκήλιο και τα αναπαραγωγικά όργανα. Φυσικά όμως υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάλογα με τον αριθμό κυττάρων του μυκητιακού οργανισμού (μονοκύτταροι ή ζύμες και μυκηλιακοί μύκητες που χωρίζονται σε κοινοκύτταρους και πολυκύτταρους). Το σώμα των πολυκύτταρων μυκήτων αποτελείται από λεπτότατα διακλαδιζόμενα νημάτια μικροσκοπικής διαμέτρου (υφές). Το σύνολο των υφών αποτελεί το μυκήλιο που μπορεί να αποκτήσει μακροσκοπικές διαστάσεις σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης.

Κάθε υφή μοιάζει με σωλήνα περιβαλλόμενο από την πρωτοπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, μέσα στον οποίο βρίσκεται το πρωτόπλασμα, τα κυτταρικά οργανίδια και ο πυρήνας. Η αύξηση της πρωτοπλασματικής μάζας, με επιμήκυνση και διακλάδωση των υφών, συνοδεύεται από μιτωτικό πολλαπλασιασμό των πυρήνων με αποτέλεσμα κάθε μυκηλιακό άτομο να είναι ένας πολυπύρηνος οργανισμός.

Τα μυκήλια είναι το νευρολογικό δίκτυο της φύσης ^[3]. Τα μυκήλια είναι ασαφείς δομές, αναπτυσσόμενες σε τρεις διαστάσεις και ως εκ τούτου είναι πολύ δύσκολο να οριστεί το μέγεθός τους.



Εικόνα 1.1: Το μυκηλιακό δίκτυο, που συντίθεται από μία μεμβράνη με συνεχώς διακλαδιζόμενες κυτταρικές αλυσίδες. ^[3]

Οι υφές μπορεί να συσσωματώνονται προς δημιουργία δομών υψηλότερης τάξης, όπως σκέλη (strands) ή ριζόμορφα, που δίνουν τη δυνατότητα τροφοληψίας σε μεγάλες αποστάσεις (δεκαμέτρου στην περίπτωση ξυλοσηπτικών βασιδιομυκήτων). Ορισμένοι μύκητες δεν σχηματίζουν υφές αλλά έχουν μία ολοκαρπική μορφή ανάπτυξης, περιλαμβάνοντας μεμονωμένα κύτταρα τα οποία αναπαράγονται με σχάση. Κάποιοι μύκητες είναι διμορφικοί και μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ ολοκαρπικής και ευκαρπικής ανάπτυξης, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. ^[5]

Το μυκηλιακό δίκτυο συντίθεται από μία μεμβράνη αποτελούμενη από διακλαδιζόμενες κυτταρικές αλυσίδες σε διαπλοκή, πάχους μόνο ενός κυτταρικού τοιχώματος. Αυτές οι μεμβράνες βρίσκονται σε επιφυλακή, αντιδρούν σε αλλαγές και συλλογικά αποκτούν την μακροπρόθεσμη υγεία του περιβάλλοντος-ξενιστή. Το μυκήλιο παραμένει σε συνεχή μοριακή επικοινωνία με το περιβάλλον του, επινοώντας ποικίλες ενζυμικές και χημικές αντιδράσεις σε οποιοσδήποτε σύνθετες προκλήσεις. Αυτά τα δίκτυα, όχι μόνο επιβιώνουν, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις εξαπλώνονται σε έκταση χιλιάδων στρεμμάτων, πετυχαίνοντας την μεγαλύτερη μάζα από κάθε άλλο οργανισμό του πλανήτη.

Μερικές νέες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι μύκητες ενδεχομένως να είναι ευφυείς και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν επωφελώς από τον άνθρωπο, συλλέγοντας πληροφορίες από το περιβάλλον ή ακόμη και επικοινωνώντας με τσιπ πυριτίου σε έναν υπολογιστή. Αυτές οι ευαίσθητες μυκηλιακές μεμβράνες δρουν συλλογικά. Το μυκήλιο είναι μία εκτεθειμένη ευαίσθητη μεμβράνη σε αναμονή και ανταποκρινόμενη στο περιβάλλον της. Καθώς ορειβάτες, ζώα ή έντομα διασχίζουν αυτά τα νηματοειδή δίκτυα, αφήνουν αποτυπώματα και τα μυκήλια δαισθάνονται και ανταποκρίνονται σε αυτές τις κινήσεις. Το μυκήλιο, όπως μία σύνθετη και πολυμήχανη δομή για την ανταλλαγή πληροφοριών, μπορεί να προσαρμόζεται και να εξελίσσεται μέσα από τις συνεχώς μεταβαλλόμενες δυνάμεις της φύσης. ^[3]

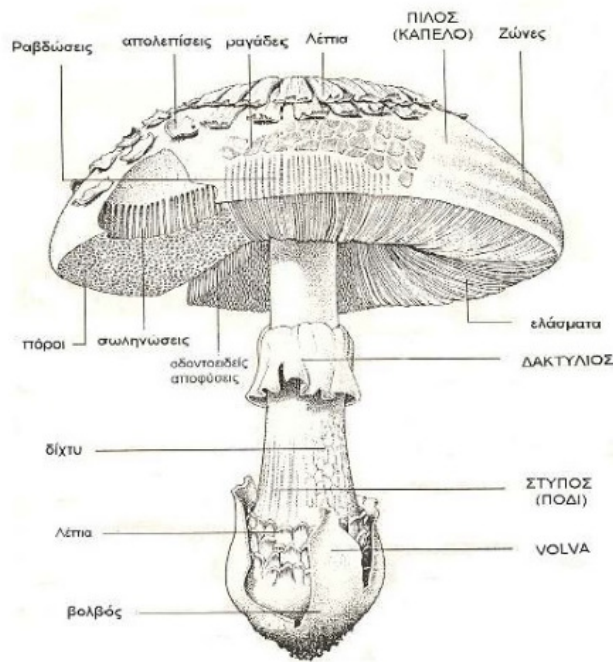
1.1.2 Φυσιολογία - Μορφολογία

Όλοι οι μύκητες είναι υποχρεωτικά ετερότροφοι. Χρησιμοποιούν σταθερές πηγές οργανικού άνθρακα ως υπόστρωμα. Υπάρχει μία ευρεία ποικιλία ενώσεων, από μεθυλοτροφικές ζύμες έως λιγνίνη και βιομηχανικά συνθετικές πολυφαινόλες, που μπορούν να διασπαστούν από μύκητες. Κάποιοι μύκητες αποκτούν την τροφή τους από άλλους ζώντες οργανισμούς μέσω παρασιτικών ή ανταλλασσόμενων ενώσεων, ενώ άλλοι είναι σαπροτροφικοί.

Από ορισμένους μύκητες του εδάφους παράγεται μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών, μεταξύ των οποίων πολλές πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που μπορούν να δρουν ως σήματα ή υποστρώματα καθώς διαχέονται διαμέσου πορωδών δικτύων. Αν προστεθούν σπόρια μυκήτων ή μέρη μυκηλίων σε μη αποστειρωμένο χώμα, σπάνια φυτρώνουν. Αυτό το φαινόμενο, γνωστό ως μυκητιόσταση, οφείλεται πιθανώς σε έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών, στην παρουσία ανασταλτικών (αντιβιοτικών) ενώσεων που παράγονται από την υπάρχουσα μικροχλωρίδα ή σε συνδυασμό και των δύο αυτών.

Η αναπαραγωγή μπορεί να είναι εγγενής (ένωση απλοειδών πυρήνων-γαμετών και σχηματισμός ζυγωτών πυρήνων) ή αγενής (κατάτμηση μετά τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό πυρήνων, σχάση και αποβλάστηση μυκηλίου), ενώ απαντάται ποικιλία τέτοιων συστημάτων ένωσης. Πολλοί μύκητες έχουν γενετικά συστήματα που εμποδίζουν την ένωση μεταξύ γενετικά πανομοιότυπων κυττάρων ή μυκηλίων. Αναπαράγονται μέσω μικροσκοπικών σπορίων, ορατών ως σκόνη, όταν συλλέγονται μαζικά. Οι μύκητες δημιουργούν σπόρια μέσα σε εξειδικευμένα όργανα, τις καρποφορίες.^{[3],[5]}

Το βασιδιοκάρπιο αποτελείται στη βασική του μορφή από τον πύλο, τον στύπο και τον υμενοφόρο (εικόνα 1.2). Ο πύλος μπορεί να έχει σφαιρικό, ημισφαιρικό, κυρτό, επίπεδο ή κοίλο σχήμα. Στην κάτω επιφάνειά του βρίσκεται ο υμενοφόρος. Στο τμήμα αυτό βρίσκονται τα αναπαραγωγικά όργανα των βασιδιομυκήτων. Στους βασιδιομύκητες, ο υμενοφόρος έχει κατεύθυνση προς τη γη (θετικός γεωτροπισμός) ώστε να διευκολύνεται η πτώση των σπορίων στο χώμα. Ο στύπος είναι το τμήμα της καρποφορίας στο οποίο στηρίζεται ο πύλος. Συνήθως είναι ευθυτενής και κατακόρυφος, αλλά μπορεί να παίρνει διαφορετικές κατευθύνσεις ανάλογα με τον γεωτροπισμό.^[6]

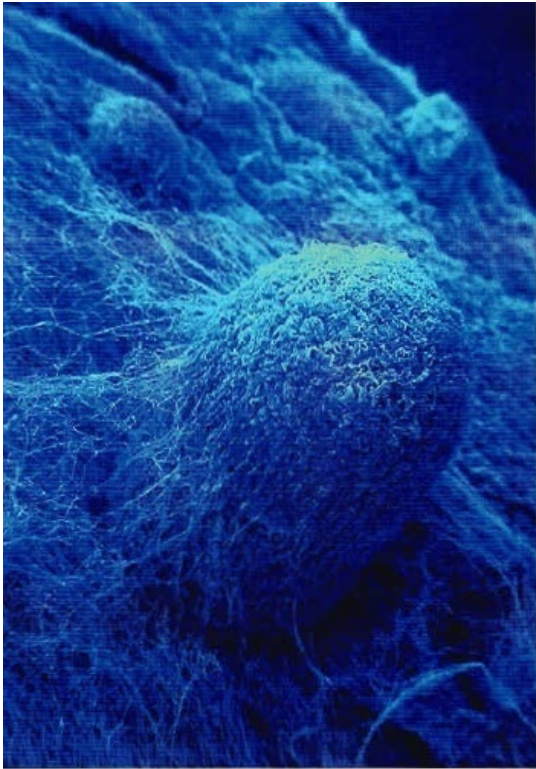


Εικόνα 1.2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά βασιδιοκαρτίου με μορφή ομπρέλας [6]

1.2 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

Παρότι τα μανιτάρια παρατηρούνται όταν εμφανίζονται στην επιφάνεια του εδάφους, η απότομη εμφάνισή τους είναι η ολοκλήρωση κυτταρικών γεγονότων κρυμμένων σε μεγάλο βαθμό από κοινή θέα. Παραμένει ακόμη άγνωστο το πώς τα διάφορα είδη μανιταριών αλληλεπιδρούν με τους περισσότερους άλλους οργανισμούς με τους οποίους συμβιώνουν στο ίδιο περιβάλλον.

Μόλις η υγρασία, η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά είναι κατάλληλα, τα σπόρια που ελευθερώνονται από ένα μανιτάρι, βλασταίνουν σε νήματα κυττάρων, γνωστά ως υφές. Καθώς κάθε υφή αναπτύσσεται, δημιουργεί συνδέσμους με άλλες υφές από συμβατά σπόρια, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μυκηλιακό στρώμα, το οποίο ωριμάζει, συγκεντρώνοντας θρεπτικά και υγρασία. Από το μυκήλιο, τα κύτταρα συναθροίζονται προς δημιουργία ενός αρχέγονου. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες, ο μετασχηματισμός από σπόρια σε μυκήλιο σε μανιτάρι μπορεί να διαρκέσει μόνο μερικές ημέρες.



Εικόνα 1.4: (δεξιά) Αρχέγονο. ^[3]

Εικόνα 1.3: (αριστερά) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης αρχέγονου σχηματιζόμενου από ένα μυκηλιακό στρώμα. ^[3]

Τα μανιτάρια μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τον σχηματισμό τους: προκαθοριστικά (predeterminant) και μετακαθοριστικά (indeterminant). Τα περισσότερα μανιτάρια είναι προκαθοριστικά, που σημαίνει ότι ο στύπος, το καπέλο και τα βράγχιά τους προσχηματίζονται στην αρχέγονη κατάσταση. Αν το νεαρό αρχέγονο τραυματιστεί, εμφανίζονται παραμορφώσεις στην ενηλικίωση.

Λιγότερο κοινά είναι τα μετακαθοριστικά μανιτάρια, συμπεριλαμβανομένου και του *Ganoderma*. Τα μυκήλιά τους σχηματίζουν αρχέγονα που περιεχίζουν κλαδιά και βλαστούς. Αν αυτά τα νεαρά μανιτάρια τραυματιστούν κατά το στάδιο αυτό και προχωρήσουν σε ανάρρωση, ωριμάζουν χωρίς σημαντικές ενδείξεις πληγών.

Τα μανιτάρια εμφανίζουν πολλές μορφές, προσαρμοζόμενες ανάλογα με τη διασπορά των σπορίων: κλασικά button μανιτάρια, με σχήμα ομπρέλας (ο συνηθέστερος τύπος με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τη *Lentinula Edodes*) με στύπο και πύλο, με σχήμα στεφάνης όπως *Volvariella volvacea*, οδοντωτά *Hericium*, κοραλλοειδή *Ramaria*, φυλλοειδή *Sparassis* και μορφής κυπέλου *Auricularia*. Αυτά τα τόσο διαφορετικά ως προς τη μορφή τους μανιτάρια παράγουν σπόρια από όμοιες δομές, που ονομάζονται βασίδια και τα οποία εγείρονται από ένα εξειδικευμένο στρώμα κυττάρων, που ονομάζεται υμένιο. ^{[2],[3]}

Πολλά μανιτάρια εξαγουν σπόρια από τα βασίδια που αναδύονται σε αυξανόμενες ποσότητες καθώς αυτά ωριμάζουν. Παρότι τα σπόρια τείνουν να πέφτουν κοντά στο γονεϊκό τους μανιτάρι, ίχνη σπορίων μπορούν μερικές φορές να διασκορπιστούν και στον αέρα. Έτσι, η συγκέντρωσή τους μειώνεται όσο αυξάνεται η απόσταση από το αρχικό μανιτάρι. Ωστόσο, στη διανομή συμμετέχουν και πολλά έντομα και θηλαστικά. Λόγω της μυρωδιάς των μανιταριών, τα έντομα τα χρησιμοποιούν ως φωλιά για τις προνύμφες τους, οι οποίες στη συνέχεια

μεγαλώνουν και κουβαλούν σπόρια μαζί τους καθώς αφήνουν τις φωλιές. Τα θηλαστικά τρέφονται με μανιτάρια και πολλά σπόρια αφού επιβιώσουν την πέψη διασπείρονται μέσω των αποβλήτων των ζώων.

Η παραγωγή σπορίων είναι τεράστια φτάνοντας τα 30 δις σπόρια την ημέρα από ένα μεγάλο *Ganoderma* και είναι απαραίτητη για τους μύκητες ώστε να βρουν νέο φυσικό περιβάλλον. Τα είδη διαφέρουν ως προς το χρόνο και τη διάρκεια απελευθέρωσης σπορίων, ανάλογα με τη θερμοκρασία, την υγρασία, το φυσικό περιβάλλον, τα ζώα και τη σύστασή τους.

Από τη στιγμή που παράγονται τα σπόρια, τα περισσότερα βλασταίνουν γρήγορα. Κάποια βλασταίνουν αμέσως μόλις αφήσουν τα βασίδια, ενώ άλλα, όπως τα shiitake, αφότου ξηραθούν και επανενυδατωθούν. Στα πρώτα λεπτά της βλάστησης, η υφή διαχωρίζεται με μίτωση. Στη συνέχεια, ακολουθεί το ζευγάρωμα της υφής από δύο συμβατά σπόρια, καθένα από τα οποία έχει το μισό από τον απαραίτητο κώδικα για την παραγωγή γόνιμου απογόνου. Μετά το ζευγάρωμα, όταν οι υφές συγχωνεύονται για να δημιουργήσουν ένα μυκήλιο, το προκύπτον κυτταρικό δίκτυο ενδυναμώνει, είναι διπύρρηνο και ικανό να παράγει γόνιμα μανιτάρια-απογόνους με ικανότητα παραγωγής σπορίων.^[3]

1.3 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Προκειμένου να ταξινομηθεί ένας μύκητας στην κατάλληλη κατηγορία πρέπει να του δοθεί ένα όνομα, που είναι το σύμβολο των διαθέσιμων πληροφοριών για μία ταξονομική ομάδα. Το όνομα που δίνεται σε ένα μύκητα είναι διωνυμικό, αποτελείται δηλαδή από δύο ονόματα και ακολουθεί τους διεθνείς κανόνες ονοματολογίας.

Η πρώτη ομάδα μετά το Βασίλειο είναι το Φύλο (Phylum). Το Φύλο διαιρείται σε κλάσεις, σε ομοταξίες, τάξεις, οικογένειες, υποοικογένειες, φυλές, γένη και είδη.

- Η Κλάση καταλήγει σε mycete.
- Η Τάξη καταλήγει σε ales (*Moniliales*)
- Η Οικογένεια καταλήγει σε aceae (*Moniliaceae*)
- Η Φυλή καταλήγει σε eae (π.χ. *Aspergilleae*).
- Το Γένος καταλήγει σε a, us, um (*Aspergillus flavus*).

Στο διωνυμικό όνομα των μυκήτων η πρώτη λέξη αντιστοιχεί στο γένος ενώ η δεύτερη στο είδος.

Τα εδώδιμα μανιτάρια τείνουν συνήθως να έχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας. Τα μανιτάρια περιέχουν μεγάλα ποσά υδατανθράκων, κυρίως πολυσακχαρίτες (όπως γλυκάνες και γλυκογόνο), μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες (όπως τρεχαλόζη), αλκοόλες σακχάρων (όπως μαννιτόλη) και χιτίνη. Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες είναι δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων – χιτίνη και γλυκάνες-, είναι δύσπεπτα από τον άνθρωπο και μπορούν να θεωρηθούν διαιτητικές ίνες.

Παρότι τα μανιτάρια περιέχουν μικρά μόνο επίπεδα ακατέργαστου λίπους (0.31 ως 0.35% σε νωπό βάρος), περιέχουν αξιοσημείωτη ποσότητα πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων.

Όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά, τα νωπά μανιτάρια μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα τη μικροβιακά επαγόμενη υποβάθμιση της ποιότητας και αλλοίωση των νωπών μανιταριών. ^[4]

1.3.1 *Ganoderma Lucidum* : Γανόδερμα

Το γανόδερμα (*Ganoderma Lucidum*) είναι ένας λευκός πολύπορος ξυλοσηπτικός βασιδιομύκητας (basidiomycete macrofungus) με σκληρούς καρπούς, που ανήκει στην οικογένεια μυκήτων *Polyporaceae*. Το καρπόσωμά του αποκαλείται Reishi στα Ιαπωνικά. Ο καρπός του *G. Lucidum* φαίνεται στην εικόνα 1.5. Το βασιδιοκάρπιό του έχει λαμπερή επιφάνεια που συνδέεται με την παρουσία πιλοκουστιδίων με σκληρό τοίχωμα ενσωματωμένων σε μία εξωκυτταρική μήτρα μελανίνης. ^{[2],[7]}



Εικόνα 1.5: Καρπός *G. lucidum*, αρχικά απομονωμένος από σλοβενικό δάσος. ^[8]

Παρότι η ιατρική αξία του *G. lucidum* έχει διαφυλαχθεί στην Κίνα για πάνω από 2000 χρόνια, το μανιτάρι βρισκόταν σπάνια στη φύση. Αυτή η έλλειψη διαθεσιμότητας ήταν υπεύθυνη για την πολύ υψηλή τιμή του. Η τεχνητή του καλλιέργεια επιτεύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του

1970 και από το 1980 η παραγωγή του (κυρίως στην Κίνα) έχει εξελιχθεί ραγδαία. Πλέον, οι ευρέως υιοθετημένες μέθοδοι εμπορικής παραγωγής του είναι σε: ξύλινο κορμό, μικρό τμήμα ξύλου, τμήμα δέντρου, τσάντα από πριονίδια και διεργασίες σε φιάλες. ^[2]

Έχουν απομονωθεί διάφορες ομάδες χημικών ενώσεων από τα μυκήλια και τους καρπούς του *G. Lucidum*: τριτερπενοειδή, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, νουκλεοσίδια, αλκαλοειδή, στεροειδή, λακτόνες, λιπαρά οξέα και ένζυμα. Τα πιο σημαντικά φαρμακευτικώς δραστικά συστατικά του είναι τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες. ^[8]

Το γένος *Ganoderma*, έχει μελετηθεί από πολλές οπτικές γωνίες, ανάλογα με το ενδιαφέρον της ομάδας ερευνητών:

- a) Ως πηγή φαρμάκων και θεραπευτικών
- b) Ως παθογόνο φυτών σε καλλιέργειες όπως φοινικέλαιου, καρύδας, καουτσούκ, τσαγιού, καφέ, κακάου και σε δέντρα δάσους.
- c) Ως αιτία άσθματος εξαιτίας της αερομεταφερόμενης διασποράς σπορίων.
- d) Ως πηγή λιγνολυτικών ενζύμων με πιθανές εφαρμογές σε πολτοποίηση, βαφές κλωστοϋφαντουργίας, αποτοξίνωση μολυσμένου νερού και άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. ^[9]

1.3.2 *Lentinula Edodes*: Λεντινούλα

Η *Lentinula Edodes* (shiitake στα Ιαπωνικά) ανήκει στο είδος των ξυλοσηπτικών μυκήτων (Βασιδιομύκητας). Στη φύση φυτρώνει σε νεκρούς κορμούς δέντρων ή κούτσουρα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε μία ποικιλία μέσω καλλιέργειας, και φυσικά και συνθετικά, ανάλογα με το σκοπό της καλλιέργειας. Τα συνθετικά μέσα είναι συχνά ακριβά και χρονοβόρα στην προετοιμασία, επομένως δεν χρησιμοποιούνται κοινώς για σκοπούς ρουτίνας. ^[2]



Εικόνα 1.6: Καρπόσωμα *Lentinula Edodes*. ^[10]

Ήταν το δεύτερο σημαντικότερο καλλιεργήσιμο εδώδιμο μανιτάρι μέχρι το 2002, αλλά έκτοτε έχει αποκτήσει την πρώτη θέση. Περίπου 160,000 τόνοι αυτού παράγονται ετησίως στην

Ιαπωνία και κατά το ήμισυ ξηραίνονται και εξαγονται. Εκπροσωπεί μια βιομηχανία 2 δις δολαρίων που απασχολεί περίπου 200,000 άτομα. Μπορεί να καλλιεργηθεί είτε σε κορμό ξύλου (σε ποικιλία ειδών δέντρου) είτε σε συνθετικούς κορμούς-υποστρώματα. ^{[2],[11]}

Καλλιεργείται για αιώνες στην Κίνα και την Ιαπωνία, ενώ ξεκίνησε να καλλιεργείται εμπορικά το 1940 και πλέον καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα σε πολλά μέρη του κόσμου, όπως ΗΠΑ, Ευρώπη, Ηνωμένο Βασίλειο και Μεξικό. Ήταν ο πρώτος ιατρικός μακρομύκητας που εισήχθη στον κόσμο της σύγχρονης Βιοτεχνολογίας. Τα τελευταία 30 χρόνια, η μορφολογία, ο κύκλος ζωής και η γενετική του βρίσκονται στο μικροσκόπιο και οδήγησαν στις σύγχρονες μεθόδους επιλογής και καλλιέργειας του μανιταριού αυτού. ^{[11],[12],[13]}

Στις ΗΠΑ, χρησιμοποιείται σε ανατολίτικα εστιατόρια και πωλείται σε ανατολίτικα gourmet και σε καταστήματα υγιεινών τροφίμων. Η ζήτησή του αυξάνεται καθώς οι καταναλωτές συνηθίζουν είδη περισσότερο λαστιχωτά, αρωματικά και γευστικά από ότι τα κλασικά button μανιτάρια. Ουσιαστικά αποτελεί μία εναλλακτική επιχείρηση που εκπροσωπεί έναν τρόπο αξιοποίησης μίας φυτικής πηγής. Η καλλιέργεια των shiitake περιλαμβάνει τη χρήση χαμηλής ποιότητας ξύλου: δέντρα μικρής διαμέτρου (3-6 in.) που κανονικά είτε απορρίπτονται στα δάση μετά από συμβατική υλοτόμηση, όπου κόβονται και πωλούνται ως ξυλοπολτός χαμηλής αξίας ή απορρίπτονται ως μη αξιοποιήσιμα. Χρήση αυτής της πηγής θα μπορούσε να δώσει και ευκαιρίες μικρής ανάπτυξης στον τομέα της ξυλείας. ^[11]

Αποτελεί εναλλακτική πηγή διαιτητικών ινών, τόσο διαλυτών όσο και μη διαλυτών με κύριο εκπρόσωπο τη χιτίνη και τη β-γλυκάνη. ^[12]

1.3.3 *Grifola Frondosa*: Maitake

Το εδώδιμο μανιτάρι *Grifola Frondosa*, είναι ένας ανώτερος βασιδιομύκητας που ανήκει στην οικογένεια Polyporaceae και είναι επίσης γνωστό με την ονομασία Maitake. Είναι ένα αναγνωρισμένο γαστρονομικά και ιατρικά πολύπορο (υπερβολικά πορώδες) μανιτάρι. Το καρπόσωμά του συχνά αναπτύσσεται σε νεκρή ή σχεδόν νεκρή φυλλοβόλα σκληρή ξύλινη ύλη (εικόνα 1.7) και σποραδικά σε άλλους τύπους δέντρων. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξής του ορίζονται από περιορισμένο εύρος υγρασίας, θερμοκρασίας και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Αναπτύσσεται κυρίως στα βόρεια εύκρατα δάση της Ασίας, Ευρώπης και ανατολικής Βόρειας Αμερικής. Από το 1981 καλλιεργείται εμπορικά στην Ιαπωνία και αλλού. ^{[14],[15]}

Το μανιτάρι *Grifola Frondosa* καλείται επίσης με τις ονομασίες «βασιλιάς των μανιταριών» και «όρνιθα των δασών». Δεν είναι εύκολο να προμηθευτεί σε νωπή μορφή, αλλά κυρίως σε αφυδατωμένη ως προϊόν εξαγωγής από την Κίνα και την Ιαπωνία. Εναλλακτικά προϊόντα του είναι μυκήλια χρησιμοποιούμενα ως τρόφιμα ή καρυκεύματα τροφίμων αλλά και για τη δημιουργία θεραπευτικών και λειτουργικών τροφίμων. ^[17]



Εικόνα 1.7: *Grifola Frondosa* ή Βασιλιάς των μανιταριών ^[16]

Έχουν μελετηθεί τόσο η θρεπτική του αξία όσο και τα γευστικά συστατικά του. Πρόσφατα βρέθηκε ότι έχει διάφορες θεραπευτικές επιδράσεις. Ενώ η έρευνα στρέφεται στις θεραπευτικές του ιδιότητες, πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Έχουν εξερευνηθεί πολλές βιοενεργές ενώσεις του μανιταριού αυτού, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και μη πτητικά γευστικά συστατικά. Πολυσακχαρίτες που έχουν ανακτηθεί από το μυκήλιο και το καρπόσωμά του έχουν δείξει ενδιαφέρουσες βιολογικές ενεργότητες. ^{[14],[18]}

1.3.4 ΤΡΟΥΦΕΣ

Κάποια είδη του γένους *Tuber* (τρούφες) είναι οικονομικά σημαντικοί μύκητες. Διαθέτουν έναν αριθμό από ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Είναι τα ακριβότερα μανιτάρια. Στην ανοιχτή αγορά κοστίζουν 600€-6000€ /kg, ανάλογα με το είδος. Επιπλέον, από βιολογική σκοπιά, πρόκειται για σημαντικούς οργανισμούς που αξίζει να μελετηθούν λόγω του ιδιόμορφου φυσικού περιβάλλοντός τους (υπόγειοι και μικροαεροφιλικό). ^{[19],[20]}

Οπτικά, οι τρούφες έχουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά, που τις κάνουν να ξεχωρίζουν από τα κοινά προς κατανάλωση μανιτάρια. Γενικά οι τρούφες δεν έχουν στέλεχος, ούτε βράγχια και το μυκήλιό τους αναπτύσσεται υπόγεια. Σε αντίθεση με τα κοινά μανιτάρια που έχουν μαλακά και εύθραυστα χαρακτηριστικά, οι ώριμες τρούφες τείνουν να είναι σφιχτές, πυκνές και ξυλώδεις.

Οι ειδικοί στην κουζίνα έχουν ιδιαίτερα στην υπόληψή τους τις τρούφες για το ιδιαίτερο άρωμα και τη γεύση τους. Οι τρούφες έχουν διαφορετικές αρωματικές νότες (αποκλίσεις) που οδηγούν σε διαφορετικά επίπεδα απόλαυσης. Οι μαύρες τρούφες, όπως η *Tuber melanosporum* και η

Tuber aestivum, έχουν ένα άρωμα «υγρού δάσους» με μία ελαφριά γεύση από ραπανάκι και μία απόκλιση φουντουκιού, ενώ οι λευκές τρούφες έχουν ένα άρωμα τυριού με σκόρδο με λεπτές αποχρώσεις μεθανίου. Ακόμα, έχει αποδειχτεί πως κατέχουν πολλαπλές βιοενεργότητες όπως αντιοξειδωτικές, αντικές, αντιμικροβιακές, ηπατοπροστατευτικές και άλλες.

Παρόλο που οι μοναδικές αρωματικές τους νότες και η υψηλή τους αξία στην αγορά έδωσαν ώθηση στις εντατικές έρευνες πάνω στην μυκολογία, την καλλιέργεια και τα αρωματικά τους γνωρίσματα, η αναγνώριση των θεραπευτικών γνωρισμάτων τους από ερευνητές έγινε μόλις πρόσφατα. Συνεπώς, το ενδιαφέρον της έρευνας για τις τρούφες έγινε πιο ποικίλο από ότι προ δεκαετίας. Με τη σειρά τους, αυτά τα ποικίλα ευρήματα εξερευνούν προτείνοντας πιθανές εφαρμογές τους στα τρόφιμα. Οι τρούφες έγιναν όχι μόνο ενισχυτές του αρώματος των τροφίμων αλλά μπορούν να αποτελέσουν και λειτουργικά συστατικά των τροφίμων.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι δεν είναι όλες οι τρούφες εδώδιμες, αλλά μόνο εκείνες του γένους *Tuber* λειτουργούν ως τρόφιμα. Από τις εδώδιμες τρούφες, οι μαύρες και οι λευκές είναι οι πιο αναγνωρισμένες σε Γαλλικές, Ισπανικές, βόρειο-Ιταλικές και Ελληνικές κουζίνες. Οι *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum* είναι μεταξύ των πιο μελετημένων εδώδιμων τρουφών.^[19]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αναζήτηση και αναγνώριση των διαφόρων ειδών τρούφας. Το υψηλό κόστος της τρούφας πηγάζει από τη δύσκολη και εντατική εργασία αναζήτησής τους που θυμίζει περισσότερο κυνήγι θησαυρού. Τα γουρούνια μπορούν να ανιχνεύσουν υπόγειες τρούφες λόγω των αρωματικών φερομονών που προέρχονται τόσο από μαύρες όσο και λευκές τρούφες. Το ένστικτο του θηλυκού γουρουνιού να ερευνά το έδαφος για τρούφες οφείλεται σε μία ένωση που περιέχεται στις τρούφες, παρόμοια με την ανδροστενόλη, τη σεξουαλική φερομόνη. Στην Ιταλία και τη Γαλλία, μικρές ομάδες κυνηγών «καθαρίζουν» τα δάση με σκύλους και γουρούνια ψάχνοντας για τρούφες σε μυστικά σημεία. Με βάση την ικανότητά τους να ανιχνεύουν και να αναγνωρίζουν τις οσμηρές πτητικές οργανικές ενώσεις, εκπαιδευμένοι σκύλοι και γουρούνια προσδιορίζουν τις υπόγειες τοποθεσίες τρούφας. Ενώ τα γουρούνια έχουν οξύτερη «μύτη» για τις τρούφες, έχουν την τάση να τις τρώνε, επομένως οι σκύλοι προτιμώνται καθώς έχουν πολύ μικρή όρεξη για ταμανιτάρια. Το διμεθυλοσουλφίδιο δείχνει να είναι η οσμηρή ένωση-κλειδί για την τοποθεσία της τρούφας. Οι κυνηγοί τρούφας αποτελούν μία κρυφή ράτσα που σπάνια αποχωρίζονται τα κόλπα τους, δεν ενθαρρύνουν άλλους να εισχωρήσουν στην «αδελφότητά» τους και μάχονται έναντι κάθε προσπάθειας θέσπισης του επαγγέλματός τους, ενώ περνούν αυτήν την τέχνη από γενιά σε γενιά.^[21]

1.3.4.1 *Tuber Melanosporum*

Η τρούφα *Tuber melanosporum* είναι ένας μυκορριζικός μύκητας (Ασκομύκητας). Το ενδιαφέρον για αυτόν το μύκητα προκύπτει όχι μόνο από τη συμβιωτική ζωή του, αλλά και από την εμπορική του αξία, αφού το καρπόσωμά του, γνωστό ως μαύρη τρούφα (φαίνεται στην εικόνα 1.8), είναι ένα υπόγειομανιτάρι με συγκεκριμένη γεύση, ώστε να θεωρείται γαστρονομική λιχουδιά. Όπως άλλοι μυκορριζικοί μύκητες, ο *Tuber melanosporum* έχει περίπλοκο κύκλο ζωής που χαρακτηρίζεται από τρία στάδια: (i) βλαστική ανάπτυξη, κατά τη διάρκεια της οποίας ο μύκητας υφίσταται νηματοειδή ανάπτυξη και σχηματίζει μυκήλιο, (ii) μυκορριζική ανάπτυξη, η οποία απαιτεί την εγκαθίδρυση αμοιβαίας σχέσης μεταξύ του μύκητα

και του φυτού-ξενιστή και (iii) δημιουργία καρποσωμάτων, που περιέχουν σεξουαλικά σπόρια.
[22]



Εικόνα 1.8: Καρπόσωμα *Tuber melanosporum*

Η μαύρη τρούφα *Tuber melanosporum* έχει επίσης τα ακόλουθα ονόματα: Périgord black και truffe noire, ενώ θεωρείται το «μαύρο διαμάντι της κουζίνας», καθώς είναι η πιο αρωματική τρούφα. Ως προς τη μορφολογία της, η διάμετρος της φτάνει μέχρι τα 7 cm και ζυγίζει μέχρι 100 g. Το χρώμα του πηριδίου της μπορεί να είναι από κοκκινωπό καφέ μέχρι καφέ και μαύρο. Το πηρίδιο είναι σταθερά προσδεμένο στον θρόμβο. Ο θρόμβος στο ασκοκάρπιό της είναι λευκός αρχικά, αλλά γίνεται μωβ-μαύρος όσο ωριμάζει και τελικά τελείως μαύρος. Έχει λευκές φλέβες που γίνονται ροζ κατά την έκθεση στον αέρα. Τα σπόριά της είναι σκούρα καφέ και ελλειπτικά.
[19],[23]

Αποτελεί εγχώριο προϊόν στις μεσογειακές περιοχές της Γαλλίας, Ιταλία, σε μέρη της Κροατίας και Σερβίας και στο μεγαλύτερο κομμάτι της βόρειας Ισπανίας. Η εποχή συγκομιδής του είναι ανάμεσα στα τέλη Νοεμβρίου και τις αρχές Μαΐου. Αναπτύσσεται σε φωτεινά δάση. Το χώμα πρέπει να έχει επίπεδη κλίση, να είναι ασβεστολιθικό και θερμό, καλά αεριζόμενο, με υψηλό περιεχόμενο σε ασβέστιο. Στην επιφάνειά του πρέπει να έχει μεγάλες πέτρες. Το pH του πρέπει να είναι μεγαλύτερο του 7.5, με βέλτιστο το 7.9. Φυτά-ξενιστές του μπορεί να είναι βελανιδιές ή δέντρα lime.^[19]

1.3.4.2 *Tuber Aestivum*

Η μαύρη εδώδιμη τρούφα *Tuber Aestivum*, βρίσκεται επίσης ανάμεσα στις πιο μελετημένες τρούφες και ανήκει στους Ασκομύκητες. Άλλα της ονόματα είναι τα: καλοκαιρινή τρούφα, scorzone ή «λιγότερο ακριβή εκδοχή της Périgord». Η διάμετρος του καρποσώματός της

κυμαίνεται από 2 cm έως πάνω από 10 cm και είναι υπόγειο. Το πηρίδιό της είναι από καστανό έως μαύρο, διακοσμημένο με λεπτά εγκάρσια σημάδια και είναι προσκολλημένο στον θρόμβο από κάτω. Ο θρόμβος είναι σκούρος καφέ όταν ωριμάσει και διασταυρώνεται από λεπτές λευκές φλέβες, οι οποίες δεν αλλάζουν χρώμα όταν εκτίθενται στον αέρα. Τα σπόριά της είναι κίτρινα-καφέ δικτυωμένα με ραβδώσεις. Το καρπόσωμά της φαίνεται και στην εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9: Καρπόσωμα *Tuber Aestivum* (καλοκαιρινή μαύρη τρούφα)

Συναντάται κυρίως στη βόρεια Ιταλία και σε κάποια μέρη της Γαλλίας. Μπορεί ωστόσο να βρεθεί σε όλη την Ευρώπη, εκτός της βόρειας Σκανδιναβίας και των χωρών της Βαλτικής. Η περίοδος συγκομιδής ξεκινά τον Σεπτέμβριο ή προς τα τέλη Δεκεμβρίου και τελειώνει στο τέλος του Ιανουαρίου. Οι συνθήκες του χώματος πρέπει να παρόμοιες με αυτές του Régigord, αλλά με περισσότερη λάσπη, να περιέχουν περισσότερη οργανική ύλη και να είναι πολύ πετρώδη και σχετικά αβαθή. Ανάμεσα στα φυτά-ξενιστές είναι: οξιά, σημόδα, καρπίνους, φουντουκιά και αγγλική βελανιδιά. ^{[19],[24]}

Η καλοκαιρινή τρούφα *Tuber Aestivum* είναι λιγότερο αρωματική από τις μαύρες και λευκές τρούφες, αλλά έχει μέτρια τιμή και καλή ποιότητα αρώματος. Γενικώς, η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων και του διατροφικού προφίλ της. ^{[23],[24]}

2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Τα μανιτάρια είναι γνωστά για τη χαρακτηριστική υφή τους και το ευχάριστο άρωμά τους. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα μανιτάρια θεωρούνται εδέσματα. Έχει πλέον αποδειχτεί και καταγραφεί παγκοσμίως ότι τα μανιτάρια διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα, τόσο για τη διατροφή όσο και για την προαγωγή της υγείας.

Οι ιατρικές και αγχολυτικές ιδιότητες των μανιταριών, των οποίων η επιστημονική βάση μόλις έχει αρχίσει να γίνεται κατανοητή, έχουν εκτιμηθεί πολύ εδώ και πολλά χρόνια στην Κίνα. Θρύλοι λένε ότι Κινέζοι αυτοκράτορες κατανάλωναν *Lentinula Edodes* σε τεράστιες ποσότητες για να καταπολεμήσουν τα γηρατεία. Άλλες μαρτυρίες λένε ότι αρχαία ιαπωνικά δικαστήρια εκτιμούσαν μανιτάρια για τις αφροδισιακές τους ιδιότητες. Το γένος *Ganoderma* καλλιεργείται για αυστηρά ιατρικούς σκοπούς. Επίσης, τώρα εισάγεται στη συνείδησή μας ότι τα μανιτάρια παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ανακύκλωση οργανικών αποβλήτων και ως εκ τούτου συμβάλλουν κατά κάποιο τρόπο στη μείωση της μόλυνση του περιβάλλοντος.

2.1 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Η μεγαλύτερη δυσκολία στη διατροφή των ανθρώπων είναι η παροχή επαρκούς ποσότητας πρωτεΐνης μυϊκής ανάπτυξης. Οι άλλες τρεις θρεπτικές κατηγορίες είναι πηγές ενέργειας, (υδατάνθρακες και λιπαρά), βοηθητικοί παράγοντες τροφίμων (βιταμίνες) και ανόργανες ενώσεις απαραίτητα όλα για την καλή κατάσταση υγείας. Φυσικά, το νερό θεωρείται επίσης απαραίτητο.

Παρότι η αρέσκεια ενός τροφίμου δεν σχετίζεται απαραίτητα με τη θρεπτική του αξία, αλλά περισσότερο με την εμφάνιση, τη γεύση και το άρωμα που διεγείρουν την όρεξη, τα μανιτάρια όμως πέραν της θρεπτικής τους αξίας, διαθέτουν επιπλέον μοναδικό χρώμα, γεύση, άρωμα και χαρακτηριστικά υφής που προσελκύουν τους καταναλωτές.^[2]

Πλέον, έχει αποδειχτεί και καταγραφεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία ότι τα μανιτάρια όντως παρέχουν διατροφικά και υγιεινά οφέλη στον άνθρωπο. Νωπά, περιέχουν 90% υγρασία κατά μέσο όρο, σε ξηρή βάση όμως το μεγαλύτερό τους κλάσμα αποτελούν οι υδατάνθρακες όπως και οι πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα. Με βάση την ανάλυση αμινοξέων, υπάρχουν όπως είναι γνωστό διάφοροι δείκτες που προβλέπουν τη θρεπτική αξία ενός μανιταριού. Έχουν επίσης χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος, με σημαντική υπεροχή ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η τέφρα τους συντίθεται από μέταλλα όπως ασβέστιο, φωσφόρο και άλλα.^[25]

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, έχει εκτιμηθεί ότι ταμανιτάρια έχουν διπλάσια περιεκτικότητα από ότι τα κρεμμύδια και το λάχανο και 4-12 φορές μεγαλύτερη από ότι τα πορτοκάλια και τα μήλα. Σε ξηρή βάση ταμανιτάρια περιέχουν 19-35% πρωτεΐνη, ενώ το ρύζι 7.3%, το σιτάρι 12.7%, ο κύαμος σόγιας 38.1% και το καλαμπόκι 9.4%. Συγκριτικά, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των πιο κοινών τύπων κρέατος είναι ως εξής: χοιρινό 9-16%, βοδινό 12-20%, κοτόπουλο και ψάρι 18-20%, ενώ το γάλα έχει αντίστοιχα 2.9-3.3%. Επομένως, υπό όρους ποσότητας ακατέργαστης πρωτεΐνης, ταμανιτάρια κατατάσσονται χαμηλότερα από το ζωικό κρέας, αλλά αρκετά υψηλότερα από τα περισσότερα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος, το οποίο είναι προϊόν ζωικής προέλευσης. Επιπλέον, η πρωτεΐνημανιταριού περιέχει ως επί το πλείστον και τα 9 απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα.

Πέραν των πρωτεϊνών, ταμανιτάρια αποτελούν καλή πηγή των ακόλουθων μεμονωμένων θρεπτικών: λιπαρών, φωσφόρου, σιδήρου και βιταμινών, συμπεριλαμβανομένων των: θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, ασκορβικού οξέος, εργοστερόλης και νιασίνης. Είναι χαμηλά σε θερμίδες, υδατάνθρακες και ασβέστιο. Έχει επίσης καταγραφεί ότι το ολικό περιεχόμενο λιπιδίων κυμαίνεται μεταξύ 0.6 και 3.1% σε ξηρό βάρος στα κοινώς καλλιεργούμεναμανιτάρια. Τουλάχιστον το 72% των συνολικών λιπαρών οξέων είναι ακόρεστα. Σημειώνεται ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για τη διατροφή και υγεία του ανθρώπου.

Πρόσφατα, υπάρχει τάση προς την κατεύθυνση ανεύρεσης τρόπων επεξεργασίας τωνμανιταριών, ώστε να τους δοθεί προστιθέμενη αξία. Για παράδειγμα, έχουν παρασκευαστείμανιτάρια εμπλουτισμένα σε σεληνίο. Με την προσθήκη σεληνίτη στο κόμποστ (30-300 PPM), βρέθηκε ότι ταμανιτάρια απορροφούσαν σεληνίο σε αυξανόμενη ποσότητα σύμφωνα με το περιεχόμενο στο κόμποστ, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλλιέργειαμανιταριών με την επιθυμητή συγκέντρωση. Το σεληνίο είναι ένα απαραίτητο μικροθρεπτικό συστατικό που έχει συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον στη διατροφική και την ιατρική έρευνα και πιο πρόσφατα στη βιομηχανία τροφίμων. Έχει πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά είναι περισσότερο γνωστό ως απαραίτητος συμπράγοντας για το ενζυμικό σύστημα γλουταθειόνης υπεροξειδάσης. Το σύστημα αυτό είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση ελευθέρων ριζών από το σώμα, επομένως μειώνει την οξειδωτική επίπτωση.^[2]

2.2 ΣΥΣΤΑΣΗ

Σε ένα στέλεχοςμανιταριών συμβαίνουν αξιοσημείωτες αλλαγές στη σύστασή του, ως εξαρτώμενες από την ηλικία ή το στάδιο ανάπτυξης, την πάροδο του χρόνου μετά τη συγκομιδή, το μελετώμενο τμήμα από ένα μόνο σώμα καρπού, την ακρίβεια και της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού. Προκειμένου να επιτευχθεί διεθνώς σύγκριση της αναλυτικής αξίας διαφορετικών προσδιορισμών, όλα τα αναλυτικά δεδομένα δίνονται σε ξηρό βάρος των καρπών, δεδομένου ότι ταμανιτάρια περιέχουν γενικώς 90% υγρασία περίπου σε νωπή κατάσταση. Η υγρασία κυμαίνεται στο 70-95%, ανάλογα με το χρόνο συγκομιδής και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ είναι περίπου 10-13% στα αφυδατωμέναμανιτάρια. Ταμανιτάρια σε ξηρή βάση περιέχουν ~63% υδατάνθρακες, 25% πρωτεΐνες, 4% λίπος και το υπόλοιπο 8% προσμετράται ως ανόργανα συστατικά με τη μορφή τέφρας (Πίνακας 2.1). Οι περισσότεροι υδατάνθρακες βρίσκονται σε πολυμερική μορφή, ως γλυκάνες και είδη ημικυτταρίνης. Το άμυλο ως εκ τούτου δεν υπάρχει. Η μαννιτόλη και η τρεχαλόζη

αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των ελεύθερων σακχάρων. Κατά συνέπεια, η τιμή ενέργειας είναι επίσης σχετικά μικρότερη. Ταμανιτάρια περιέχουν σημαντικές ποσότητες διαιτητικών ινών.^{[2],[25]}

Οι πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο κλάσμα μαζί με τους υδατάνθρακες. Τα νωπά, περιέχουν 1.75-5.9% πρωτεΐνες (αλλά προτείνεται το εύρος 3.5-4.0% ως μέσος όρος). Ο συντελεστής 4.38 χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του αζώτου (N) σε πρωτεΐνημανιταριού (αντί του γενικού συντελεστή 6.25), με εξαίρεση το μη πρωτεϊνικό άζωτο με τη μορφή χιτίνης που υπάρχει στα τοιχώματα των κυττάρων. Στο πρωτεϊνικό κλάσμα των *Boletus edulis* και *Cantharellus cibarius* κυριαρχούν οι αλβουμίνες και οι σφαιρίνες. Ελεύθερα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν σχεδόν το ένα πέμπτο του ολικού αζώτου. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα. Ωστόσο, λείπουν ορισμένα βασικά αμινοξέα που περιέχουν θείο και αρωματικά αμινοξέα. Με βάση την ανάλυση αμινοξέων, χρησιμοποιούνται αρκετοί δείκτες για την πρόβλεψη της διατροφικής ποιότητας τωνμανιταριών.^{[2],[25]}

Ταμανιτάρια έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Το λίπος τους περιλαμβάνει εκπροσώπους όλων των κατηγοριών ενώσεων λιπιδίων, συμπεριλαμβάνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο-, δι- και τριγλυκερίδια, στερόλες, εστέρες στερολών και φωσφολιπίδια. Υπάρχει μια υπεροχή των ακόρεστων λιπαρών οξέων, ιδίως του λινελαϊκού οξέος (~78% του συνόλου των λιπαρών οξέων). Ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών οξέων σταμανιτάρια είναι εκείνος που αντανακλά την ασφάλειά τους στην κατανάλωση χωρίς κίνδυνο αθηροσκλήρωσης.

Η τέφρα αποτελείται κυρίως από ασβέστιο, κάλιο, φωσφόρο και δισθενή σίδηρο (Πίνακας 2.2). Μερικά είδη περιέχουν επίσης γερμάνιο, το οποίο είναι γνωστό για τη διατήρηση της ζωτικότητας στους ανθρώπους. Ταμανιτάρια έχουν ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της βιοσυσσώρευσης των ανόργανων συστατικών που υπάρχουν στο μέσο ανάπτυξής τους. Αυτή η ιδιότητα είναι χρήσιμη για την παροχή επιθυμητών ανόργανων συστατικών σε καλές ποσότητες. Όταν αυτά συσσωρεύουν τοξικά στοιχεία, γίνονται επικίνδυνα για κατανάλωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Σύστασημανιταριών (σε ξηρή βάση)^[25]

Είδοςμανιταριού	Ακατέργαστη πρωτεΐνη (Nx4,38)	Λίπος	Υδατάνθρακες	Ίνες	Τέφρα	Ενεργειακή αξία (kcal)
<i>Agaricus bisporus</i>	26.3	1.8	59.9	10.4	12.0	328
<i>Auricularia auricula-judae</i>	8.1	1.5	81.0	6.9	9.4	356
<i>Boletus edulis</i>	29.7	3.1	59.7	8.0	7.5	362
<i>Cantharellus cibarius</i>	21.5	5.0	64.9	11.2	8.6	353
<i>Coprinus comatus</i>	25.4	3.3	58.8	7.3	12.5	366
<i>Flammulina velutipes</i>	17.6	1.9	73.1	3.7	7.4	378
<i>Lentinula edodes</i>	17.5	8.0	67.5	8.0	7.0	387
<i>Lycoperdon lilacinum</i>	46.0	7.5	38.8	12.3	7.7	358
<i>Pholiota nameko</i>	20.8	4.2	66.7	6.3	8.3	372
<i>Pleurotus florida</i>	18.9	1.7	58.0	11.5	9.3	265
<i>Termitomyces microcarpus</i>	27.4	4.3	54.2	2.2	14.1	364
<i>Tricholoma species</i>	16.7	3.1	71.9	12.9	8.3	342
<i>Volvariella esculenta</i>	34.4	20.6	31.7	11.2	13.3	396

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2: Περιεχόμενομανιταριών σε ανόργανα συστατικά (σε ξηρή βάση) ^[25]

Είδοςμανιταριού	Ca (mg 100 g ⁻¹)	P (mg 100 g ⁻¹)	K (mg 100 g ⁻¹)	Fe (ppm)
<i>Pleurotus florida</i>	24	1850	4660	184
<i>Agaricus campestris</i>	23	1429	4762	186
<i>Volvariella diplasia</i>	58	1042	3333	177
<i>Lentinula edodes</i>	118	650	1246	30.3
<i>Flammulina velutipes</i>	19	278	2981	11
<i>Pholiota nameko</i>	42	771	2083	22
<i>Auricularia polytricha</i>	287	ίχνη	47	-
<i>Tricholoma matsutake</i>	26	640	41	417

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3: Περιεχόμενομανιταριών σε βιταμίνες (σε ξηρή βάση) ^[25]

Είδοςμανιταριού	Ασκορβικό οξύ ^α	Θειαμίνη ^α	Νιασίνη ^α	Ριβοφλαβίνη ^α	Παντοθενικό οξύ ^α	Φολικό οξύ ^β
<i>Pleurotus florida</i>	113	1.36	72.9	7.88	29.4	1412
<i>Agaricus bisporus</i>	82	1.14	56.19	4.95	22.8	933
<i>Auricularia auricula-judae</i>	-	0.16	4.10	0.48	-	-
<i>Lentinula edodes</i>	-	0.40	11.90	0.90	-	-
<i>Volvariella volvacea</i>	-	0.32	59.5	2.73	-	-
<i>Flammulina velutipes</i>	46.3	6.10	-	5.2	106.5	-
<i>Pholiota nameko</i>	-	18.8	72.9	14.6	-	-
^α mg 100 g ⁻¹ ξηρώνμανιταριών						
^β μg 100 g ⁻¹ ξηρώνμανιταριών						

Ταμανιτάρια αποτελούν καλή πηγή πολλών βιταμινών. Τα είδη *Pleurotus* εκτιμάται ότι περιέχουν κυρίως βιταμίνες του συμπλέγματος Β και φολικό οξύ. Σε σχέση με τα είδη *Auricularia*, *Lentinus* και *Volvariella*, το περιεχόμενο σε θειαμίνη, νιασίνη και ριβοφλαβίνη του είδους *Pleurotus* είναι υψηλότερο (Πίνακας 2.3). Επομένως, ταμανιτάρια πλευρώτους είναι ιδιαίτερα καλή πηγή για την κάλυψη των ανθρώπινων απαιτήσεων σε ριβοφλαβίνη και φολικό οξύ.

Ταμανιτάρια είναι γνωστά για τις βιταμίνες τους του συμπλέγματος Β (νιασίνη, θειαμίνη και Β12) και για το φολικό οξύ. Η ικανότητά τους να περιέχουν αυτές τις βιταμίνες, ακόμη και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους σε λιγνοκυτταρινικά απόβλητα, τελικά τεκμηριώνει τις βιοσυνθετικές ικανότητές τους. Στην πραγματικότητα, έχουν αναγνωριστεί ενζυμικά συστήματα της συνθετάσης φολικού οξέος και της συνθετάσης Β12 σε κύτταραμανιταριών. ^[25]

2.2.1 *Ganoderma Lucidum*

Το *G. lucidum* περιέχει περίπου 90% υγρασία. Ως προς τα μη πτητικά συστατικά του, περιέχει 1.8% τέφρα, 26-28% υδατάνθρακες, 3-5% ακατέργαστο λίπος, 59% ακατέργαστες ίνες και 7-8% ακατέργαστη πρωτεΐνη (σε ξηρό βάρος). Επιπλέον, περιέχει και πολλά βιοενεργά συστατικά, από τα οποία τα κυριότερα είναι πολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνες και τριτερπενοειδή. Ωστόσο, το ποσό κάθε συστατικού μπορεί να διαφέρει σε φυσικά και εμπορικά προϊόντα. Για παράδειγμα, σε έρευνες που έγιναν σε 11 τυχαία δείγματα, βρέθηκε ότι το ποσοστό σε πολυσακχαρίτες κυμαινόταν μεταξύ 1.1-5.8% ενώ σε τριτερπενοειδή από μη ανιχνεύσιμο έως 7.8%. Τέτοιες διαφορές μπορεί να προκύπτουν για διάφορους λόγους, όπως διαφορές στο είδος και τα στελέχη του χρησιμοποιούμενου μανιταριού και διαφορές στον τρόπο παραγωγής τους.

Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες, έχουν απομονωθεί διάφοροι από το καρπόσωμα, σπόρια και μυκήλια του *G. lucidum*. Παράγονται από μυκητιακά μυκήλια που καλλιεργούνται σε αντιδραστήρες και μπορεί να διαφέρουν στη σύστασή τους σε σάκχαρα και πεπτίδια και στο μοριακό τους βάρος. Οι πολυσακχαρίτες του (συμβολίζονται με GL-PSs) αναφέρεται ότι παρουσιάζουν μία σειρά από βιοδραστικότητες, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Το βασικό τους συστατικό είναι η γλυκόζη από δομικές αναλύσεις. Παρόλα αυτά, είναι ετεροπολυμερή και μπορούν να περιέχουν επίσης ξυλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη και φουκόζη σε διαφορετικές διαμορφώσεις, συμπεριλαμβανομένων 1-3, 1-4 και 1-6-συνδεδεμένες β και α-D (ή L) υποκαταστάσεις. Η διαμόρφωση διακλάδωσης και τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας θεωρείται ότι επηρεάζουν τις ιδιότητες αντιογκογένεσης αυτών των πολυσακχαριτών. Το μανιτάρι περιέχει επίσης και μία μήτρα του πολυσακχαρίτη χιτίνη, που είναι σε μεγάλο βαθμό δύσπεπτη από τον άνθρωπο και είναι μερικώς υπεύθυνη για τη φυσική σκληρότητα του μανιταριού.

Η χημική δομή των τριτερπενοειδών του *G. lucidum* βασίζεται στη λανοστάνη (μεταβολίτης της λανοστερόλης), η βιοσύνθεση της οποίας βασίζεται στην κυκλοποίηση του σκουαλενίου. Τα πρώτα τριτερπενοειδή που απομονώθηκαν από το *G. lucidum* ήταν τα γανοδερικά οξέα A και B. Έκτοτε έχει γίνει αναφορά για περισσότερα από 100 τριτερπενοειδή με γνωστή χημική σύσταση και μοριακή διαμόρφωση. Μεταξύ αυτών, περισσότερα από 50 βρέθηκαν ότι είναι νέα και μοναδικά στον μύκητα. Η συντριπτική πλειοψηφία είναι γανοδερικά και λουσιδενικά οξέα, όμως έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα τριτερπενοειδή όπως γανοδεράλες, γανοδεριόλες και γανοδερμικά οξέα. Είναι εμφανές λοιπόν ότι το *G. lucidum* είναι πλούσιο σε τριτερπενοειδή και αυτή η τάξη ουσιών είναι εκείνη που του προσδίδει πικρή γεύση και θεωρείται ότι του αποδίδει τα πολλαπλά οφέλη για την υγεία, όπως υπολιπιδαιμικά και αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, το περιεχόμενο σε τριτερπενοειδή διαφοροποιείται στα επιμέρους μέρη του μανιταριού και στάδια ανάπτυξής του. Το προφίλ των διαφόρων τριτερπενοειδών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση του μανιταριού από άλλα ταξινομικά σχετικά είδη και λειτουργεί ως υποστηρικτική ένδειξη για την ταξινόμησή του. Το περιεχόμενο σε τριτερπενοειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέτρο ποιότητας διαφορετικών δειγμάτων γανοδέρματος.

Από στοιχειακή ανάλυση καρποσωμάτων *G. lucidum*, βρέθηκε ότι περιέχουν φωσφόρο, πυρίτιο, θείο, κάλιο, ασβέστιο και μαγνήσιο, ως τα κύρια ανόργανα στοιχεία. Σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύθηκαν επίσης σίδηρος, νάτριο, ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο και στρόντιο και βαρέα μέταλλα όπως μόλυβδος, κάδμιο και υδράργυρος. Μπορούν επίσης να περιέχουν σελήνιο μέχρι

72 µg/g ξηρού βάρους. Το γερμάνιο είναι το πέμπτο κατά σειρά συγκεντρωσης μέταλλο και συγκεντρώνει ενδιαφέρον για τις θεραπευτικές του δράσεις.

Το ποσοστό του *G. lucidum* σε πρωτεΐνες είναι μικρότερο από ότι σε άλλα μανιτάρια. Παρόλα αυτά, οι βιοδραστικές πρωτεΐνες του παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες. ^[7]

Μία από τις πιο γνωστές πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί από το *G. lucidum*, είναι η LZ-8, για την οποία έχουν αναφερθεί ανοσοτροποποιητικές και ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητες. Από μυκήλια του *G. lucidum*, παραγόμενα από ζύμωση με εμβάπτιση, οι Tian και Zhang καθάρισαν και χαρακτήρισαν έναν αναστολέα πρωτεΐνάσης A με μοριακό βάρος 38 kDa. Η περιεκτικότητά του σε υδατάνθρακες είναι περίπου 70%. Με διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του αναστολέα και διαφόρων πρωτεϊνών, αναφέρεται ότι ο αναστολέας είναι πιο εξειδικευμένος σε ζύμη πρωτεΐνάσης A σε σχέση με άλλες πρωτεΐνάσες. Ο αναστολέας έχει δείξει αξιοσημείωτη θερμική σταθερότητα.

Ένα βιοενεργό κλάσμα (GLPG) εκχυλίστηκε και καθαρίστηκε από μυκήλια *G. lucidum* με καταβύθιση με αιθανόλη και χρωματογραφία στήλης DEAE-κυτταρίνης. Η GLPG είναι μία πρωτεογλυκάνη με αναλογία υδατάνθρακα : πρωτεΐνης 10.4:1. Το προϊόν βρέθηκε ότι έχει αντι-ικές επιδράσεις.

Μία ριβονουκλεάση με μοριακό βάρος 42 kDa και με μία N-τερματική ακολουθία, διαφορετική από τις ριβονουκλεάσες άλλων μανιταριών, απομονώθηκε από φρέσκα καρποσώματα του *G. lucidum*. Κατά τη διαδικασία καθαρισμού, η ριβονουκλεάση προσροφάται σε DEAE-κυτταρίνη και Q-σεφαρόζη και δεν προσροφάται σε CM-σεφαρόζη. Το βέλτιστο pH, που βρέθηκε ίσο με 4, ήταν χαμηλό σε σύγκριση με τις ριβονουκλεάσες άλλων μανιταριών. Αναφέρεται απαραίτητη η θερμοκρασία των 60°C κατάλληλη για τη βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα. Η ριβονουκλεάση αυτή ήταν μοναδική σε σχέση με άλλες, καθώς έδειξε την υψηλότερη δραστηριότητα προς poly(U), ακολουθούμενη από poly(A). Η δραστηριότητα προς poly(G) και poly(C) ήταν περίπου η μισή εκείνης προς poly(A), και το ένα τέταρτο αυτής προς poly(U).

Μία ακόμη πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί, είναι η γανοδερμίνη, μοριακού βάρους 15 kDa. Η γανοδερμίνη έχει δείξει αντι-μυκητιασική δράση με αναστολή του μυκηλίου ανάπτυξης των *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Physalospora piricola*.

Τέλος, έχουν απομονωθεί ένζυμα όπως μεταλλοπρωτεάσες, που καθυστερούν τον χρόνο πήξης, εργοστερόλες (προβιταμίνη D₂), νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (αδενοσίνη και γουανοσίνη). ^{[8],[26]}

2.2.2 *Lentinula Edodes*

Το μανιτάρι *Lentinula edodes* αποτελείται, σε ξηρό βάρος, κατά 22.3% από πρωτεΐνη, 6.05% τέφρα, 2.95% λίπος, 49.09% ολικές διαιτητικές ίνες, από τις οποίες 8.40% είναι διαλυτές και 40.70% αδιάλυτες. Το περιεχόμενό του σε διαιτητικές ίνες γενικώς είναι 39.3-47.3%, αποτελούμενες και από διαλυτού και από αδιάλυτου τύπου ίνες και κυρίως από χιτίνη και β-γλυκάνες. ^[12]

Το νωπό έχει υγρασία 85.2-94.7% και κατά μέσο όρο η τιμή 90% υγρασία. Σε ξηρό βάρος, το περιεχόμενο σε τέφρα είναι 7% και σε πρωτεΐνες 13.5%. Σχετικά με τα μέταλλα που περιέχει, αναφέρονται οι τιμές σε μονάδες mg/100 g ξηρού μανιταριού: 100 mg Na, 2647 mg K, 116 mg Mg, 42 mg Ca. ^[27]

Πρέπει να αναφερθεί ότι ο υπολογισμός του περιεχομένου των πρωτεϊνών στην προκειμένη περίπτωση γίνεται μέσω του συντελεστή μετατροπής 4.38% ολικού αζώτου. Ο συντελεστής αυτός θεωρείται πιο ακριβής από ότι η μετατροπή με τον παράγοντα 6.25, λόγω της χιτίνης ή άλλων ενώσεων που συνεισφέρουν στο συνολικό άζωτο. Διατροφικά, παρέχει ποικίλα αμινοξέα όπως ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη και βαλίνη. ^[29]

Ακολούθως θα αναφερθούν οι τιμές των θρεπτικών συστατικών, σε μονάδες είτε mg είτε μg/100 g. Σημειώνεται ότι οι τιμές αυτές επηρεάζονται από την περίοδο και το στάδιο συγκομιδής και δεν μπορούν να είναι απόλυτες: B1 0.05 mg/100 g, B2 0.15 mg/100 g, φολικά 21.51 μg/100 g, B12 0.07-0.05 μg/100 g, βιταμίνη C 2.1-1.6 mg/100 g. ^[28]

Περιέχει επίσης εργοστερόλη, η οποία δεν υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα στα λαχανικά, αλλά μετατρέπεται σε βιταμίνη D με την παρουσία ηλιακού φωτός. ^[29]

Όσον αφορά το περιεχόμενο σε φολικά, περιέχει επί υγρού βάρους κατά μέσο όρο: 12.4 μg/100 g μανιταριού ολικά φολικά, 4.51 μg/100 g 5-CH₃H₄φολικό, <1 μg/100 g 10-HCOφολικό και 7.46 μg/100 g 5-HCOH₄φολικό. ^[30]

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά για το αποδεκτό ενός προϊόντος τροφίμου είναι το άρωμα. Το πιο σημαντικό πτητικό συστατικό είναι τα τερπένια, που περιλαμβάνουν υδρογονάνθρακες σχηματιζόμενους από μονάδες ισοπρενίου, ανοικτής αλύσου, κλειστής αλύσου, κυκλικούς και κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2.4, τα πιο άφθονα πτητικά συστατικά της *L. edodes*, είναι τα: δεκαεξανοϊκό οξύ-παλμιτικό οξύ, οκταδεκανοϊκό οξύ και βενζολιδιττανθρακοξυλικό οξύ. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και οι τυπικές αρωματικές ενώσεις μανιταριών, όπως DL-λιμονένιο. ^[28]

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4: Περιεκτικότητα πτητικές ενώσεων σε *L. Edodes* ^[28]

Πτητικές ουσίες από <i>L.Edodes</i>	% (αποτελέσματα από GC-MS)
DL-limonene	5.28
Hexadecanoic acid–palmitic acid	47.13
Octadecenoic acid, 2-propyl ester	6.05
9-Octadecenoic acid	16.41
Cyclohexane, 1-((1,5-dimethyl)hexyl)-4-(4-Methylpentyl)	3.01
2-Bromo-6-ethylnaphthalene	2.75
Octadecanoic acid, octadecyl ester	3.99
1,2-Benzenedicarboxylic acid	10.69
Eicosamethylcyclodecasiloxane	4.69

Σε καλλιέργειες σε αντιδραστήρες, το βυθισμένο μυκήλιο περιέχει σε ξηρό βάρος μέχρι 20% λιπίδια, ενώ τα καρποσώματα μόνο 3-4%. Υπάρχουν βέβαια σημαντικές διαφορές στη σύσταση. Τα λιπίδια των καρποσωμάτων περιέχουν υψηλά επίπεδα C16:0 και C16:1 λιπαρών οξέων. Τα

ουδέτερα λιπίδια του καρποσώματος έχουν υψηλό περιεχόμενο σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, αλλά χαμηλό σε τριγλυκερίδια. Τα κύρια φωσφολιπίδια είναι φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και καρδιολιπίνη. Αντίθετα, το μυκήλιο (που παράγεται σε βυθισμένη καλλιέργεια σε εργαστηριακό αντιδραστήρα) περιέχει τριγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα ως τα κύρια ουδέτερα λιπίδια ενώ τα κύρια φωσφολιπίδιά του είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η καρδιολιπίνη.

Το μυκήλιο περιέχει 23-24% (κατά βάρος) πρωτεΐνες, 8-9% λιπίδια, πάνω από 1.8% φαινολικές ενώσεις και ένα σημαντικό ποσό ανόργανων ουσιών, συμπεριλαμβανομένου ασβεστίου και σιδήρου. Ο μύκητας παράγει περισσότερο από 50% (κατά βάρος) ενδοκυτταρικούς και περίπου 3.5-4.0 g/L εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες.

Ανάμεσα στους μεταβολίτες που προκύπτουν από καλλιέργειες μυκήτων, οι λεκτίνες κατέχουν ιδιαίτερη θέση. Οι λεκτίνες ορίζονται ως πρωτεΐνες χωρίς ανοσογλοβουλική δράση, ικανές για επιλεκτική αναγνώριση και αντιστρεπτούς δεσμούς σε τμήματα υδατανθράκων πολύπλοκων υδατανθράκων, χωρίς να μεταβάλλουν την ομοιοπολική δομή οποιουδήποτε από τους αναγνωρισμένους γλυκοζυλο- δεσμούς. Η ικανότητα των λεκτινών να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κυτταρική πρόσφυση, καθώς ενώνονται με γλυκοσυζεύξεις της επιφάνειας των κυττάρων χρησιμοποιείται στην πειραματική βιολογία, κυτολογία, γενετική και ογκολογία. Είναι δυνατόν να παραχθεί τόσο από το μυκήλιο όσο και από βυθισμένη καλλιέργεια του μύκητα.

Το περιεχόμενο των ολικών πολυσακχαριτών του μυκηλίου είναι 47-48% και διαφέρει από αυτό που αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς περιλαμβάνει όλους του δομικούς και κυτταροπλασματικούς πολυσακχαρίτες του μυκηλίου, όχι μόνο τα ενδο- και εξω-κυτταρικά σάκχαρα. Ελεύθεροι πολυσακχαρίτες του κυτταροπλάσματος ανέρχονται στο 15-19% της ολικής ξηρής μάζας, ενώ οι δομικοί στο 28-33%. Η ποιοτική σύνθεση των δομικών πολυσακχαριτών δείχνει ετερο- και ομο-γλυκάνες με β- και α-γλυκοζιτικούς δεσμούς.^[13]

2.2.3 *Grifola Frondosa*

Τα εδώδιμα καρποσώματα του *Grifola frondosa* έχουν υγρασία 86-88% w/w. Σε ξηρό βάρος, περιέχουν 59% υδατάνθρακες, 21% ακατέργαστη πρωτεΐνη, 10% ακατέργαστες ίνες, 3% ακατέργαστο λίπος και 7% τέφρα.^[15]

Η σύσταση των μυκηλίων του, με υγρασία 33 mg/g, έχει ως εξής: 333 mg/g υδατάνθρακες, 39.5 mg/g τέφρα, 246.5 mg/g ακατέργαστο λίπος, 117.0 mg/g ακατέργαστες ίνες και 264.0 mg/g ακατέργαστη πρωτεΐνη (όλα επί ξηρού βάρους). Το περιεχόμενο σε ολικά διαλυτά σάκχαρα και πολυόλες, στα οποία αποδίδεται η γλυκιά του γεύση, είναι 83.9 mg/g (ξηρού βάρους). Όπως φαίνεται, το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και τέφρα στα μυκήλια είναι χαμηλότερο από ότι στα καρποσώματά του, σε αντίθεση με το περιεχόμενο σε λίπος που είναι πολύ υψηλότερο. Η σύσταση του μέσου καλλιέργειας επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη σχετική σύσταση του μυκηλίου. Επομένως, μεταβάλλοντας τη σύσταση του μέσου, είναι δυνατό να δημιουργηθεί ένα προφίλ σχετικής σύστασης στα μυκήλια παρόμοιο με αυτό των καρποσωμάτων του.

Τα μυκήλια έχουν ολικό περιεχόμενο σε ελεύθερα αμινοξέα 46.3 mg/g ξηρού βάρους, με κύριο αμινοξύ τη θρεονίνη, ακολουθούμενη από λευκίνη και βαλίνη. Σημειώνεται ότι περιέχουν 8 από τα απαραίτητα αμινοξέα. Τα αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν και με βάση τα χαρακτηριστικά της γεύσης που προσδίδουν (Πίνακας 2.5), με κυρίαρχο το πικρό στο *G. frondosa*. Τα 5'-νουκλεοτίδια προσδίδουν γεύση κρέατος με ισχυρό ενισχυτή γεύσης και έχουν περιεκτικότητα 13.3 mg/g ξηρού βάρους. ^[31]

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5: Περιεκτικότητα γευστικών χαρακτηριστικών των ελεύθερων αμινοξέων στα μυκήλια του *G. frondosa* ^[31]

Γευστικό χαρακτηριστικό	Περιεκτικότητα (mg/g ξηρού βάρους)
Πικρό	21.25±0.12 Arg+His+Ile+Leu+MetPhe+Try+Val
Σαν όξινο γλουταμινικό νάτριο	6.51±00.19 Asp+Glu
Γλυκό	16.15±0.49 Ala+Gly+Ser+Thr
Άγευστο	2.37±Lys+Tyr
Σύνολο	46.28±0.23

Οι κύριες δραστικές ενώσεις του είναι πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεΐνες.

Οι δραστικοί πολυσακχαρίτες τυπικά έχουν τη βασική δομή 1,6-β-διακλαδιζόμενης 1,3-β-D-γλυκάνης και ετερογλυκάνης ή σύμπλεγμα ετερογλυκάνης-πρωτεΐνης ως βασικό συστατικό. Το περιεχόμενο σε ολικές γλυκάνες συσχετίζεται με το περιεχόμενο σε σάκχαρα, με τις β-γλυκάνες να αποτελούν το κύριο συστατικό των πολυσακχαριτών, ενώ το περιεχόμενο σε α-γλυκάνες είναι αμελητέο (περίπου 1%). Μπορεί να αυξηθεί το περιεχόμενο εκχυλισμάτων πολυσακχαριτών από *G. frondosa* σε ολικές άρα και β-γλυκάνες με χρήση υποστρώματος από πίτες (στερεά υπολείμματα που προκύπτουν από μηχανική συμπίεση σπόρων) ή ελαιοπυρήνα. Παρότι δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί, τα έλαια είναι γνωστά για την ενεργοποίηση βιομάζας και την παραγωγή πολυσακχαριτών σε βυθισμένες καλλιέργειες. ^[15]

Σε αντίθεση με τον συνήθη τύπο πολυσακχαριτών, ένα D-κλάσμα αποτελείται από μία 1,6-β-γλυκάνη ως κύρια αλυσίδα με 1,3-β-διακλαδώσεις. Αποτελεί ένα αξιόλογο συστατικό του *G. frondosa* και η δράση του στην υγεία θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο. ^[32]

Ως προς το περιεχόμενό του σε φολικά, έχει τις ακόλουθες μέσες τιμές επί υγρού βάρους: 5.96 μg/100 g 5-CH₃H₄φολικό, 3.41 μg/100 g 10-HCOφολικό, 5.90 μg/100 g 5-HCO-H₄φολικό και 14.45 μg/100 g. ^[30]

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την ανάπτυξη και διατήρηση ενός υγιούς σώματος. Το ολικό οργανικό περιεχόμενο σε σελήνιο του *Grifola frondosa* είναι 0.11-0.12 μg/g, μπορεί όμως να κυμαίνεται ανάλογα με την περιοχή που καλλιεργείται και το περιεχόμενο του εδάφους σε σελήνιο. ^[14]

Το βασικό αντιοξειδωτικό συστατικό του *G. frondosa* είναι οι ολικές πολυφαινόλες που σε μεθανολικά εκχυλίσματα μπορούν να φτάσουν τη συγκέντρωση 16.3 mg/g (ξηρού βάρους). Αντίθετα, το ασκορβικό οξύ και το β-καροτένιο δεν ανιχνεύονται. Από τοκοφερόλες, ανιχνεύονται μόνο γ- και δ-τοκοφερόλες σε μικρά ποσά, επομένως οι ολικές πολυφαινόλες είναι πιθανότατα υπεύθυνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές του. ^[18]

2.2.4 *Tuber Melanosporum*

Η τρούφα *Tuber melanosporum* είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, μέταλλα (φωσφόρο, κάλιο, σίδηρο και ασβέστιο), αμινοξέα που περιέχουν θείο και λιπαρά οξέα όπως λινελαϊκό οξύ. Το ποσοστό διαλυτών πρωτεϊνών είναι ίσο με 8.7%, ενώ των ολικών πρωτεϊνών 27.6-31.7% και των πολυσακχαριτών στο 30.6% στο τελικό στάδιο ωρίμανσης.^[19]

Γενικώς, είναι πλούσιο σε αζωτούχες ενώσεις και σε μεταλλικά άλατα (5.0-7.4% επί ξηρού βάρους). Το περιεχόμενό του σε λιπίδια είναι της τάξης του 5-9% (επί ξηρού βάρους), σε στερόλες 0.6-1.2%, ενώ η υγρασία του είναι ίση με 75%, δηλαδή χαμηλότερη από αυτή των περισσότερων εκλεκτών μανιταριών.

Περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα εκτός της τρυπτοφάνης. Τα κυριότερα αμινοξέα είναι: ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, λυσίνη, τυροσίνη, αλανίνη, βαλίνη και λευκίνη. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα είναι: λινελαϊκό (C18:2), παλμιτικό (C16:0) και ελαϊκό (C18:1). Οι ποσοτικές διαφορές είναι βέβαια πολύ μεγάλες στη βιβλιογραφία και εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων όπως ηλικία, προέλευση και τύπος εδάφους.

Η ανάπτυξη του ασκοκαρπίου συνεπάγεται μείωση του λιπιδικού περιεχομένου και αύξηση του περιεχομένου μελανίνης. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάλογα με την ανάπτυξή του.^[33]

Οι ενώσεις που χαρίζουν άρωμα στο *T. melanosporum* ξεπερνούν τις 131, οι πιο κοινές από τις οποίες είναι: 2,3-βουτανεδιόνη, διμεθυλοδισουλφίδιο (DMDS), αιθυλοβουτυράτιο, διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, πεντανοϊκό οξύ, 4-μεθυλο-αιθυλοεστέρας και 3-αιθυλο-5-μεθυλοφαινόλη. Οι σημαντικότερες είναι δύο αλδεΐδες: οι 2- και 3-μεθυλοβουτανάλη. Περιέχονται επίσης αλδεΐδες, θειικές ενώσεις, ετεροκυκλικές ενώσεις, υδρογονάνθρακες μονοτερπενίου, κίτρονello, υδρογονάνθρακες σεσκιτερπενίου, αλειφατικές αλκοόλες, οξέα, σουλφίδια, μεθοξυλιωμένο βενζόλιο και τολουόλιο. Είναι γεγονός ότι οι χειμερινές τρούφες αποδίδουν 100 φορές περισσότερες αρωματικές ενώσεις από ότι οι καλοκαιρινές.^[19]

Οι σημαντικότερες χρωστικές στις τρούφες είναι κουινονοειδείς και πολυφαινολικές ενώσεις. Οι μαύρες χρωστικές είναι κυρίως αλομελανίνες πολυκετιδικής προέλευσης.^[21]

Το *T. Melanosporum* εμφανίζει σχετικά υψηλό επίπεδο μελανίνης (περίπου 15% επί ξηρού βάρους στο τελικό στάδιο ωρίμανσης). Το υψηλότερο επίπεδο μελανίνης εμφανίζεται κατά το στάδιο πλήρους ωρίμανσης στις τρούφες (όπου τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά βρίσκονται στο μέγιστό τους), όπου τα σπόρια είναι έτοιμα να διασκορπιστούν από τα ζώα-καταναλωτές τρούφας. Η σεξουαλική αναπαραγωγή της τρούφας αλλά και η ανάπτυξη του καρποσώματος εξαρτώνται από τη σύνθεση μελανίνης. Η mRNA έκφραση τυροσινάσης είναι το ένζυμο-κλειδί σε αυτή τη διαδικασία και αυξάνεται κατά την ανάπτυξη της τρούφας. Ο ρόλος των μυκητιακών μελανινών που προκύπτουν από τις οξειδώσεις αλομελανινών όπως c-γλουταμινο-3,4-υδροξυβενζένιο (GHB) και 1,8-διυδροξυναφθαλένιο (1,8-DHN) αλλά και ευμελανινών (μελανίνες που περιέχουν άζωτο) και φαιομελανινών (μελανίνες που περιέχουν θείο και άζωτο), είναι πλειοτροπικός. Η έκφραση της τυροσινάσης και η σύνθεση μελανίνης σχετίζονται με την αναπαραγωγική διαφοροποίηση. Η μελανίνη του *T. melanosporum* έχει χαρακτηριστεί εν μέρει

διαφορετική από εκείνη των λευκών τρουφών. Στο γονιδίωμά του έχουν βρεθεί τρία γονίδια λακκάσης (Tmellcc1, Tmellcc2, Tmellcc3). Έχει βρεθεί επίσης ένα γονίδιο συνθάσης του πολυκετιδίου (PKS), όχι όμως το γονίδιο που κωδικοποιεί την αφυδατάση της σκυταλόνης, ένα ένζυμο-κλειδί για τη σύνθεση μελανίνης μέσω του DHN μονοπατιού.

Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της μελανίνης στο ανθρώπινο δέρμα είναι το ανανδαμίδιο, το εξέχον μέλος του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Το σύστημα αυτό είναι παρόν και στο *T. melanosporum* με τα κύρια μεταβολικά του ένζυμα, παρόλο που δεν εκφράζει τους πιο σχετικούς υποδοχείς πρόσδεσης του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Πολύ ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι τα μεταβολικά ένζυμα ανανδαμιδίου και ενδοκανναβινοειδούς συστήματος (ECS) έχουν εξελιχθεί νωρίτερα από τους υποδοχείς πρόσδεσης ενδοκανναβινοειδούς και το ανανδαμίδιο είναι πιθανώς η ουσία που προκαλεί έλξη στους καταναλωτές τρούφας, που είναι κατά πολύ εξοπλισμένοι με τους υποδοχείς αυτούς.^[34]

Είναι δυνατόν να παραχθούν βιοενεργόι μεταβολίτες όπως πολυσακχαρίτες, μέσω βυθισμένης καλλιέργειας, έχοντας τα πλεονεκτήματα υψηλότερης μυκηλιακής παραγωγής βιομάζας σε περιορισμένο χώρο, μικρότερο χρονικό διάστημα και με λιγότερη επιμόλυνση. Αυτή είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για την αποτελεσματική παραγωγή ενδοκυτταρικών (IPS) και εξωκυτταρικών (EPS) πολυσακχαριτών. Το μέσο καλλιέργειας επηρεάζει τη δομική ποικιλία (σύσταση μονοσακχαριτών, βαθμός διακλάδωσης, μοριακό βάρος, μοριακή κατανομή βάρους και διαμόρφωση της αλυσίδας). Έχουν επιτευχθεί έτσι αποδόσεις σε EPS και IPS 7.1 και 4.4 g/L αντίστοιχα.

Οι μονοσακχαρίτες είναι το βασικό συστατικό τόσο των IPS και EPS, με κύριους εκπροσώπους τη γαλακτόζη, γλυκόζη και μαννόζη. Με την προσθήκη ιόντων μετάλλων στο μέσο, μπορεί να αυξηθεί η περιεκτικότητα σε κάθε πολυσακχαρίτη. Για παράδειγμα, με την προσθήκη Mg^{2+} στο μέσο, επιτυγχάνεται η μέγιστη περιεκτικότητα σε μαννόζη τόσο στους IPS όσο και στους EPS. Η προσθήκη μεταλλικών ιόντων μπορεί να μεταβάλλει κάποιες βασικές δραστηριότητες των ενζύμων, που οδηγούν σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες των περιεχόμενων μονοσακχαριτών.^[35]

2.2.5 *Tuber aestivum*

Το *Tuber aestivum* έχει μέτρια περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη, χαμηλή σε λιπαρά και σχετικά υψηλό περιεχόμενο σε ίνες και χιτίνη. Η υγρασία του είναι της τάξης του 82%. Περιέχει επί ξηρού βάρους 17.2-20.3% ακατέργαστη πρωτεΐνη (11.0-12.9% διαλυτές πρωτεΐνες), ολικούς υδατάνθρακες 47.0-54.7%, ακατέργαστο λίπος 2.27%, ίνες 22.03% και 7.55% τέφρα. Επομένως, τα οργανικά συστατικά καταλαμβάνουν περίπου το 92.4%, ενώ έχει ενέργεια 1124 kJ/100 g (ξηρού βάρους). Το υψηλό επίπεδο σε ίνες είναι μία από τις χαρακτηριστικές χημικές του ιδιότητες.^{[19],[36],[37]}

Από ανόργανα στοιχεία περιέχει κάλιο, φωσφόρο, σίδηρο και ασβέστιο (όπως τα περισσότερα μανιτάρια), ενώ περιέχει και αμινοξέα που περιέχουν θείο και μερικά ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως λινελαϊκό, παλμιτικό και ελαϊκό οξύ.^[24]

Το *T. aestivum* περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, πέραν της ιστιδίνης. Τα απαραίτητα αμινοξέα καταλαμβάνουν το 65% των συνολικών ελεύθερων αμινοξέων. Σε υψηλότερα ποσά βρίσκονται η λευκίνη (57.8% των συνολικών αμινοξέων), ισολευκίνη (50.2%) και βαλίνη (52.7%).^[36]

Τα τέσσερα μακροστοιχεία κάλιο, φωσφόρος, ασβέστιο και μαγνήσιο αποτελούν το 97.9% των συνολικών περιεχόμενων ανόργανων στοιχείων. Οι συγκεντρώσεις τους είναι οι ακόλουθες: 25647 mg/kg ξηρού βάρους κάλιο, 7879 mg/kg φωσφόρος και 3331 mg/kg ασβέστιο. Η περιεκτικότητα σε μαγνήσιο είναι ίση με 1000 mg/kg, ενώ των υπόλοιπων στοιχείων πολύ μικρότερη. Κάποια μικροσυστατικά όπως σίδηρος (230 mg/kg), ψευδάργυρος (160.5 mg/kg) και μαγγάνιο (17.4 mg/kg) έχουν χαμηλότερες περιεκτικότητες αλλά είναι πολύ σημαντικά για τον μεταβολισμό του καταναλωτή. Άλλα μικροσυστατικά είναι το νάτριο και βόριο, βάριο, στρόντιο και τιτάνιο. Από δηλητηριώδη στοιχεία (όπως αρσενικό, σελήνιο και βανάδιο), οι συγκεντρώσεις τους είναι μη ανιχνεύσιμες πράγμα που σημαίνει ότι η φυσιολογική κατανάλωσή του δεν αποτελεί τοξικολογικό ρίσκο.

Η κατανομή των πρωτεϊνικών κλασμάτων είναι χαρακτηριστική (σε % ακατέργαστης πρωτεΐνης): 40.98, 5.91, 3.85, 19.28 και 29.98% για αλβουμίνες, γλοβουλίνες, προλαμίνες, γλουτελίνες και NPN (μη πρωτεϊνικό άζωτο). Σε μικρά ποσά περιέχει και προλαμίνες (και άλλες ουσίες αυτού του τύπου). Οι αλβουμίνες και γλοβουλίνες (σε μεγάλο βαθμό αξιοποιήσιμες πρωτεΐνες) δίνουν μαζί περίπου το μισό (~47%) των συνολικών ακατέργαστων πρωτεϊνών. Η διαφορά ανάμεσα στο άθροισμα των παραπάνω πρωτεϊνικών κλασμάτων (~70% της ακατέργαστης πρωτεΐνης) και στο επίπεδο ακατέργαστης πρωτεΐνης είναι το μη πρωτεϊνικό άζωτο, που είναι αξιοσημείωτα υψηλό.

Οι ολικόι σακχαρίτες προκύπτουν στο *T. aestivum* σε χαμηλές συγκεντρώσεις (9.0 mg/g ξηρού βάρους ολιγοσακχαρίτες και 49.9 mg/g πολυσακχαρίτες). Το συνολικό κλάσμα σακχαριτών (~58.9 mg/g ξηρού βάρους) συνίσταται κυρίως από πολυσακχαρίτες (83% έναντι 17% ολιγοσακχαρίτες) και είναι υψηλότερο από άλλα είδη τρούφας, όπως *T. melanosporum* και *T. magnatum*.^[37]

Το άρωμά του οφείλεται κυρίως στις ενώσεις: διμεθυλοσουλφίδιο (DMS), διμεθυλοδισουλφίδιο (DMDS), μεθιονάλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 1-εξενιο-3-όνη και 3-αιθυλοφαινόλη, οξικό οξύ και 2-μεθυλοβουτυλοεστέρας. Ανάμεσα στις πτητικές οργανικές ενώσεις, περιλαμβάνονται αλκάνες, αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες και τερπένια με μεγάλο εύρος πολικότητας και μοριακού βάρους.^[19]

Σχετικά με το φαινολικό του προφίλ, βρίσκεται σε συμφωνία με το κοινό φαινολικό προφίλ των εδώδιμων μανιταριών. Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών και φλαβονοειδών είναι στα 2.8 mg/g ξηρού βάρους και 0.093 mg/g αντίστοιχα. Το περιεχόμενο σε φλαβονοειδή είναι αρκετά χαμηλότερο από το αντίστοιχο άλλων ειδών τρούφας, αλλά παρόμοιο με των *Lentinula edodes* και *Pleurotus ostreatus*, ενώ το περιεχόμενο σε φαινολικά είναι ελαφρώς λιγότερο από αυτό του *L. edodes*. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική επίδραση στην εμφάνιση, γεύση και αλμυρότητα και είναι έτσι σημαντικές ποιοτικές παράμετροι για την κατανάλωσή τους. Η κυρίαρχη φαινολική ένωση είναι το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ (12.3 μg/g) και από φλαβονοειδή η βαϊκαλεΐνη και καεμφερόλη.^{[24],[36]}

2.3 ΑΞΙΟΛΟΓΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ – ΡΟΛΟΣ

Πολλά μανιτάρια, όπως τα *Ganoderma lucidum* και *Lentinula edodes*, έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως φάρμακα και τονωτικά στην Κίνα, Κορέα και Ιαπωνία. Τα τερπενοειδή, ουσίες που εμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων έχουν βρεθεί στο *Ganoderma lucidum*. Σε άλλα είδη, έχουν βρεθεί στεροειδή, γ-πυρόνες, νεοφανή λιπαρά οξέα, λεμπτερόλη και άλλες ενώσεις που αντιπροσωπεύουν κάποιους αναστολείς ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Το περιεχόμενο σε γερμάνιο μερικών μανιταριών εμπλέκεται σε καρκινοστατικές και αναλγητικές λειτουργίες. Πολλοί πολυσακχαρίτες που δείχνουν αξιοσημείωτη αντικαρκινική ενεργότητα *in vivo* έχουν απομονωθεί από διάφορα μανιτάρια, που ανήκουν στα Polyporaceae, Tricholomataceae, και Agaricaceae μέσω μελετών διαλογής. Αυτές οι αντικαρκινικές ενώσεις, θεωρούνται ως ένα είδος τροποποιητή βιολογικής απόκρισης – ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες των οποίων οι ενεργότητες βασίζονται στην ενεργοποίηση των ανοσοποιητικών λειτουργιών του ξενιστή.

Τα μανιτάρια έχουν την τάση να βιοσυσσωρεύουν μέταλλα από τα υποστρώματα ανάπτυξής τους. Η ικανότητα πολλών μανιταριών να βιοσυσσωρεύουν κάδμιο, ψευδάργυρο, μόλυβδο, χαλκό, νικέλιο και μαγγάνιο στα καρποσώματά τους χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έντασης της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Διάφορα τοξικά μέταλλα απορροφώνται επιλεκτικά μέσα από τα βιομηχανικά απόβλητα στα μανιτάρια.

Ganoderma Lucidum

Έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός βιοενεργών ουσιών από το *Ganoderma lucidum*. Συνολικά, οι περισσότεροι από τους βιολογικά ενεργούς μεταβολίτες υπάγονται σε δύο κατηγορίες: εκείνους που προέρχονται από λανοστερόλη (κυρίως γανοδερικά οξέα και σχετικές ενώσεις) και πολυσακχαρίτες. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αναφορές και σε πεπτίδια και πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους. Έχει αποδειχτεί ότι υδατικά εκχυλίσματα του *G. lucidum* είναι κυρίως αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης σαρκώματος, όχι όμως τα μη πολικά εκχυλίσματα, παρόλο που τα τελευταία δείχνουν ισχυρή δράση έναντι της υπεροξειδωσής λιπιδίων καθώς και της απομάκρυνσης ελευθέρων ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου, ανάμεσα σε άλλες ιδιότητες.^[9]

Έχει αναφερθεί ότι περιέχει ορισμένα έντονα πικρά συστατικά όπως λουσιδενικό οξύ A, B, C, D, E, λουσιδόνη A και γανοδερικό οξύ B και C, τα οποία ήταν γνωστά για την αναστολή της απελευθέρωσης ισταμίνης από κύτταρα μαστού, ενός μετατρεπτικού ενζύμου, υπεύθυνου για την υπέρταση και την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στο συκώτι. Επίσης, υπάρχουν αναφορές για το περιεχόμενο σε πολυσακχαρίτες απλούς, αλλά και πολυσακχαρίτες δεσμευμένους σε πρωτεΐνες που έχουν αντικαρκινικές και αντι-υπερτασικές δράσεις και μειώνουν το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα.

Έχουν μελετηθεί και οι αντιβακτηριακές και αντι-ϊκές του δράσεις πέραν των παραπάνω. Έχει βρεθεί ότι υδατοδιαλυτές του ουσίες παρεμποδίζουν τα κυτταροπαθητικά αποτελέσματα των ιών του απλού έρπητα τύπου 1 και 2 (HSV-1 – Herpes Simplex Virus type 1 και HSV-2). Συγκεκριμένα, έχει απομονωθεί ο όξινος δεσμευμένος με πρωτεΐνη πολυσακχαρίτης GLhw-02 με 50% αποτελεσματικότητα που συνιστά ένα νέο παράγοντα κατά του έρπητα. Αποτελείται κατά 40.6% από πολυσακχαρίτες και 7.8% από πρωτεΐνες.^[26]

Στην Κίνα χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την αναζωογονητική του δράση και αντιμετώπιση της νευρασθένειας. Στην αγορά υπάρχουν πολλά παρασκευάσματα εξευγενισμένου πολυσακχαρίτη, εκχυλισμένα από το *G. lucidum*, για θεραπεία χρόνιων ασθενειών, όπως καρκίνου και ηπατικής νόσου.

Λόγω των υπογλυκαιμικών επιδράσεών του, εκχυλίσματα με κλάσματα πολυσακχαριτών (Ganopoly), δόθηκαν σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η παροχή *G. lucidum* μπορεί να ρυθμίσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αν και χρειάζονται ακόμα πολλές μελέτες σε ανθρώπους με και χωρίς συμβατικά φάρμακα.

Έχουν απομονωθεί και βιοδραστικές πεπτιδογλυκάνες, όπως πρωτεογλυκάνη (GLPG με αντι-ική δράση), ανοσορρυθμιστική ουσία (GLIS), PGY (ένα υδατοδιαλυτό γλυκοπεπτίδιο κλασματοποιημένο και εξευγενισμένο από υδατικά εκχυλίσματα καρποσωμάτων *G. lucidum*), GL-PS πεπτίδιο (GL-PP) και F3 (ένα κλάσμα γλυκοπρωτεΐνης που περιέχει φουκόζη).

Από μέταλλα, έχει βρεθεί πως περιέχει γερμάνιο, ένα μέταλλο όχι απαραίτητο, αλλά το οποίο έχει δράσεις ενίσχυσης του ανοσοποιητικού, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις, σε μικρές δόσεις. Παρόλα αυτά, δεν έχει αποδειχτεί ακόμη η σύνδεση αυτού του στοιχείου με τα συγκεκριμένα οφέλη που προσφέρει αυτό το μανιτάρι στην υγεία.

Από πρωτεΐνες και λεκτίνες, παρότι δεν έχει υψηλή συγκέντρωση έχει αποδειχτεί η θεραπευτική δράση ορισμένων εξ αυτών, όπως οι LZ-8 (μία ανοσοκατασταλτική πρωτεΐνη εξευγενισμένη από μυκήλια), GLP (ένα παρασκεύασμα πεπτιδίου με ηπατοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις) και η γανοδερμίνη (μία αντιμυκητιακή πρωτεΐνη, απομονωμένη από καρποσώματα του μανιταριού). Από λεκτίνες, απομονωμένες τόσο από το καρπόσωμα όσο και το μυκήλιο του *G. lucidum*, αξίζει να αναφερθεί μία εξαμερής λεκτίνη 114 kDa (γλυκοπρωτεΐνη) με δραστηριότητα συγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε επεξεργασμένα με πρόνωση ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Τέλος, περιέχει ένζυμα με ενδιαφέρουσες δράσεις. Για παράδειγμα, έχει απομονωθεί ένας πολύ επιλεκτικός και αποτελεσματικός αναστολέας της α-γλυκοσιδάσης, SKG-3 από το καρπόσωμά του. Τα σπόριά του περιέχουν ένα μείγμα από διάφορα λιπαρά οξέα μακρικής αλύσου, που πιθανώς συμβάλλουν στην αντικαρκινική δράση του μανιταριού.^[7]

Lentinula Edodes

Η *Lentinula edodes* περιέχει έναν μεγάλο αριθμό από πολυσακχαρίτες με αντικαρκινικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες και η πρακτική εφαρμογή τους δεν εξαρτάται μόνο από τις μοναδικές τους ιδιότητες αλλά και από τη βιοτεχνολογική διαθεσιμότητά τους. Η απομόνωση και καθαρισμός των πολυσακχαριτών (ενδοκυτταρικά από το μυκήλιο και εξωκυτταρικά από το υγρό καλλιέργειας) είναι σχετικά απλές και άμεσες διαδικασίες.

Στην Κίνα χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την ενδυνάμωση της υγείας και για την αντιμετώπιση ανθεκτικών ασθενειών. Έχει εκτιμηθεί ότι προκαλεί καρκινική αναστολή σε ποσοστό 80%, σε ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε υδατικά εκχυλίσματα του μανιταριού,

ενάντια σε σάρκωμα ποντικών. Οι ιατρικές του επιδράσεις είναι οι ακόλουθες: αντι-φλεγμονώδεις, αντι-ογκογόνες, αντιμετώπιση γαστρεντεροπάθειας, πονοκεφάλου, ίλιγγου, κίρρωσης του ήπατος και αρτηριοσκλήρωσης.

Οι πολυσακχαρίτες από μανιτάρια δεν επιτίθενται απευθείας στα καρκινικά κύτταρα, αλλά προκαλούν τις αντικαρκινικές επιδράσεις τους ενεργοποιώντας την απόκριση του ανοσοποιητικού του ξενιστή, διεγείροντας τα φυσικά κύτταρα-φονείς (natural killer cells), T κύτταρα, B κύτταρα και τις εξαρτώμενες από μακροφάγα αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως, η ανοσορρυθμιστική δράση των πολυσακχαριτών από μανιτάρια είναι πολύ πολύτιμη ως μέσο προφύλαξης (ήπια και μη επιθετική μορφή θεραπείας), πρόληψη μετάστασης και ως συμπλήρωμα θεραπείας μαζί με χημειοθεραπεία.

Οι βιολογικοί μηχανισμοί που μεσολαβούν στη βιολογική ενεργότητα των πολυσακχαριτών δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί. Αυτό που θεωρείται δεδομένο όμως είναι πως είναι απαραίτητη η αλυσίδα (1→3)-β-γλυκάνης και ότι τα δραστικότερα πολυμερή έχουν βαθμούς διακλάδωσης μεταξύ 0.20 και 0.33. Κάποια δεδομένα προτείνουν ότι οι δομές τριπλής έλικας, που σχηματίζονται από πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, είναι σημαντικές για τη δραστικότητα ενίσχυσης του ανοσοποιητικού, ενώ άλλα προτείνουν ότι η δραστικότητα είναι ανεξάρτητη οποιασδήποτε συγκεκριμένα διατεταγμένης δομής. Είναι όμως γεγονός ότι η δραστικότητα των β-γλυκανών να ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα εξαρτάται από τον ελικοειδή σχηματισμό και την παρουσία υδροφιλικών ομάδων τοποθετημένων στην εξωτερική επιφάνεια της έλικας.

Η λεντινάνη (εμπορικός πολυσακχαρίτης από *L. Edodes*) είναι ένα από τα τρία βασικότερα φάρμακα (όλα β-γλυκάνες) από φαρμακευτικά μανιτάρια. Παράγεται από βυθισμένες αναδεδυόμενες καλλιέργειες, με βέλτιστο pH το 5 ως προς την απόδοση λεντινάνης. Η λεντινάνη μπορεί να εκχυλιστεί τόσο από βιομάζα όσο και από το υγρό καλλιέργειας, με τη διαφορά ότι η λεντινάνη που παράγεται εξωκυτταρικά είναι πιο αποτελεσματική στη διέγερση παραγωγής αντισωμάτων. Η έρευνα όμως συνεχίζεται για την εύρεση μεθόδων με υψηλότερη καθαρότητα και απόδοση.

Οι λεκτίνες (πρωτεΐνες) έχουν αντιπολλαπλασιαστική δράση κατά των κυτταρικών γραμμών ανθρώπινου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής γραμμής λευχαιμίας M1, κυττάρων U937 ανθρώπινης μονοβλαστικής λευχαιμίας και κυτταρική σειρά ηπατώματος HepG2. Επομένως, έχουν σημαντικές εφαρμογές στη μικροβιολογία και την κλινική ιατρική. Μπορούν να συμβάλλουν επίσης στην αντιμετώπιση του προβλήματος της ξενομεταμόσχευσης, αφού ακινητοποιημένες λεκτίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό των γλυκοπρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την υπεροξεία απόρριψη των ιστών και οργάνων από κατώτερα θηλαστικά στον άνθρωπο. Η αυστηρή επιλεκτικότητα κάποιων λεκτινών για τα α-2,6-συνδεδεμένα σιαλικά οξέα τις καθιστά ένα πολύτιμο εργαλείο γλυκοβιολογικών μελετών στην έρευνα για τον καρκίνο και τη βιοϊατρική.

Μία ακόμη επίδραση είναι η αναστολή της αφλατοξίνης. Διηθήματα και μυκήλια από *L. Edodes* λειτουργούν ως εξωτερικό ερέθισμα επηρεάζοντας την αντιοξειδωτική κατάσταση στο μύκητα που παράγει την τοξίνη (*Aspergillus parasiticus*) και αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην αναστολή της παραγωγής αφλατοξίνης. Ο παράγοντας που βρέθηκε ότι έχει τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την αναστολή αφλατοξίνης είναι το περιεχόμενο σε β-γλυκάνες και όχι η αντιοξειδωτική δράση

των διηθημάτων που διεγείρει το μύκητα να παράγει αντιοξειδωτικά ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης).

Όλο και περισσότεροι μεταβολίτες του απομονώνονται και εξετάζονται. Πέραν των παραπάνω, παρουσιάζει και επίδραση κατά της υπέρτασης αλλά και αντιβακτηριακή. Συγκεκριμένα, βρέθηκε αποτελεσματικό εναντίον των μικροοργανισμών *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus megaterium*, όχι όμως αντι-ικό έναντι του *Candida Albicans*. Η ουσία που θεωρήθηκε υπεύθυνη για τη δράση αυτή, ήταν θερμικά σταθερή και είχε μοριακή μάζα κάτω από 10 000. Αυτά τα χαρακτηριστικά προτείνουν τη λενθειονίνη ως το συστατικό αυτό, μία αντιβακτηριακή και αντι-ική ένωση που περιέχει θείο. ^[13]

Grifola Frondosa

Στην Κίνα χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την ενδυνάμωση της υγείας και για την αντιμετώπιση ανθεκτικών ασθενειών, όπως η χρόνια βρογχίτιδα. Ανάμεσα στις πολυάριθμες επιδράσεις του συγκαταλέγονται: αντικαρκινική δραστηριότητα, ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος, επιδράσεις στην αγγειογένεση, μεταβολισμός λιπιδίων και διαβήτης. ^[15]

Ένα απαραίτητο για την υγεία συστατικό είναι το σελήνιο, ιχνοστοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη και τη συντήρηση του οργανισμού. Ανεπάρκειες σε σελήνιο ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στον αυξανόμενο αριθμό κρουσμάτων καρκίνου σε αρκετές χώρες. Είναι δυνατόν να απομονωθεί ένας πολυσακχαρίτης εμπλουτισμένος με σελήνιο (Se-GP), ψεκάζοντας με διάλυμα Na_2SeO_3 καρποσώματα του μανιταριού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μέχρι και 50% μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σελήνιο στον πολυσακχαρίτη GP. ^[14]

Η σημασία των φολικών για την εμβρυϊκή ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα έχει αναγνωριστεί προ πολλού, μαζί με πιο πρόσφατες έρευνες σχετικά με τον ρόλο των φολικών στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης διαφόρων δυσλειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου των: καρκίνου του παχέος εντέρου, καρδιαγγειακής νόσου, θρομβοεμβολικών διαδικασιών και νευροψυχιατρικών διαταραχών. Ο εμπλουτισμός διαφόρων τροφών εφαρμόζεται εδώ και αρκετά χρόνια, ιδίως στις ανεπτυγμένες χώρες.

Το φολικό οξύ (ή βιταμίνη B9) απαντάται σε πολύ μικρές ποσότητες φυσικά στα τρόφιμα. Το κυρίαρχο φολικό στα φρούτα και λαχανικά είναι το 5-CH₃-H₄ (μεθυλοτετραϋδροφολικό) και λειτουργεί ως δότης μεθυλίου κατά τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε S-αδενοσυλμεθειονίνη. Το διαιτητικό φολικό οξύ μετατρέπεται σε 5-CH₃-H₄ και το ένζυμο αναγωγή του μεθυλενο-τετραϋδροφολικού (MTHFR) αποτελεί στοιχείο-κλειδί σε αυτή τη διαδικασία. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του MTHFR οδηγούν σε μειωμένη δραστηριότητά του και έχουν συσχετιστεί με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ψυχικών διαταραχών, ορισμένους τύπους καρκίνου και άλλες ασθένειες. Τα μανιτάρια αποτελούν καλή πηγή πρόσληψης φολικού οξέος, με το *Grifola frondosa* να βρίσκεται σε ενδιάμεση θέση ως πηγή φολικών και συγκρίσιμο με τις ποικιλίες *Agaricus bisporus* (white button και άλλα) και *Lentinula edodes*. ^[30]

Το maitake D-κλάσμα είναι ένας πολυσακχαρίτης (β-γλυκάνη) που εκχυλίζεται από το *G. frondosa*. Τα φυσικά κύτταρα-φονείς επιτίθενται σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με παθογόνα όπως βακτήρια και ιούς και παράγουν κυτοκίνες, όπως ιντερφερόνη-γάμμα (INF-γ) που μπορούν να ρυθμίσουν φυσικές και ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Το D-κλάσμα μπορεί να αυξήσει αυτές τις κυτοκίνες, διεγείροντας τη φυσική ανοσία που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κυττάρων-φονέων έμμεσα μέσω της ιντερελευκίνης IL-12 που παράγεται από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Έτσι, η πρόσληψη αυτού του κλάσματος από υγιή άτομα μπορεί να αποτρέψει τη μόλυνση από μικροοργανισμούς. Επιπλέον, έχει καλή αντικαρκινική δραστηριότητα και εκλεκτικότητα. Από έρευνες σε ποντίκια που φέρουν όγκο, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το D-κλάσμα μπορεί να μειώσει την αποτελεσματική δοσολογία με την αύξηση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των ανοσοεπαρκών κυττάρων και έτσι παρέχουν πιθανό κλινικό όφελος για τους ασθενείς με καρκίνο.

Αξιόλογα συστατικά πολυσακχαριτών που έχουν απομονωθεί είναι Grifola (1→3)-β-D-γλυκάνη (από το καρπόσωμα, μυκήλιο και μέσο καλλιέργειας) και από ετερογλυκάνες μαννοφουκοξυλογλυκάνη και μαννογαλακτοφουκάνη. Η γριφολάνη, (1→3)-β-γλυκάνη επάγει την απελευθέρωση ιντερλευκινών IL-1, IL-6 και TNF-α από μακροφάγα, αν και απαιτείται μορφή διαλυτής γριφολάνης μεγάλης μοριακής μάζας για την παραγωγή TNF-α. Η MBG, μία α-γλυκάνη, μπορεί να ενισχύσει τη διαδικασία αιμοποίησης σε κύτταρα μυελού των οστών και προστατεύει τα βλαστοκύτταρα από την τοξικότητα της δοξορουβικίνης.^{[2],[32]}

Χάρη στα αντιοξειδωτικά του συστατικά (κυρίως ολικές πολυφαινόλες) μπορεί να συμβάλλει στην προστασία του ανθρώπινου σώματος από την οξειδωτική υποβάθμιση, αν περιέχεται στη διατροφή, με αποτέλεσμα να προσφέρει πολυάριθμα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία.^[18]

Tuber melanosporum

Η μεγάλη θρεπτική αξία του *T. melanosporum*, όπως γενικότερα των τρούφων, οφείλεται στο χαμηλό περιεχόμενο σε λιπαρά και το σχετικά μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών. Πέραν αυτού όμως, το ενδιαφέρον στρέφεται σε αυτό λόγω της ύπαρξης μεγάλης ποικιλίας μυκοχημικών ενώσεων, όπως στερόλες, ceramides ή φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι ουσίες μπορούν να ενισχύσουν την ανθρώπινη υγεία, αφού δείχνουν να εμπλέκονται στην πρόληψη και θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Παρόλα αυτά, η έρευνα γύρω από τα πολλαπλά οφέλη της τρούφας στον άνθρωπο, βρίσκεται ακόμη σε πρωταρχικό στάδιο.

Η εργοστερόλη, ένας τύπος φυτικής στερόλης, εμφανίζεται σε δύο βασικές μορφές, ελεύθερη και εστεροποιημένη. Η εργοστερόλη έχει μεγάλη σημασία καθώς υφίσταται φωτόλυση σε υπεριώδη ακτινοβολία (280-320 nm), αποδίδοντας πρεβιταμίνη D2 ως ένα από τα κυριότερα προϊόντα. Μετά από θερμική αναδιοργάνωση, η πρεβιταμίνη D2 μετατρέπεται αυθόρμητα σε βιταμίνη D2. Από την άλλη πλευρά, η εργοστερόλη και τα παράγωγά της, έχουν δείξει μεγάλο εύρος ιδιοτήτων ενίσχυσης της υγείας, όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις ή αντιυπερλιπιδαιμικές δραστηριότητες. Επιπλέον, εμπλέκεται στην ενεργοποιημένη έκφραση γονιδίων άμυνας και δείχνει να αυξάνει την αντίσταση φυτών ενάντια σε παθογόνα. Το *T. melanosporum* εμφανίζει περιεκτικότητα σε εργοστερόλη 1.8 mg/g (επί ξηρού βάρους) , μεγαλύτερη από αντίστοιχα είδη, όπως *T. aestivum*.

Πέραν της εργοστερόλης που απελευθερώνεται από τη μυκητιακή κυτταρική μεμβράνη, οι εστέρες εργοστερόλης, απομονωμένοι σε κυτοσολικά μόρια λιπιδίων, συνεισφέρουν στο ολικό περιεχόμενο εργοστερόλης. Το περιεχόμενο αυτών στο *T. melanosporum* είναι ίσο με 0.1 mg/g (ξηρού βάρους).

Προστατευτική επίδραση σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως καρκίνο, καρδιαγγειακή νόσο ή φλεγμονώδεις διεργασίες, έχουν και οι φαινολικές ενώσεις. Ο μηχανισμός αυτός συνδέεται με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Οι ρίζες που σχηματίζονται από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μπορούν να σταθεροποιηθούν από την υψηλά συζευγμένη δομή των παραγώγων φαινόλης, ώστε να παρεμποδίζεται η επίθεση ελευθέρων ριζών και η επακόλουθη οξείδωση βιομορίων όπως πρωτεϊνών, λιπιδίων ή DNA. Μεθανολικά εκχυλίσματα του *T. melanosporum* έχουν δείξει αναστολή της οξείδωσης λιπαρών οξέων, καθώς η οξείδωσή τους μπορεί να επιβραδυνθεί ή εν μέρει να αποφευχθεί μέσω αντιοξειδωτικών ενώσεων. Συγκεκριμένα έχουν δείξει αναστολή 18% στην οξείδωση λινελαϊκού οξέος, που είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη του *T. aestivum* (24%), γεγονός που συνδέεται με το χαμηλότερο περιεχόμενο σε φαινολικά. Παρόλα αυτά, η αντιοξειδωτική ικανότητα επηρεάζεται όχι μόνο από την περιεκτικότητα αλλά και από τη φύση των φαινολικών ενώσεων. Σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις παίζουν το φαινολικό υδρογόνο και η σταθερότητα της ρίζας που σχηματίζεται μετά την οξείδωση. Το *T. melanosporum* έχει δηλαδή μικρότερο εύρος ενώσεων από το *T. aestivum*, που σε συνδυασμό με το μικρότερο περιεχόμενο σε φαινολικά δικαιολογεί τη λιγότερο ισχυρή αναστολή.^[38]

Σειρά έχουν οι πολυσακχαρίτες με τα δικά τους οφέλη. Οι περισσότεροι από τους εξωκυτταρικούς (EPS) πολυσακχαρίτες επιδεικνύουν ισχυρή αναστολή κατά της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Η γλυκόζη και μαννόζη, ως εδώδιμοι πολυσακχαρίτες μυκήτων, δεσμεύονται με υψηλή εξειδίκευση στους υποδοχείς των ανθρώπινων μακροφάγων για να εμφανίσουν δράση κατά των όγκων. Η αντικαρκινική δράση των πολυσακχαριτών οφείλεται στη δομή τους και μπορεί να ενισχυθεί με την προσθήκη ιόντων μετάλλων στο μέσο ανάπτυξης σε αντιδραστήρα (βυθισμένη καλλιέργεια), με τα ιόντα K^+ και Mg^{2+}/K^+ να δείχνουν τη μεγαλύτερη αναστολή. Τα μεταλλικά ιόντα επηρεάζουν τόσο τις πρωτοταγείς όσο και δευτεροταγείς δομές των πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα, τα παραπάνω ιόντα επηρεάζουν σημαντικά τους α-γλυκοζιτικούς δεσμούς στην πρωτοταγή δομή των EPS, που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Το K^+ επηρεάζει σημαντικά και το σφαιρικό σχήμα της δευτεροταγούς δομής των EPS και αυτή η δομή οδηγεί σε μεγαλύτερη αναστολή καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι EPS πολυσακχαρίτες παρουσιάζουν χαμηλή κυτοτοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα, δηλαδή είναι αποτελεσματικοί στην αναστολή μόνο καρκινικών δράσεων.

Οι πολυσακχαρίτες που απομονώνονται από το *T. melanosporum* έχουν και ανοσορυθμιστική ικανότητα.^[35]

Tuber aestivum

Οι ενώσεις που χαρίζουν στην άγρια τρούφα *Tuber aestivum* τα πολυάριθμα οφέλη στην υγεία, τη διατροφή και το μεταβολισμό του ανθρώπου μπορούν να βρεθούν σε κλάσματα λιπιδικά,

φαινολικά και πολυσακχαριτών, έχοντας μεγάλη ποικιλότητα βιομορίων. Τέτοια βιομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν από διατροφικές ή φαρμακευτικές εταιρείες μέσω εκχύλισης, απομόνωσης και καθαρισμού.

Το ολικό περιεχόμενο φαινολικών βρίσκεται σε συμφωνία με τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του *T. aestivum*, προσφέροντας με αυτό τον τρόπο πολλά φυσιολογικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία. Η χημική σύσταση των φαινολικών μπορεί να επηρεάσει τη σταθεροποίηση των ριζών και την αντιοξειδωτική ικανότητα γενικότερα. Φαίνεται ότι και το κλάσμα φλαβονοειδών συνεισφέρει στην υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του μανιταριού. Για παράδειγμα, εκχυλίσματα μεθανόλης αναστέλλουν την επαγόμενη από ABAP υπεροξειδωση των λιπιδίων. Έτσι, λειτουργεί ως προστατευτικός φορέας στηρίζοντας τη μείωση της οξειδωτικής επίπτωσης στο ανθρώπινο σώμα. ^{[24],[36]}

Λόγω του ότι περιέχει τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα, αποτελεί καλή πηγή πρωτεϊνών, ειδικά συγκρινόμενο με πρωτεΐνες προερχόμενες από λαχανικά. Έτσι, χαρακτηρίζεται επαρκές υποκατάστατο των πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης αλλά και πρωτεϊνικό τρόφιμο του μέλλοντος. Σημαντικό ρόλο παίζει και το γεγονός ότι η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη βρίσκονται σε υψηλές ποσότητες σε αυτό.

Αποτελεί επίσης καλή πηγή λιπαρών οξέων, με κύριους εκπροσώπους το λινελαϊκό οξύ (75.5% των συνολικών λιπαρών οξέων σε ξηρό βάρος), παλμιτικό οξύ (13.6%), ελαϊκό οξύ (7.2%) και στεατικό οξύ (2.4%). Η περιεκτικότητα σε ακατέργαστο λίπος είναι μικρή (2.9%), επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί υγιεινή τροφή προς κατανάλωση. Επιπλέον, το λινελαϊκό και ελαϊκό οξύ είναι πολύ σημαντικά συστατικά μίας διατροφής. Το γεγονός ότι έχει λινελαϊκό οξύ ως κύριο συστατικό, δεδομένου ότι είναι πολυακόρεστο λιπαρό, το *T. aestivum* καθίσταται πολύ σημαντικό για την ανθρώπινη διατροφή, αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική αξία του μανιταριού.

Εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι τυπικών μεταλλαξιόγνων. Υδατικά εκχυλίσματα από νωπές τρούφες *T. aestivum* δείχνουν ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση κατά του μικροοργανισμού *Salmonella typhimurium* TA98, από ότι αιθανολικά εκχυλίσματα. ^[19]

Ακόμη, έχει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα. Διάφορα ένζυμά του, όπως 15- και 5-λιποξυγενάση, κυκλοοξυγενάση-2, κυτόχρωμα P450 και εποξυγενάση εμπλέκονται στη σύνθετη αλληλουχία μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό πολυάριθμων μεσολαβητών φλεγμονής.

Όσον αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες, έχει βρεθεί ότι υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα του *T. aestivum* παρεμποδίζουν την κυτταρική ανάπτυξη κυτταρικών γραμμών καρκινώματος του τραχήλου. Είναι επίσης δραστικά έναντι της κυτταρικής γραμμής αδενοκαρκινώματος στο κόλον. Η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης προκύπτει από τη συνεργιστική δράση διαφόρων δραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων, ενώ οφείλεται εν μέρει τουλάχιστον, στην παρουσία φαινολικών όπως p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βαϊκαλεΐνη, επικατεχίνη και κατεχίνη, καθώς είναι ήδη γνωστή η κυτοτοξική ενεργότητά τους ενάντι διαφορετικών καρκινικών κυτταρικών γραμμών. Αντικαρκινικές ιδιότητες έχουν και κλάσματα πολυσακχαριτών. ^[24]

3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΞΙΟΛΟΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Τα μανιτάρια χαρακτηρίζονται όχι μόνο για το ιδιαίτερο άρωμα και γεύση τους, αλλά και για την υψηλή θρεπτικότητά τους, χάρη στη σύστασή τους, με κυρίαρχες ενώσεις: υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, έλαιο (με μεγάλο βαθμό ακορεστότητας), βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Τα μανιτάρια χαρακτηρίζονται επίσης για τα πολλαπλά οφέλη τους στην υγεία, χάρη σε ενώσεις όπως γλυκάνες, πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες. Ο συνδυασμός αυτών των χαρακτηριστικών έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προς την απομόνωση των αξιολογών συστατικών μανιταριών προς αξιολόγησή τους και παρασκευή λειτουργικών τροφίμων.

3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκα μεγαλομόρια που συντίθενται από αμινοξέα, συνδεόμενα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Στις πρωτεΐνες συναντώνται α-αμινοξέα, δηλαδή ενώσεις που στο μόριό τους έχουν αμινομάδα ($-NH_2$) και καρβοξυλομάδα ($-COOH$). Είκοσι (20) από αυτά τα αμινοξέα αποτελούν τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, σχηματίζοντας έναν πολύ μεγάλο αριθμό συνδυασμών. Εννιά (9) από αυτά τα αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο, ονομάζονται απαραίτητα αμινοξέα και είναι τα ακόλουθα: βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη.

Η αλληλουχία αμινοξέων σε μία πρωτεϊνική αλυσίδα συνιστά την πρωτοταγή δομή της και καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες της προκύπτουσας πρωτεΐνης. Η δευτεροταγής δομή αποκαλύπτει τη διευθέτηση της αλυσίδας στο χώρο, αναφέρεται δηλαδή στην τρισδιάστατη διάταξη γειτονικών της τμημάτων. Προκύπτει από τη διάταξη της πρωτεϊνικής αλυσίδας στο χώρο γύρω από τον άξονα που σχηματίζεται από τον πεπτιδικό δεσμό. Η αλυσίδα αποκτά έτσι τακτικά επαναλαμβανόμενα δομικά στοιχεία, τα κυριότερα από τα οποία είναι: α-έλικα, β-πτυχωμένο φύλλο, τριπλή έλικα του κολλαγόνου και δομή της τυχαίας σειράς.

Η τριτοταγής δομή προκύπτει από την τρισδιάστατη οργάνωση μεγάλων τμημάτων της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Έτσι σχηματίζονται οι ινώδεις (fibrous) πρωτεΐνες ή σκληροπρωτεΐνες και οι σφαιροειδείς (globular) πρωτεΐνες. Η τεταρτοταγής δομή προκύπτει από τη σύνδεση περισσότερων από μίας πεπτιδικών αλυσίδων με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερότερων συνόλων.

Οι πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες, μερικές από τις οποίες είναι η διάσταση (ή αμφοτερισμός), η διαλυτότητα, οι οπτικές ιδιότητες και η μετουσίωση.

Σχετικά με τη διάσταση, όπως τα αμινοξέα, έτσι και οι πρωτεΐνες είναι επαμφοτερίζουσες ενώσεις, δηλαδή ανάλογα με το pH μπορούν να υπάρξουν ως πολυσθενή κατιόντα, ανιόντα ή επαμφοτερίζοντα ιόντα. Έτσι, αναλόγως του pH συμπεριφέρονται ως οξέα ή βάσεις. Η τιμή pH

στην οποία η πρωτεΐνη έχει καθαρό φορτίο μηδέν ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point – pI).

Η οπτική ενεργότητα των πρωτεϊνών οφείλεται τόσο στην ασυμμετρία των αμινοξέων όσο και στη χειρομορφία, ως αποτέλεσμα της διευθέτησης της πεπτιδικής αλυσίδας. Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών μεταβάλλεται και επηρεάζεται από τον αριθμό των πολικών και μη πολικών ομάδων και τη διευθέτησή τους κατά μήκος του μορίου. Γενικώς, οι πρωτεΐνες είναι διαλυτές μόνο σε έντονα πολικούς διαλύτες, όπως το νερό και η γλυκερίνη.

Μετουσίωση είναι η αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη αλλαγή της φυσικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης χωρίς διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζεται η πρωτοταγής δομή (αλληλουχία αμινοξέων). Η μετουσίωση προκαλείται από διάφορους παράγοντες, όπως: μεταβολή της θερμοκρασίας, ρύθμιση του pH, αύξηση των περιοχών διεπιφάνειας, προσθήκη οργανικών διαλυτών, αλάτων, ουρίας, υδροχλωρικής γουανιδίνης ή απορρυπαντικών. Η μετουσίωση των βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών συνδέεται συνήθως με την απώλεια δραστηριότητας, γενικότερα όμως προκαλεί αλλαγές στις φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών.

Πέραν των χαρακτηριστικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, πολυάριθμες είναι και οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, στις οποίες βασίζονται οι ποικίλες εφαρμογές των πρωτεϊνών σε συστήματα τροφίμων ως λειτουργικά συστατικά. Χαρακτηριστική είναι η διόγκωση των αδιάλυτων πρωτεϊνών που αντιστοιχεί στην ενυδάτωση των διαλυτών πρωτεϊνών στο σημείο που η εισαγωγή νερού μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων προκαλεί αύξηση στον όγκο και άλλες μεταβολές των φυσικών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης.

Οι πρωτεΐνες λειτουργούν σε διάφορα τρόφιμα ως συστατικά σχηματισμού και σταθεροποίησης αφρού, πηκτών και γαλακτωμάτων. Οι αφροί είναι διασπορά αερίων σε υγρά και οι πρωτεΐνες τους σταθεροποιούν με το σχηματισμό εύκαμπτων και συνεκτικών υμενίων γύρω από τις φυσαλίδες του αερίου. Οι πηκτές είναι συστήματα διασποράς τουλάχιστον δύο συστατικών στα οποία η φάση διασποράς σχηματίζει ένα συνεκτικό δίκτυο στο μέσο της διασποράς, που μπορεί να συγκρατήσει μεγάλες ποσότητες παγιδευμένου νερού στο πλέγμα. Τα γαλακτώματα είναι συστήματα διασποράς ενός ή περισσότερων μη αναμίξιμων υγρών. Λόγω της αμφολυτικής φύσης τους, οι πρωτεΐνες μπορούν να σταθεροποιήσουν γαλακτώματα τύπου λιπαρά σε νερό (o/w) όπως στο γάλα, σχηματίζοντας διεπιφανειακά υμένια που αποτρέπουν τις φάσεις διασποράς να ρέουν μαζί.^[39]

3.1.1 Τεχνολογία Παραλαβής Πρωτεϊνικών Προϊόντων

Οι πρωτεΐνες κατέχουν όπως είναι γνωστό, πρωταρχικό ρόλο στη διατροφή και οι απαιτούμενες ποσότητες πρωτεϊνών για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών του ανθρώπου αυξάνονται συνεχώς, με αποτέλεσμα να αναζητούνται νέες πρωτεϊνικές πηγές. Πέραν της διατροφικής τους αξίας όμως, οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται και ως συστατικά συστημάτων τροφίμων λόγω των λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Δημιουργείται λοιπόν η ανάγκη απομόνωσης πρωτεϊνών ζωικής ή φυτικής προέλευσης και η παραλαβή πρωτεϊνικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων).

Προκύπτουν τριών ειδών πρωτεϊνικά προϊόντα: πρωτεϊνικά άλευρα με περιεκτικότητα 50% σε πρωτεΐνες, πρωτεϊνικά συμπυκνώματα με περιεκτικότητα 70% και πρωτεϊνικά υπερσυμπυκνώματα με περιεκτικότητα 90%.

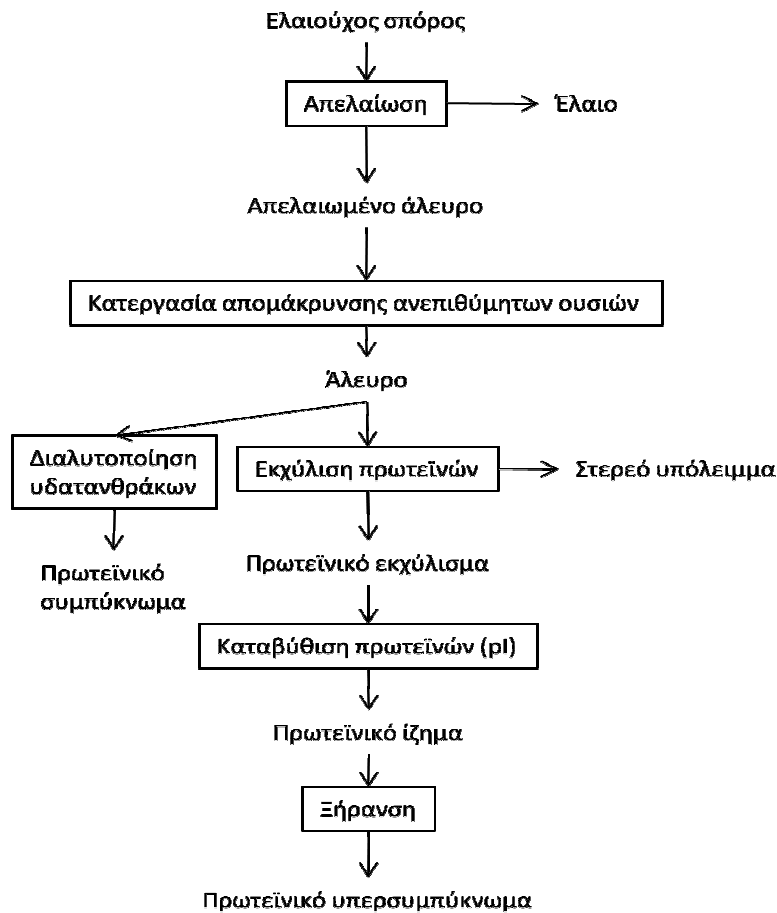
Η κλασική μέθοδος παραλαβής πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων περιλαμβάνει εκχύλιση πρωτεϊνών προς διαλυτοποίησή τους σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH και καταβύθιση στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (με οξίνιση), με πρώτη εφαρμογή σε σπόρους σόγιας, ενώ αργότερα εφαρμόστηκε και σε ελαιούχους σπόρους ή άλευρα μετά από ελαιοκατεργασία. Για παράδειγμα, εφαρμογές αυτής της διεργασίας έχουν πραγματοποιηθεί σε όσπρια, δημητριακά και παραπροϊόντα όπως απόβλητα από κατεργασίες τομάτας ή χυμών φρούτων. ^[48]

Γενικά, οι πρώτες ύλες που περιέχουν υψηλά ποσά ελαίου πρέπει πρώτα να απελαιωθούν πριν πραγματοποιηθεί η απομόνωση των πρωτεϊνών. Η απομάκρυνση ελαίου θα εμποδίσει το σχηματισμό γαλακτώματος κατά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και θα οδηγήσει στην παραγωγή απελαιωμένων υλικών που θα είναι συμβατά με τα επακόλουθα πρωτόκολλα καθαρισμού που χρησιμοποιούν κυρίως υδατικά διαλύματα. Η απελαίωση της πρώτης ύλης επιτυγχάνεται με εκχύλιση με διαλύτες όπως εξάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα. Πρώτες ύλες όπως ζωικοί μύες που περιέχουν υψηλά ποσά υγρασίας θα πρέπει πρώτα να αφυδατωθούν με κατάψυξη (λυοφιλίωση), για να διατηρηθεί η δομή των πρωτεϊνών, πριν εκχυλιστούν τα λιπίδια με εξάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα. ^[40]

3.1.1.1 Παραλαβή Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων

Πρωτεϊνικά συμπυκνώματα από σπόρους μπορούν να προκύψουν με εκχύλιση του αλεύρου με 50-60% αλκοολικό διάλυμα (συνήθως αιθανόλη), καθώς πρωτεΐνες όπως προλαμίνες είναι διαλυτές σε αιθανόλη. Ακολουθείται από φυγοκέντρηση για να διαχωριστεί η διαλυτή ύλη (κυρίως σάκχαρα και γευστικές ή οσμηρές ουσίες) από το στερεό υπόλειμμα. Το εκχυλισμένο υπόλειμμα διαλυτοποιείται σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούν τους 50-55°C σε περιβάλλον αδρανούς αερίου ή υπό κενό προς απομάκρυνση της αλκοόλης και του νερού και διατήρηση της ποιότητας της πρωτεΐνης. Μετά τη διαλυτοποίηση, το υπόλειμμα ξηραίνεται ως πρωτεϊνικό συμπύκνωμα (τουλάχιστον 65% πρωτεϊνικό περιεχόμενο). Αυτή η διεργασία παράγει ένα ήπιο και κρεμώδες προϊόν πρωτεΐνης, κατάλληλο για ενσωμάτωση σε προϊόντα τροφίμων. Παρόλα αυτά, το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα που παράγεται με πλύση αλκοόλης έχει χαμηλότερη βιοχημική ποιότητα και μειωμένο δείκτη διαλυτότητας αζώτου σε σύγκριση με το παραγόμενο από πλύσιμο με οξινισμένο νερό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το διάλυμα αλκοόλης οδηγεί σε κάποιο βαθμό μετουσίωσης της φυσικής πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της διεργασίας πλύσης. ^{[40],[48]}

Ωστόσο, στόχος είναι η παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων, επομένως θα αναλυθεί εκτενέστερα στη συνέχεια. Ένα γενικό σχήμα παραγωγής πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και υπερσυμπυκνωμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1 που ακολουθεί.



Εικόνα 3.1: Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων από ελαιούχο σπόρο ^[48]

3.1.1.2 Τεχνολογία Απομόνωσης Πρωτεϊνών – Παραλαβή Πρωτεϊνικών Υπερσυμπυκνωμάτων

A. Εκχύλιση

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση και μπορούν να ρυθμιστούν κατά τη διάρκεια της διεργασίας είναι: εκχυλιστικό μέσο, θερμοκρασία, pH, ανάδευση, αναλογία στερεού /υγρού, κοκκομετρία του υλικού και χρόνος εκχύλισης. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά ετερογενή βιολογικά μακρομόρια, οι ιδιότητές τους μπορούν να επηρεαστούν σοβαρά από μικρές αλλαγές του pH και επομένως είναι απαραίτητο το περιβάλλον εκχύλισης να έχει σταθερό pH. Έχει παρατηρηθεί ότι μερικώς εξουδετερωμένα διαλύματα ασθενών οξέων ή ασθενών βάσεων, ανθίστανται σε αλλαγές του pH με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσης. ^{[40],[48]}

Η κοκκομετρία του στερεού υλικού πρέπει να είναι κατάλληλη ώστε να διευκολύνει τη διεργασία εκχύλισης και τον επακόλουθο διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η ανάδευση και ο χρόνος εκχύλισης πρέπει να επαρκούν, ώστε να μεγιστοποιούν την απόδοση εκχύλισης. Η ανάδευση

συγκεκριμένα δεν πρέπει να είναι πολύ ισχυρή, γιατί διασπά το υλικό σε μικρότερα σωματίδια, με προβλήματα στο μετέπειτα διαχωρισμό. Σχετικά με την αναλογία στερεού/υγρού, η επιλογή του αποτελεί έναν παράγοντα οικονομικής αριστοποίησης. Στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται λόγοι μεταξύ 1:10 με 1:20.

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση πρωτεϊνών είναι να εκχυλιστεί η πρώτη ύλη με κατάλληλο διαλύτη (συνήθως υδατικό), ώστε να παραχθεί ένα προϊόν εμπλουτισμένο με πρωτεΐνη. Η υδατική εκχύλιση ακολουθείται συχνά από φυγοκέντρηση, ώστε να διαχωριστούν οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες (υπερκείμενο) από τα αδιάλυτα υλικά (ίζημα). Επειδή η υδατική διάλυση συχνά εκχυλίζει και άλλα βιοπολυμερή πέραν των πρωτεϊνών, είναι απαραίτητο να υποβληθεί το υπερκείμενο υγρό σε περαιτέρω επεξεργασίες που θα αφαιρέσουν τις προσμίξεις.^[48]

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης μπορούν να προστεθούν αναστολείς πρωτεάσης για να αποφευχθεί ο σουλφυδρυλ-επαγόμενος πολυμερισμός των πρωτεϊνών. Μπορούν να προστεθούν και μεταλλικά χηλικά μέσα όπως αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), για να αποφευχθεί η οξειδωση των πρωτεϊνών από μεταλλικά ιόντα. Η απελευθέρωση και διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών από πηγές τροφίμων επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση μηχανικής διάσπασης (ομογενοποίηση, αναδευτήρες και υπέρηχοι). Μόλις εκχυλιστεί το πρωτεϊνικό διάλυμα, θα πρέπει να διατηρηθεί σε ψύξη (4°C) προς αποφυγή μετουσίωσης (αν απαιτείται η φυσική δομή για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης).^[40]

Υδατική εκχύλιση

Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, όπως αλβουμίνας, μπορούν να απομονωθούν με υδατική εκχύλιση του δείγματος. Η διαδικασία περιλαμβάνει ανάμιξη του δείγματος με απεσταγμένο νερό για ορισμένο χρονικό διάστημα (30 min-2 h), κατά προτίμηση στους 4°C για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση. Μερικές πρωτεΐνες όμως είναι διαλυτές σε υψηλότερες θερμοκρασίες (50-55°C) και απαιτούν ρύθμιση του pH σε τιμές 8-10 (με χρήση NaOH, Ca(OH)₂ ή NH₃). Αυτές οι συνθήκες δεν προκαλούν πρακτικά μετουσίωση των πρωτεϊνών, άρα ούτε μεταβολές στις λειτουργικές τους ιδιότητες. Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποβαθμιστούν σε υψηλότερο pH και υψηλές θερμοκρασίες ή μέσω αντιδράσεων Maillard με υδατάνθρακες.^{[40],[48]}

Εκχύλιση με άλατα

Για την εκχύλιση πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί και διάφορα διαλύματα αλάτων, όπως Na₂SO₃ και NaCl σε βαμβακόσπορο και σπόρο ηλίανθου, Na₂CO₃ και NaHCO₃ σε σπόρο ηλίανθου, CaCl₂, MgSO₄ και Na₂SO₄ σε βαμβακόσπορο.^[48]

Εκχύλιση με ρυθμιστικά διαλύματα

Όλες οι πρωτεΐνες έχουν ένα ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Οι πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές στο pI τους, επειδή δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές απωθήσεις μεταξύ τους. Δεδομένου ότι τα pI των πρωτεϊνών διαφέρουν, στην πρωταρχική κλασματοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ρυθμιστικό διάλυμα με pH που διαλυτοποιεί κυρίως την πρωτεΐνη στόχο, ενώ οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες μένουν στο υπόλειμμα. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο υγρό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπυκνωμένη πηγή για απομόνωση και καθαρισμό της πρωτεΐνης-στόχου.^[40]

B. Καταβύθιση

Με το πέρας της εκχύλισης, το υδατικό εκχύλισμα διαχωρίζεται από τα στερεά μέσω διήθησης ή φυγοκέντρησης ή συνδυασμού των δύο. Μετά τη φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση των αδιάλυτων υλικών, το υπερκείμενο υγρό μπορεί να διαλυθεί με απεσταγμένο νερό για να ελαχιστοποιηθούν τα υπολείμματα αλάτων και η μόλυνση αλατοδιαλυτών πρωτεϊνών (γλοβουλίνες).^{[40],[48]}

Οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες που περιέχονται στο εκχύλισμα μπορούν να απομονωθούν μέσω καθίζησης. Η καθίζηση επηρεάζεται από παράγοντες που μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών και πρέπει να ρυθμίζονται, ώστε να βελτιστοποιούν τη συνολική διεργασία απομόνωσης πρωτεϊνών. Για την καθίζηση των πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι παράγοντες όπως: οργανικοί διαλύτες, δισθενή κατιόντα, θερμότητα, οξέα/βάσεις (για τη ρύθμιση του pH), άλατα, μη ιονικά πολυμερή και πολυηλεκτρολύτες. Κατά τη διάρκεια της καθίζησης σχηματίζονται σωματίδια υποмикρού και ακολούθως συσσωματώνονται, όπου σχηματίζονται αδιάλυτα σωματίδια πρωτεΐνης σε φυσική ή εύκολα αναστρέψιμη μορφή.

Ισοηλεκτρική καταβύθιση

Οι περισσότερες πρωτεΐνες τροφίμων είναι αδιάλυτες στο pH τους επειδή δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές απωθήσεις μεταξύ τους και αυτό το φαινόμενο χρησιμοποιείται συχνά για το διαχωρισμό μίας πρωτεΐνης από ένα μίγμα. Για υγρά τρόφιμα όπως γάλα, οι κύριες πρωτεΐνες απομονώνονται με οξίνιση που ακολουθείται από εξουδετέρωση του υπερκείμενου υγρού. Μετά από φυγοκέντρηση ή διήθηση, το pH του εκχυλίσματος ρυθμίζεται στο pH των πρωτεϊνών (συνήθως με οξύ ποιότητας τροφίμου, όπως οξικό, υδροχλωρικό, φωσφορικό ή θειικό οξύ) που οδηγεί σε καθίζηση των πρωτεϊνών. Έτσι, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί το pH των πρωτεϊνών.

Μέσω της ισοηλεκτρικής καταβύθισης, προκύπτει ένα μη μετουσιωμένο πρωτεϊνικό προϊόν, υψηλής καθαρότητας. Η μάζα των καταβυθισμένων πρωτεϊνών χαρακτηρίζεται ως «πήγμα» (curd). Για το διαχωρισμό των καταβυθισμένων πρωτεϊνών από τον ορό (whey), πραγματοποιείται φυγοκέντρηση. Συχνά χρησιμοποιούνται φυγόκεντροι συνεχούς λειτουργίας εξοπλισμένες, ώστε να απομακρύνουν τη στερεή φάση που συσσωρεύεται (καταβυθισμένες πρωτεΐνες). Ακολουθεί έκπλυση των πρωτεϊνών από υπολείμματα στερεών του ορού, που πραγματοποιείται συνήθως με αναδιασπορά των πρωτεϊνών σε νερό και επακόλουθη φυγοκέντρηση.

Ακολουθεί ξήρανση με κατάψυξη ή με ψεκασμό οπότε λαμβάνεται το τελικό πρωτεϊνικό υπερσυμπύκνωμα (ισοηλεκτρική μορφή). Η ξήρανση με κατάψυξη προκαλεί τη μικρότερη καταπόνηση στις πρωτεΐνες, όμως η ξήρανση με ψεκασμό είναι προτιμότερη μέθοδος ως οικονομικότερη της ξήρανσης με κατάψυξη.

Απομόνωση με μεμβράνες

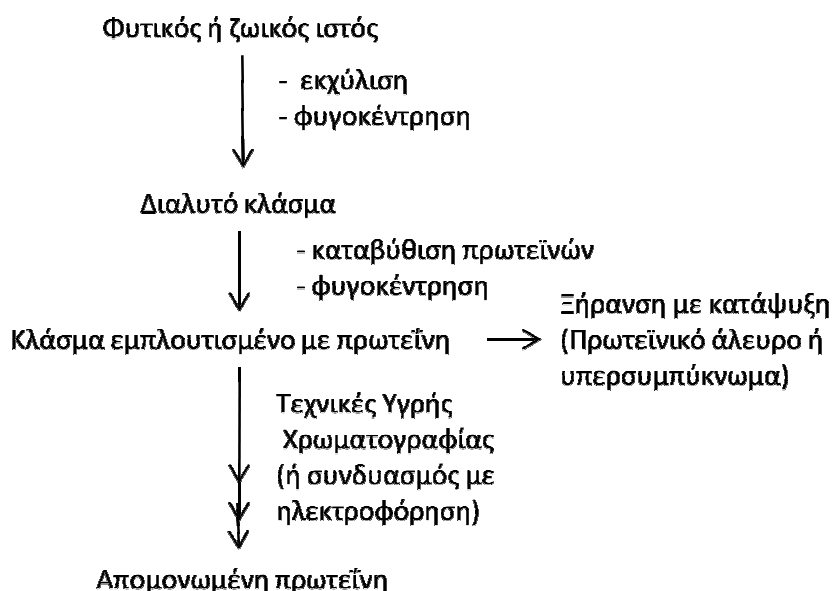
Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές παραγωγής πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων με μεμβράνες υπερδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης (Membrane Isolation Process –MIP). Μετά το διαχωρισμό των στερεών, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα οδηγείται σε μονάδα υπερδιήθησης

(10000-100000 MWCO), όπου διαχωρίζονται τα μικρότερα μόρια και οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με ανεπιθύμητες οσμηρές και γευστικές ουσίες. Το παρακράτημα της μεμβράνης οδηγείται απευθείας σε ξήρανση με ψεκασμό, ενώ το διήθημα συμπυκνώνεται περαιτέρω σε μονάδα αντίστροφης ώσμωσης, για την ανάκτηση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους και διαλυτών υδατανθράκων όπου το νερό ανακυκλώνεται στην εκχύλιση. Παραλλαγές της μεθόδου αυτής περιλαμβάνουν καταβύθιση των πρωτεϊνών από το παρακράτημα της υπερδιήθησης ή περαιτέρω συμπύκνωση του παρακρατήματος σε μονάδα αντίστροφης ώσμωσης. ^[48]

3.1.2 Κλασματοποίηση Πρωτεϊνών

Τα πρωτεϊνικά άλευρα και υπερσυμπυκνώματα μπορούν να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία, ώστε να απομονωθούν μεμονωμένα πρωτεϊνικά συστατικά. Κάθε διαδοχικό βήμα απομόνωσης καλείται κλασματοποίηση. Η κλασματοποίηση εξυπηρετεί δύο στόχους: απομάκρυνση μολυσματικού υλικού και εμπλουτισμός του κλάσματος που περιέχει την πρωτεΐνη-στόχο. Μόλις η πρωτεΐνη του τροφίμου εμπλουτιστεί, είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι μοναδικές λειτουργικές της ιδιότητες (ζελοποίηση, αφρισμός και άλλα) ως λειτουργία της σύστασης των αμινοξέων και της μοριακής διαμόρφωσης (δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές). Οι απομονωμένες πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων, που δίνει την πρωτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης. Τα δεδομένα πρωτοταγούς δομής είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των ποσοτικών σχέσεων δομής-δραστικότητας των πρωτεϊνών. Η απομόνωση επιβάλλεται επίσης για τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών με περίθλαση ακτίνων Χ.

Σχηματικά η διαδικασία κλασματοποίησης πρωτεϊνών φαίνεται στην εικόνα 3.2. ^[41]



Εικόνα 3.2: Επισκόπηση διεργασιών εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών ^[41]

Η απομόνωση μίας πρωτεΐνης είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα για τη μελέτη των μοριακών και βιολογικών ιδιοτήτων, ώστε να κατανοηθεί η βιολογική της λειτουργία. Υπάρχουν διάφορες ιδιότητες (όπως μοριακό βάρος, φορτίο, υδροφοβικότητα και άλλα) που μπορεί να

εκμεταλλευτεί ο αναλυτής, προκειμένου να απομονώσει μία πρωτεΐνη από ένα μίγμα. Βασιζόμενοι σε αυτές τις ιδιότητες, υπάρχουν διαθέσιμες διάφορες χρωματογραφικές και μη χρωματογραφικές διαδικασίες (ηλεκτροφορητικές, ζηματοποίηση, διήθηση μέσω μεμβράνης).

Κατά την απομόνωση μίας πρωτεΐνης, είναι πολύ σημαντικό να υιοθετούνται διαδικασίες που δεν προκαλούν μετουσίωση των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα της πρωτεΐνης-στόχου. Η επιλογή των μεθόδων απομόνωσης επηρεάζεται επίσης από παράγοντες όπως ανάλογα με την περαιτέρω χρήση της απομονωμένης πρωτεΐνης, την απαιτούμενη ποσότητα της απομονωμένης πρωτεΐνης και το κόστος της διαδικασίας απομόνωσης. Ένα βήμα απομόνωσης, που ίσως μετουσιώσει την απομονωμένη πρωτεΐνη, δεν είναι κατάλληλο για μελέτες των βιολογικών ιδιοτήτων της, αλλά ίσως είναι κατάλληλο για τον καθορισμό της πρωτοταγούς δομής της και άλλα. Επίσης, το κόστος της διαδικασίας μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για απομονώσεις σε μεγάλη κλίμακα. Στον πίνακα 3.1 φαίνονται διάφορες μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνών με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους.^[40]

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: Διάφορες τεχνικές απομόνωσης πρωτεϊνών^[40]

Τεχνική	Απαιτούμενη ιδιότητα	Παρατηρήσεις	Προτεινόμενη εφαρμογή
Διήθηση με μεμβράνες	Μοριακό μέγεθος	Κλασματοποίηση και συγκέντρωση. Απώλεια πρωτεΐνης από μη επιλεκτική προσρόφηση	Κατά την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης. Εν μέρει χρήσιμη για συγκέντρωση μεγάλων όγκων του μέσου καλλιέργειας
Φυγοκέντρηση	Μοριακό μέγεθος, σχήμα, πυκνότητα	Κοινώς χρησιμοποιούμενη για κυτταρική κλασματοποίηση	
Προπαρασκευαστική ισοηλεκτρική εστίαση	pI (ισοηλεκτρικό σημείο)	Οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται στο θάλαμο φυγοκέντρησης	
Προπαρασκευαστική ηλεκτροφόρηση	Φορτίο		
Αποκλεισμός μεγέθους	Μοριακό μέγεθος	Συνήθως χαμηλή διάλυση, παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος πρωτεϊνών	Στο τέλος της διαδικασίας απομόνωσης
Ιονοεναλλαγή	Φορτίο	Συνήθως υψηλή ικανότητα δέσμευσης πρωτεΐνης	Κατά την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης
Ανεστραμμένη φάση	Υδροφοβικότητα	Η διάλυση εξαρτάται από το μέγεθος της πηκτής, ενώ χρησιμοποιείται κοινώς για διαχωρισμό πεπτιδίων	Χρησιμοποιούμενη για διαχωρισμό πεπτιδίων, αφομοιωμένες καθαρισμένες πρωτεΐνες και άλλες εφαρμογές όπου δεν αποτελεί ζήτημα η απώλεια της βιολογικής ενεργότητας της πρωτεΐνης
Υδροφοβική	Υδροφοβικότητα		Μετά την κλασματοποίηση θειικού αμμωνίου, αλλά πριν τη χρωματογραφία ιονοεναλλαγής
Υδροξυαπατίτης	Φορτίο		
Χρωματογραφία συγγένειας	Δέσμευση προσδέματος	Συνήθως επιλεκτικός διαχωρισμός, περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα του ακινητοποιημένου προσδέματος	Κατά την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης
Ομοιοπολική	Ομάδες θειόλης	Περιορίζεται σε πρωτεΐνες περιεχόμενες σε θειόλη	Για πρωτεΐνες που περιέχουν θειόλη
Χρωματοεστίαση	Φορτίο, pI		Χρήσιμη για το διαχωρισμό ισομορφών από στενά απέχοντα pI. Χρησιμοποιείται μετά τη χρωματογραφία τάσης

3.1.3 Ειδική Τεχνολογία Απομόνωσης Πρωτεϊνών από Μανιτάρια

Για την εκχύλιση πρωτεϊνών από μανιτάρια προτείνονται διάφοροι τρόποι από τη βιβλιογραφία, ενώ δεν υπάρχει μία κλασική μέθοδος όπως για τους σπόρους σόγιας. Θα γίνει επομένως μία επισκόπηση των προτεινόμενων διαδικασιών απομόνωσης πρωτεϊνών από μανιτάρια.

Η πρώτη ύλη, τα φρέσκα μανιτάρια δηλαδή, πλένονται, τεμαχίζονται και ξηραίνονται κατά προτίμηση με κατάψυξη ή με αέρα για 48-72 h. Μετά την ξήρανση αλέθονται και φυλάσσονται σε αεροστεγείς συσκευασίες σε ξηρές και σκοτεινές συνθήκες μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Υπάρχουν ωστόσο και αναφορές εκχύλισης πρωτεϊνών κατευθείαν από την πρώτη ύλη, το φρέσκο μανιτάρι δηλαδή, αφού τεμαχιστεί ή πολτοποιηθεί και ομογενοποιηθεί. Το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας, αναφέρει την εκχύλιση με χρήση αλάτων, συγκεκριμένα θειικού αμμωνίου, ως προτιμητέο τρόπο εκχύλισης πρωτεϊνών από μανιτάρια, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Επίσης, όπως θα φανεί και ακολούθως, η βιβλιογραφία εστιάζει στην απομόνωση συγκεκριμένου πρωτεϊνικού κλάσματος, μέσω χρωματογραφίας, αντί απομόνωσης του συνόλου των πρωτεϊνών που περιέχονται στα μανιτάρια.^{[42],[43]}

Διεργασία ψυχρής εκχύλισης

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη ξηρό αλεσμένο μανιτάρι *Agaricus bisporus*, 5 g του οποίου αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) 10 mM, pH 7.4 που περιέχει 150 mM χλωριούχο νάτριο. Το αιώρημα διατηρείται σε επωαστήρα με αναδευτήρα στους 4°C για 12 h και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 1000xg, στους 4°C για 30 min. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται ως εκχύλισμα της ακατέργαστης πρωτεΐνης, καθιζάνει με διεργασία εξαλάτωσης (salting out) με θειικό αμμώνιο σε κορεσμό 60% και διαλυτοποιείται πάλι στο ίδιο PBS δύο φορές για να απομακρυνθεί το άλας.^[42]

Οι Tehrani et al. χρησιμοποίησαν 100 g νωπού *A. Bisporus*, πλυμένου, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 50 mM, pH 7.3 (που περιέχει 1.5% PVP, 1% βιταμίνη C, 0.15 M NaCl) με ανάδευση 2-3 hr. Μετά την ομογενοποίηση, το μίγμα διέρχεται μέσα από διηθητικό ύφασμα και φυγοκεντρείται (4500 rpm, 30 min). Το υπερκείμενο υγρό υφίσταται κορεσμό 70% με θειικό αμμώνιο ή προστίθεται σε αυτό ψυχρή ακετόνη (80% v/v) και παραμένει για 12 h σε ψύξη (4°C). Το πρωτεϊνικό ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε 4000xg για 20 min και φυλάσσεται σε κατάψυξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Ακολουθεί ανάλυση με χρωματογραφία στήλης με φασματόμετρο UV (280nm), ρυθμισμένη με το ίδιο ρυθμιστικό (Tris, pH 7.3), με σταθερό ρυθμό ροής από όπου προκύπτουν τρία πρωτεϊνικά κλάσματα, τα οποία φυγοκεντρώνονται στις ίδιες συνθήκες μετά από προσθήκη ψυχρής ακετόνης ή θειικού αμμωνίου (70%) και συλλέγονται. Ο καθαρισμός των κλασμάτων μπορεί να συνεχιστεί με χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής.^[43]

Εκχύλιση με υπέρηχους

Η μηχανική επίδραση των υπερήχων θεωρείται ότι επιταχύνει την εκχύλιση συστατικών από μανιτάρια λόγω της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος και επαυξάνει τη μεταφορά μάζας του κυτταρικού περιεχομένου.

Η υποβοηθούμενη με υπέρηχους εκχύλιση πρωτεϊνών από ξηρό *A. bisporus* πραγματοποιείται με συσκευή υπερήχων, σύμφωνα με τους Kavitha R. et al.. Εκχυλίζονται 5 g ξηρού μανιταριού με ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε pH 7.4 μέσα σε δοχείο που βρίσκεται στη συσκευή υπερήχων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (10, 20, 30 min) με ομοιόμορφη ισχύ υπερήχων σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από διήθηση για να απομακρυνθούν κλάσματα προσμίξεων, το διήθημα χρησιμοποιείται για καθίζηση των πρωτεϊνών με διεργασία εξαλάτωσης.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στη συνέχεια, διαλυτοποιείται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS, σε pH 7.4 και φορτώνεται σε στήλη χρωματογραφίας (Biogel P30) που προηγουμένως έχει ρυθμιστεί με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η στήλη πλένεται με το ίδιο ρυθμιστικό και τα εκλούσματα συλλέγονται σε όγκους 3 mL/h με σταθερό ρυθμό.

Η ανάλυση της απομονωμένης πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συνεχή τάση για 4 h. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή χρωματίζεται με ειδική ουσία (Coomassive Brilliant Glue G 20) και αποχρωματίζεται με διάλυμα αποχρωματισμού. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών δειγμάτων προσδιορίζονται με σύγκριση με πρωτεΐνες-δείκτες μοριακού βάρους.^[42]

3.2 ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι υδατάνθρακες είναι οι πλέον διαδεδομένες οργανικές ενώσεις στη Γη. Αποτελούν ένα από τα βασικά θρεπτικά συστατικά, συμμετέχουν στο μεταβολισμό φυτών και ζώων και είναι η πιο σημαντική πηγή ενέργειας. Ο όρος υδατάνθρακες παραπέμπει στην εποχή που οι υδατάνθρακες θεωρούνταν υδρίτες του άνθρακα, βάσει του εμπειρικού τύπου, π.χ. της γλυκόζης, $C_6H_{12}O_6$ ($6C+6H_2O$). Αργότερα, αναγνωρίστηκαν πολλές ενώσεις που απέκλιναν από το γενικό τύπο, αλλά διατηρούσαν κοινές αντιδράσεις και έτσι ταξινομήθηκαν ως υδατάνθρακες. Από χημική άποψη είναι αλδεϋδικά ή κετονικά παράγωγα πολυσθενών αλκοολών ή προϊόντα συμπύκνωσης αυτών. Οι υδατάνθρακες διακρίνονται σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

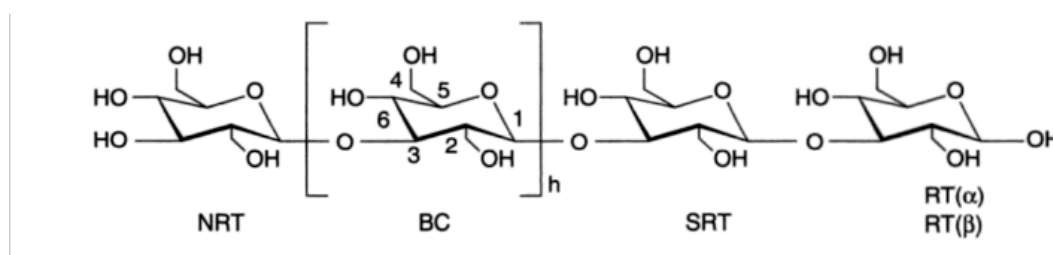
Οι πολυσακχαρίτες εκπληρώνουν ρόλους όπως:

- Σκελετικές ουσίες σχηματισμού δομής (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη στα φυτά, χιτίνη, βλενοπολυσακχαρίτες στα ζώα).
- Αποθηκευτικές ουσίες αφομοίωσης (άμυλο, δεξτρίνες, ινουλίνη στα φυτά, γλυκογόνο στα ζώα).
- Ουσίες δέσμευσης νερού (άγαρ, πηκτίνη και άλατα αλγινικού οξέος στα φυτά, βλενοπολυσακχαρίτες στα ζώα).^[39]

Σχετίζονται με τη γλυκιά γεύση (για αυτό και ο όρος σάκχαρα), αν και μερικοί δεν διαθέτουν αυτή την ιδιότητα. Η καραμελλοποίησή τους συνεισφέρει στη γεύση και το άρωμα θερμικά κατεργασμένων προϊόντων. Συνεισφέρουν στην παραγωγή σκούρου καστανού χρώματος κατά την καραμελοποίηση και δεξτρίνοποίηση των σακχάρων, ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα πυκνά διαλύματα υδατανθράκων χαρακτηρίζονται από υψηλά ιξώδη και έτσι συνεισφέρουν στη βελτίωση της υφής τροφίμων (αύξηση ιξώδους, πάχυνση, προσκολλησιμότητα και άλλα).

Ακόμα, αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά, όπως μέταλλα, πρωτεΐνες και λιπαρά, συνεισφέρουν στην υφή αλλά και προσφέρουν κρουπροστατευτικό ρόλο σε κατεψυγμένα προϊόντα. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες έχουν βρει εφαρμογή ως μιμητικά λιπαρά ή υποκατάστατα λιπαρών, λόγω της σχετικής υφής που προσφέρουν στα τρόφιμα.^[45]

Οι γλυκάνες είναι γραμμικά πολυμερή της γλυκόζης που αποτελούνται από μία αλυσίδα (BC) που περιέχει επαναλαμβανόμενες μονάδες γραμμικής (1→3)-β-D-συνδεδεμένης ανυδρογλυκόζης (AGRUs) ενωμένων με γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ των θέσεων 1 και 3. Το 70% των δεσμών είναι β-1,4 και το υπόλοιπο β-1,3. Το πολυμερές γλυκάνης έχει ένα αναγωγικό (RT) και ένα μη αναγωγικό άκρο (NRT). Το αναγωγικό άκρο μπορεί να υπάρχει σε α ή β ανωμερή. Ως SRT σημειώνεται το δεύτερο AGRU από το αναγωγικό άκρο (εικόνα 3.3). Κάποιες γλυκάνες, όχι όλες όμως, παρουσιάζουν AGRUs σε πλαϊνές αλυσίδες που διακλαδίζονται αποκλειστικά από τη θέση 6 του AGRU σκελετού.



Εικόνα 3.3: Πολυμερή γλυκάνης^[44]

Οι γλυκάνες είναι βασικά υδατανθρακικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Η βιβλιογραφία είναι πολύ εκτεταμένη γύρω από τις επιδράσεις των γλυκανών σε ποικίλα βιολογικά συστήματα και τα αποτελέσματα είναι ακόμη και αντιφατικά, γεγονός που πιθανώς οφείλεται σε διαφορές των παρασκευασμάτων γλυκάνης που μελετώνται. Η γενική αντίληψη πάντως είναι ότι οι β-γλυκάνες ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και καταπολεμούν με έμμεσο τρόπο ιούς, βακτήρια και ασθένειες όπως ο καρκίνος.^[44]

3.2.1 Τεχνολογία Παραλαβής Υδατανθρακικών Προϊόντων

Η ικανότητα εκχύλισης των πολυσακχαριτών εξαρτάται από την προκατεργασία του υλικού (θέρμανση και ξήρανση), παρουσία ενζύμων, παραμέτρους εκχύλισης (τύπος, pH και ιοντική ισχύς του διαλύτη, θερμοκρασία, διάρκεια εκχύλισης και αναλογία υγρού-στερεού), αλλά και την κοκκομετρία του υλικού. Με αλλαγές αυτών των παραμέτρων αναμένονται σημαντικές διαφορές στην απόδοση εκχύλισης. Γενικώς, μείωση της κοκκομετρίας του υλικού και αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνουν την απόδοση εκχύλισης.

Η καθαρότητα των παρασκευασμάτων β-γλυκανών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση της πρώτης ύλης (περιεχόμενο β-γλυκανών και συστατικών μόλυνσης), τους διαλύτες και τις συνθήκες που εφαρμόζονται (pH, θερμοκρασίες, χρόνος και αριθμός εκχυλίσεων) και τις κατεργασίες που εφαρμόζονται για την απομόνωση και τον καθαρισμό.^[46]

Είναι ιδανικό η πρώτη ύλη να βρίσκεται σε αφυδατωμένη μορφή, που σημαίνει ότι θα πρέπει να έχει προηγηθεί ξήρανση με κατάψυξη ή ψεκασμό. Ακολουθεί άλεση και κοσκίνιση του

αφυδατωμένου υλικού, ώστε να προκύψει η κατάλληλη κοκκομετρία (100 mesh). Όταν το χρησιμοποιούμε υλικό έχει υψηλή περιεκτικότητα σε έλαιο ή μη πολικά υλικά, απαιτείται εκχύλιση με μίγμα 95:5 χλωροφορμίου-μεθανόλης (π.χ. σε συσκευή τύπου Soxhlet), ώστε να προκύψει το απειαιωμένο άλευρο του υλικού. Για τον ίδιο σκοπό έχει χρησιμοποιηθεί και εξάνιο που πλεονεκτεί έναντι του χλωροφορμίου, λόγω της μεγαλύτερης σχετικής ασφάλειάς του.^[49]

Στο σημείο αυτό, θα γίνει αναφορά στις διάφορες μεθόδους εκχύλισης, απομόνωσης και καθαρισμού των β-γλυκανών. Στην προσπάθεια μεγιστοποίησης της απόδοσης και του ιξώδους του εκχυλίσματος, υπάρχει ποικιλία διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση απομόνωσης β-γλυκανών και παραλαβής υδατανθρακικών προϊόντων, δεν υπάρχει μία κλασική μέθοδος όπως ισχύει στην παραλαβή πρωτεϊνικών προϊόντων.^[46]

Εκχύλιση

Οι υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης διαλυτών ινών επιτυγχάνονται σε υψηλές θερμοκρασίες και οι χαμηλότερες με όξινα ρυθμιστικά μέσα. Συνήθως, η εκχύλιση υπό ήπιες, υδατικές συνθήκες δεν είναι αποτελεσματική, με χρήση όμως υψηλότερης θερμοκρασίας και αλκαλικού διαλύτη αντί για νερό, αυξάνεται το ποσό των εκχυλιζόμενων γλυκανών. Κλασικά, το αφυδατωμένο και απειαιωμένο υλικό εκχυλίζεται με θερμή 80-90% αιθανόλη, ώστε να εκχυλιστούν σάκχαρα χαμηλού μοριακού βάρους, ανόργανα στοιχεία, χρωστικές, οργανικά οξέα, ελεύθερα αμινοξέα και πεπτιδία χαμηλού μοριακού βάρους. Αυτό το βήμα απενεργοποιεί επιπλέον οποιαδήποτε ένζυμα υπάρχουν ενδεχομένως στο υλικό, όπως ενδογενή ένζυμα που οδηγούν σε μειωμένο μοριακό μέγεθος της εκχυλιζόμενης β-γλυκάνης.^{[46],[49]}

Η εξάρτηση αυτή από τη θερμοκρασία ή την ιοντική ισχύ ίσως εξηγείται υπό όρους διαφορών στην αναλογία β-(1→3) και β-(1→4) δεσμών στις πολυμερικές αλυσίδες, την ακολουθία δεσμών στην αλυσίδα ή το βαθμό πολυμερισμού, που θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση φυσικών ενδομοριακών δεσμών. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει σταθερή βάση στην ικανότητα εκχύλισης και τη διαλυτότητα των β-γλυκανών. Οι διαφορές που προκύπτουν ίσως οφείλονται στην ποικιλία του πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι β-γλυκάνες από κυτταρικά τοιχώματα μεγαλύτερου πάχους παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην εκχύλιση.

Όπως έχει αναφερθεί, οι β-γλυκάνες συνήθως εκχυλίζονται με θερμό νερό (>65°C) ή διαλύματα καυστικού νατρίου ή υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες με διάλυμα ανθρακικού νατρίου ή σε όξινες συνθήκες. Σε πολλές πρώιμες μελέτες, οι β-γλυκάνες από βρώμη και κριθάρι εκχυλίζονταν με νερό σε θερμοκρασίες κάτω από το σημείο ζελατινοποίησης του αμύλου (47-52°C) για να ελαχιστοποιείται η διαλυτοποίηση του αμύλου. Στις περισσότερες μελέτες, η εκχύλιση των β-γλυκανών πραγματοποιείται ταυτοχρόνως ή ακολουθείται από διεργασία καθαρισμού (επάωση) με αμυλολυτικά ένζυμα για απομάκρυνση του αμύλου. Αποφεύγονται οι μικροβιακές αμυλάσες που συχνά περιέχουν υδρολάσες β-γλυκάνης, εκτός αν αποδειχτεί πρώτα ότι δεν περιέχουν αυτά τα ένζυμα ή ότι είναι θερμοσταθερές και μπορούν να προθερμανθούν για να ελαχιστοποιηθεί κάθε μολυσματική ενεργότητα β-γλυκανασών.

Επιπλέον, η εκχύλιση υπό αλκαλικές συνθήκες οδηγεί σε αυξημένη ποσότητα εκχυλισμένων γλυκανών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και απεσταγμένο νερό ρυθμισμένο σε pH 10 με 20% ανθρακικό νάτριο στους 45°C. Η εκχύλιση με NaOH αυξάνει το ποσοστό εκχυλιζόμενων β-

γλυκανών, με μικρότερο όμως μοριακό βάρος. Σε εκχύλιση σιταριού, τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των αραβοξυλανών και β-γλυκανών με αύξηση της συγκέντρωσης του NaOH (0.1, 0.5, 1.0 M) και της θερμοκρασίας (25, 60°C). Η εκχύλιση στους 60°C προκαλεί υποβάθμιση των πολυσακχαριτών σε όλες τις συγκεντρώσεις NaOH, ενώ δεν εμφανίζεται καθόλου υποβάθμιση σε θερμοκρασία δωματίου. Προκειμένου να αποφευχθεί η αλκαλική υποβάθμιση των πολυσακχαριτών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδρίδιο βορίου νατρίου (NaBH₄), με μειωμένη εκχύλιση β-γλυκανών στους 23°C, μπορεί όμως να προσεγγίσει το 100% στους 65°C με NaOH-NaBH₄.^[46]

Απομόνωση και καθαρισμός πολυσακχαριτών

Με το πέρας της εκχύλισης, ακολουθεί κατεργασία απομάκρυνσης των πρωτεϊνών. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από το υλικό των πολυσακχαριτών, όπως: κατεργασία με χλωροφόρμιο και 1-βουτανόλη ή 1-πεντανόλη και τριφθορο-τριχλωροαιθάνιο, αλλά ο ευκολότερος τρόπος είναι η κατεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα (προνάση ή παπαΐνη).

Το εκχύλισμα πολυσακχαριτών υπόκειται σε καταβύθιση με αιθανόλη ή ισοπροπυλική αλκοόλη (IPA). Οποιοδήποτε υπόλειμμα αμύλου μπορεί να απομακρυνθεί σε αυτό το σημείο. Αυτό συνήθως πραγματοποιείται με επώαση με α-αμυλάση ή αμυλογλυκοσιδάση και ακολουθείται από φυγοκέντρηση. Το προκύπτον ίζημα αποτελείται από αδιάλυτα υλικά, πιθανώς κυτταρίνες και ημικυτταρίνες.

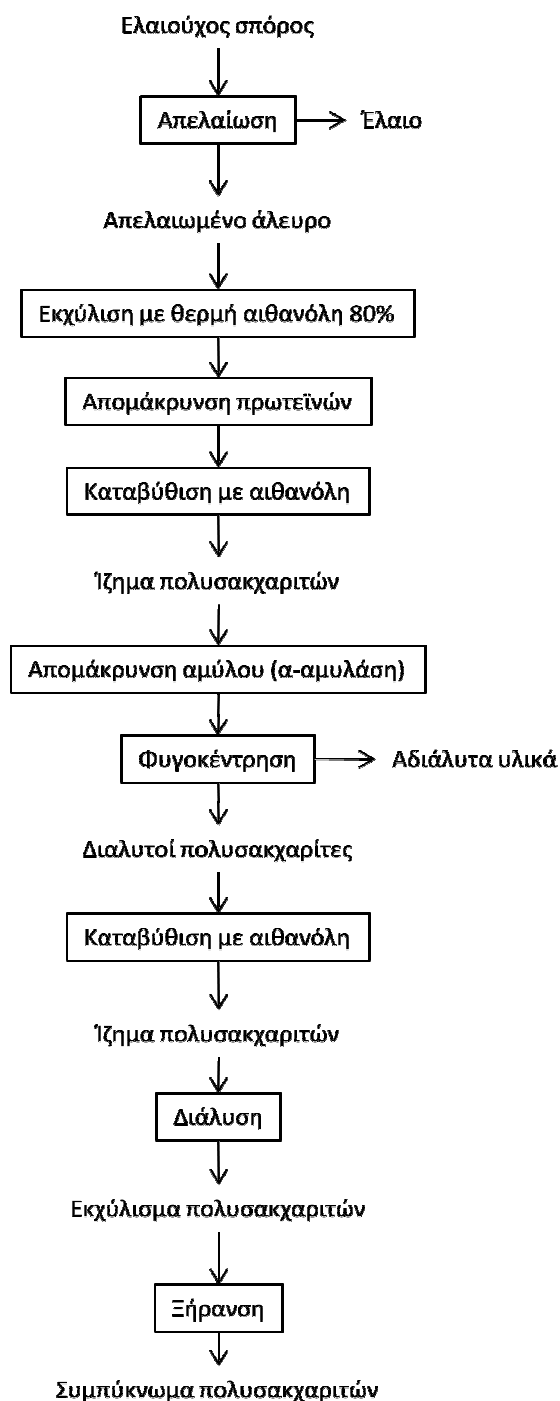
Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν το υπερκείμενο υγρό (που περιέχει υδρολυμένο άμυλο) και διαχωρίζεται με καταβύθιση με αιθανόλη ή IPA. Το ίζημα πολυσακχαριτών διαλύεται σε απεσταγμένο νερό στους 4°C για 24 h. Σε αυτό το σημείο χρησιμοποιούνται μεμβράνες διαπίδυσης (απομόνωσης μοριακού βάρους 12000-14000) που περιέχουν το υλικό και είναι βυθισμένες σε απιονισμένο νερό. Το υγρό υποβάλλεται σε αργή ανάδευση. Το νερό θα πρέπει να αλλάχθει 4-5 φορές μέσα σε διάστημα 24 h. Αν δεν είναι δυνατή η διάλυση σε 4°C, προστίθεται αζίδιο του νατρίου, προκειμένου να μην σημειωθεί μικροβιακή ανάπτυξη και η τελική αλλαγή νερού θα πρέπει να γίνει με νερό ελεύθερο αζιδίου. Οι πολυσακχαρίτες στη συνέχεια ξηραίνονται με κατάψυξη, με αποτέλεσμα την παραλαβή συμπυκνώματος πολυσακχαριτών. Η ολοκληρωμένη διεργασία εκχύλισης και απομόνωσης πολυσακχαριτών φαίνεται στην εικόνα 3.4.^[49]

Σημειώνεται ότι ο όρος «συμπύκνωμα» πολυσακχαριτών ή γλυκανών ή υδατανθρακικό συμπύκνωμα δανείζεται από τη διεργασία εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών (από την οποία προκύπτουν πρωτεϊνικά συμπυκνώματα) και δεν αποτελεί την επίσημη ονομασία του προϊόντος που προκύπτει από την εκχύλιση και απομόνωση πολυσακχαριτών.

Η πιο κοινή κατεργασία που χρησιμοποιείται για καθαρισμό των β-γλυκανών από αραβινοξυλάνες είναι καταβύθιση με 20-40% κορεσμένο θειικό αμμώνιο. Χρησιμοποιείται όμως και η διαδικασία καθίζησης με 50% ισοπροπανόλη για καθαρισμό των β-γλυκανών από πεντοζάνες.

Η απομόνωση και καθαρισμός β-γλυκανών από πρώτη ύλη με χαμηλό περιεχόμενο β-γλυκανών και η αλληλεπίδρασή τους με άλλους πολυσακχαρίτες κυτταρικών τοιχωμάτων, προκαλεί

επιπλέον δυσκολίες. Σε αυτή την περίπτωση προτείνεται επώαση με κατάλληλη ουσία (όπως Termamyl), αλκαλική εκχύλιση και ενζυμική επώαση του εκχυλίσματος με β-D-ξυλανάση (για απομάκρυνση των αραβινοξυλανών). Οι ολιγοσακχαρίτες απομακρύνονται με εξαντλητική διάλυση ακολουθούμενη από συμπύκνωση, καθίζηση με αιθανόλη και ξήρανση σε αέρα του ιζηματοποιημένου κόμματος, μετά από κατεργασία ανταλλαγής διαλύτη για βελτίωση της διαλυτότητας σε νερό. Αν γίνει ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος στο 4.75 πριν την κατεργασία με ξυλανάση (βέλτιστο pH για τη δράση του ενζύμου), προκαλείται απομάκρυνση μερικών πρωτεϊνών.^[46]



Εικόνα 3.4: Παραλαβή συμπυκνωμάτων πολυσακχαριτών από ελαιούχο σπόρο^[49]

Ένα ακόμη βήμα που έχει προταθεί για τον καθαρισμό των β-γλυκανών σιταριού είναι η παρασκευή υδατικού συμπυκνωμένου διαλύματος του κόμμεος σιταριού και η αποθήκευσή του στους 25°C μέχρι να σχηματιστεί ίζημα πηκτής. Η απόρριψη του υπερκείμενου υγρού οδηγεί σε μία φάση με καθαρισμένη πηκτή β-γλυκάνης ελεύθερη από άλλες προσμίξεις (αραβινοξυλάνες, υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες). Το ίζημα πηκτής επαναδιαλύεται με νερό στους 80°C και η διεργασία απομόνωσης ακολουθείται από καθίζηση του πολυσακχαρίτη με αιθανόλη, κατεργασία ανταλλαγής διαλύτη και ξήρανση με αέρα.

Μία εναλλακτική διεργασία δύο βημάτων προς αποφυγή οργανικών διαλυτών, περιλαμβάνει εκχύλιση με θερμό νερό (>55°C), ακολουθούμενη από ψύξη-απόψυξη (freeze-thaw) του εκχυλίσματος, διήθηση του σχηματιζόμενου ζελατινώδους ή ινώδους ιζήματος, ξήρανση με αέρα, επαναδιάλυση με νερό στους 80°C και επανάληψη του βήματος ψύξης απόψυξης.^[46]

3.2.2 Ειδική Τεχνολογία Απομόνωσης Πολυσακχαριτών από Μανιτάρια

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης περιλαμβάνουν νερό σε θερμοκρασία δωματίου, νερό υπό βρασμό ή ακόμα και υδατικά διαλύματα NaOH ή KOH (2% v/v). Μόλις το υπόλειμμα διαχωριστεί με φυγοκέντρηση, οι πολυσακχαρίτες καταβυθίζονται με αιθανόλη σε αναλογία 2:1 (v/v). Εάν το νερό ή τα βασικά διαλύματα δεν είναι αρκετά ισχυρά για το διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και όξινες συνθήκες (με χρήση οξικού, μυρμηκικού, υδροχλωρικού ή φωσφορικού οξέος).

Οι μέθοδοι αυτές όμως χρησιμοποιούν πολύ μεγάλες ποσότητες τοξικών οργανικών διαλυτών, που έχουν χαμηλή επιλεκτικότητα και χαμηλές αποδόσεις εκχύλισης. Επίσης απαιτούν μεγάλο χρόνο εκχύλισης, εντατική θέρμανση, φως και οξυγόνο που ίσως υποβοηθούν τη δράση ενζύμων υποβάθμισης των γλυκανών. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, μπορεί να χαθούν διάφορες βιοενεργές ουσίες μέσω ιονισμού, υδρόλυσης και οξειδωσης. Ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες τεχνικές απομόνωσης πολυσακχαριτών από μανιτάρια, όπως εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (PLE), εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους ή μικροκύματα. Στον πίνακα 3.2 αναφέρονται οι κύριες μέθοδοι εκχύλισης πολυσακχαριτών από μανιτάρια.

Η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (Pressurized Liquid Extraction - PLE) είναι μία νέα τεχνική που παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη συμβατική εκχύλιση. Η PLE είναι περιβαλλοντικά φιλική λόγω των χαμηλών ποσοτήτων διαλυτών που χρησιμοποιεί, κυρίως νερού, διαρκεί μικρότερο χρονικό διάστημα, μπορεί να αυτοματοποιηθεί και περιλαμβάνει τη διατήρηση του δείγματος σε ένα περιβάλλον ελεύθερο από οξυγόνο και φως. Η βέλτιστη συνθήκη για την απομόνωση α-(1→4) και β-(1→6) γλυκανών από *Lentinula edodes* ήταν 10.1 MPa για 70 min.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: Τεχνικές και συνθήκες λειτουργίας εκχύλισης πολυσακχαριτών από μανιτάρια ^[47]

Τεχνική Εκχύλισης	Συνθήκες Λειτουργίας	Μανιτάρι
Πεπιεσμένου υγρού	10.1 MPa, 28°C, 70 min	<i>Lentinula edodes</i>
Υπερκρίσιμου ρευστού	35 MPa, 10 kg/h CO ₂ (ρυθμός ροής), 25°C, 4 h	<i>Ganoderma lucidum</i>
Υποβοηθούμενη από υπέρηχους	Ισχύς υπερήχων 230 W, 70°C, 62 min, αναλογία νερού-υλικού 30 mL/g	<i>Agaricus bisporus</i>
Υποβοηθούμενη από μικροκύματα	Ισχύς μικροκυμάτων 400 W, 74.64°C, 29.37 min, αναλογία νερού-υλικού 32.7:1	<i>Agaricus blazei</i>
Μικροκύματα σε συνδυασμό με υπέρηχους	Ισχύς υπερήχων 50 W, Ισχύς μικροκυμάτων 284W, 701 s, αναλογία νερού-υλικού 11.6:1	<i>Ganoderma lucidum</i>

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction – SFE) παρέχει καλή τεχνική απομόνωσης πολυσακχαριτών καθώς χρησιμοποιεί CO₂ ως διαλύτη εκχύλισης λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων του. Το CO₂ είναι περιβαλλοντικά φιλικό, έχει σχετικά υψηλή πυκνότητα, σχεδόν όπως ένα υγρό, χαμηλό ιξώδες και υψηλή διαχυτικότητα. Αυτός ο διαλύτης είναι αποτελεσματικός τόσο για τη διάλυση υλικών όσο και για τη διεύθυνση σε στερεές μήτρες. Κατά τη διάρκεια εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SC-CO₂), η θερμοκρασία είναι σχετικά χαμηλή, ενώ αποκλείονται οργανικοί διαλύτες. Με αυτό τον τρόπο, αποφεύγεται η αποσύνθεση των βιοδραστικών συστατικών. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της δυναμικής διεργασίας, ρέει συνεχώς νέο υπερκρίσιμο CO₂ μέσα από το υλικό και η μεταφορά μάζας είναι εντατική, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ικανοποιητική απόδοση.

Η υποβοηθούμενη από υπέρηχους εκχύλιση (Ultrasonic Assisted Extraction - UAE) είναι ταχεία, οικονομική και αποτελεσματική εναλλακτική αντί των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης και σε μερικές περιπτώσεις αντί της μεθόδου υπερκρίσιμου ρευστού, αλλά και της υποβοηθούμενης εκχύλισης από μικροκύματα. Οι βέλτιστες συνθήκες είναι: ισχύς υπερήχων 350 W ή 230 W, αναλογία υγρού-δείγματος 5 ή 30 mL/g και 35 min ή 62 min ο χρόνος εκχύλισης στους 90°C ή 70°C για μαύρα μανιτάρια και μανιτάρια *Agaricus bisporus* αντίστοιχα.

Μία ακόμη εναλλακτική των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction - MAE). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για την απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων καθώς χρησιμοποιεί μικρότερες ποσότητες διαλυτών και παρέχει ταχύτατη προετοιμασία του δείγματος.

Τα μικροκύματα μπορούν να συνδυαστούν με άλλες τεχνικές, όπως υπέρηχοι για μείωση του χρόνου εκχύλισης, αύξηση της αποτελεσματικότητας και εξοικονόμηση ενέργειας. Τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η συνδυασμένη εκχύλιση υπερήχων-μικροκυμάτων (UMAE) πολυσακχαριτών έχει μεγάλη δυναμικότητα και αποτελεσματικότητα συγκρινόμενη με τη συμβατική εκχύλιση με θερμό νερό. ^[47]

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση πέντε ειδών εδώδιμων μανιταριών ως προς τα βασικότερα θρεπτικά και βιοδραστικά τους συστατικά, ειδικότερα τις πρωτεΐνες, τις γλυκάνες και το έλαιο. Τα μανιτάρια που αξιολογούνται είναι τα εξής: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* και δύο ποικιλίες τρούφας: *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*. Η επιλογή των εν λόγω μανιταριών βασίζεται τόσο στη διαθεσιμότητά τους όσο και στην υψηλή τους θρεπτικότητα. Λόγω λοιπόν της θρεπτικότητας αλλά και της δράσης τους ενάντια σε πολυάριθμες χρόνιες ασθένειες, επιχειρείται η απομόνωση των πρωτεϊνών και γλυκανών τους για την παραλαβή κλασμάτων εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες και β-γλυκάνες. Για την απομόνωση πρωτεϊνικών κλασμάτων, ακολουθείται η κλασική μέθοδος παραλαβής πρωτεϊνών με υδατική εκχύλιση και καταβύθιση των πρωτεϊνών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή πρωτεϊνών από ελαιούχους σπόρους, επομένως θα αξιολογηθεί ως προς την αποτελεσματικότητά της σε υποστρώματα μανιταριών. Για την απομόνωση υδατανθρακικών κλασμάτων και συγκεκριμένα των β-γλυκανών, διερευνούνται δύο σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης: με υπέρηχους και μικροκύματα αντί της κλασικής εκχύλισης με θερμό νερό. Τα συμπυκνώματα που προκύπτουν, είτε πρωτεϊνικά είτε συμπυκνώματα γλυκανών, αξιολογούνται και προσδιορίζεται η επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως είδους μανιταριού και χρόνου εκχύλισης στην καθαρότητα των συμπυκνωμάτων και απόδοση παραλαβής τους. Τέλος, τα είδη μανιταριών αξιολογούνται και ως προς την περιεκτικότητά τους σε έλαιο.

4.2 ΥΛΙΚΑ – ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

4.2.1 Πρώτες Ύλες

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτες ύλες στερεά (ξηρά αλεσμένα) μανιτάρια των ποικιλιών *Ganoderma Lucidum*, *Grifola Frondosa* (Maitake) που προμηθεύτηκαν από το κατάστημα υπερτροφών «ΔΗΜΗΤΡΑΣ ΓΑΙΑ» (Νέα Φιλαδέλφεια, Αθήνα), καθώς και νωπά μανιτάρια *Lentinula Edodes* από τη βιομηχανία «Μανιτάρια ΔΙΡΦΥΣ» (Πισσώνα, Εύβοια), τα οποία στη συνέχεια καταψύχθηκαν και αφυδατώθηκαν με ξήρανση με κατάψυξη. Οι τρούφες *Tuber Melanosporum* και *Tuber Aestivum* προμηθεύτηκαν από την εταιρεία «Παυλίνα Κλαδοπούλου – TroufaPlus» (Νέα Χαλκηδόνα, Αθήνα) σε κατεψυγμένη μορφή και στη συνέχεια αφυδατώθηκαν με κατάψυξη (λυοφιλίωση).

Όλα τα δείγματα, αφότου αφυδατωθούν, αλέθονται σε μέγεθος 0.5 mm και φυλάσσονται σε δροσερό και σκιερό μέρος, μέχρι την επεξεργασία τους. Τα άλευρα τρούφας *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum* που προέκυψαν, προτού προχωρήσουν σε περαιτέρω

επεξεργασία, απεικονίζονται με πετρελαϊκό αιθέρα (της εταιρείας Carlo Erba Reagents) σε συσκευή Soxhlet και επαναλέγονται επίσης σε μέγεθος 0.5 mm. Τα άλευρα (απεικονισμένα και μη) αποτελούν την πρώτη ύλη για την παρασκευή εκχυλισμάτων πρωτεϊνών και υδατανθράκων.

Κατά τη διαδικασία εκχύλισης των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα NaOH 0.5 N (Carlo Erba Reagents, S.A.S., France) για τη ρύθμιση του pH. Για την καταβύθιση, χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα H₂SO₄ 0.5 N (Panreac Quimica, S.A., Spain) και για τις εκπλύσεις (καθαρισμό των πρωτεϊνών) ακετόνη και ισοπροπανόλη (Carlo Erba Reagents, S.A.S., France). Για την ανάλυση Kjeldahl των πρώτων υλών και παραλαμβανόμενων πρωτεϊνικών προϊόντων, ως προς το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται θειικό κάλιο (K₂SO₄, Carl Roth, Germany), ένυδρος θειικός χαλκός (CuSO₄·5H₂O, Panreac Quimica, S.A., Spain), αμμωνιακός θειικός σίδηρος (Ammonium Iron (II) Sulfate, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, (p.a.) Merck, KGaA, Germany), διάλυμα πυκνού θειικού οξέος (95-98%) (Sigma-Aldrich), πυρήνες βρασμού (1-2 mm, Merck Millipore), υδατικό διάλυμα NaOH 32% w/w (παρασκευασμένο από πέρλες NaOH Iach:ner, s.r.o., Czech Republic), NaOH 0.5 N (Carlo Erba, S.A.S., France), H₂SO₄ 0.5 N (Fisher, USA) και δείκτης Kjeldahl.

Κατά τη διάρκεια εκχύλισης των υδατανθράκων και απομόνωσής τους, χρησιμοποιούνται αιθανόλη και ακετόνη. Για την ανάλυση ολικών και β-γλυκανών, χρησιμοποιούνται οξικό οξύ (glacial acetic acid CH₃COOH, Carlo Erba, S.A.S., France), υδατικό διάλυμα KOH 2 M (παρασκευασμένο από πέρλες KOH Iach:ner, s.r.o., Czech Republic, 112g/1 L) και υδροχλωρικό οξύ 37% v/v (Panreac Quimica, S.A., Spain), NaOH 4 M (παρασκευασμένο από πέρλες, 16 g/100 mL) και τα αντιδραστήρια του ενζυμικού kit Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay Procedure K-YBGL 07/11 (Megazyme, Ireland).

4.2.2 Όργανα – Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιούνται κατά την πειραματική διαδικασία αλλά και κατά τη διάρκεια των μετρήσεων είναι τα εξής:

- Πεχάμετρο
- Αναλυτικός ζυγός PrecisaXT 220A (4 δεκαδικών ψηφίων)
- Αναλυτικός ζυγός Precisa 620 C (2 δεκαδικών ψηφίων)
- Συσκευή ξήρανσης με κατάψυξη Christ Alpha 1-4 LD plus (Martin Christ, Germany) (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Συσκευή Soxhlet (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Λουτρό εκχύλισης πρωτεϊνών HAAKE G με αναδευτήρα (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Υδατόλουτρο GFL 1083 (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Θολωσίμετρο Hach 2100N turbidimeter (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Φούρνος BINDER 40°C (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Φούρνος BINDER WTC 150°C (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)

- Συσκευή (λουτρό) υπερήχων ElmaS 30 H, Elmasonic (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Συσκευή μικροκυμάτων Nanjing Xianou Instruments Manufacture (Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών ΕΜΠ)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας Heidolph (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Συσκευή καύσης Kjeldahl BUCHII 425 Digestor (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Συσκευή απόσταξης Kjeldahl BUCHI K-350 (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2900 (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Φυγόκεντρος MLW T 54 (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Φυγόκεντρος HERMLE Z 380 (Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων ΕΜΠ)
- Αναδευτήρας vortex
- Υαλικά σκεύη (ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες, φιαλίδια, ογκομετρικοί κύλινδροι, προχοΐδες, σιφώνια, σφαιρικές φιάλες, κάψες, καψίδια, δοκιμαστικοί σωλήνες με πώμα)
- Πλαστικά σκεύη (τρυβλία)
- Μεταλλικά σκεύη (λαβίδες)

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιείται η διερεύνηση δύο διαφορετικών εκχυλισμάτων, των πρωτεϊνικών και των υδατανθρακικών, με διαδικασίες που εφαρμόζονται σε αλεσμένα απελαιωμένα υποστρώματα, επομένως πρώτα θα παρουσιαστεί η πειραματική διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων μανιταριών και η διαδικασία απελαίωσης. Ακολουθούν οι διεργασίες εκχύλισης πρωτεϊνικών και υδατανθρακικών κλασμάτων και στη συνέχεια οι αναλυτικές διαδικασίες προσδιορισμού των περιεχόμενων πρωτεϊνών και γλυκανών για τις διάφορες πρώτες ύλες και τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά και υδατανθρακικά προϊόντα απομόνωσης (συμπυκνώματα).

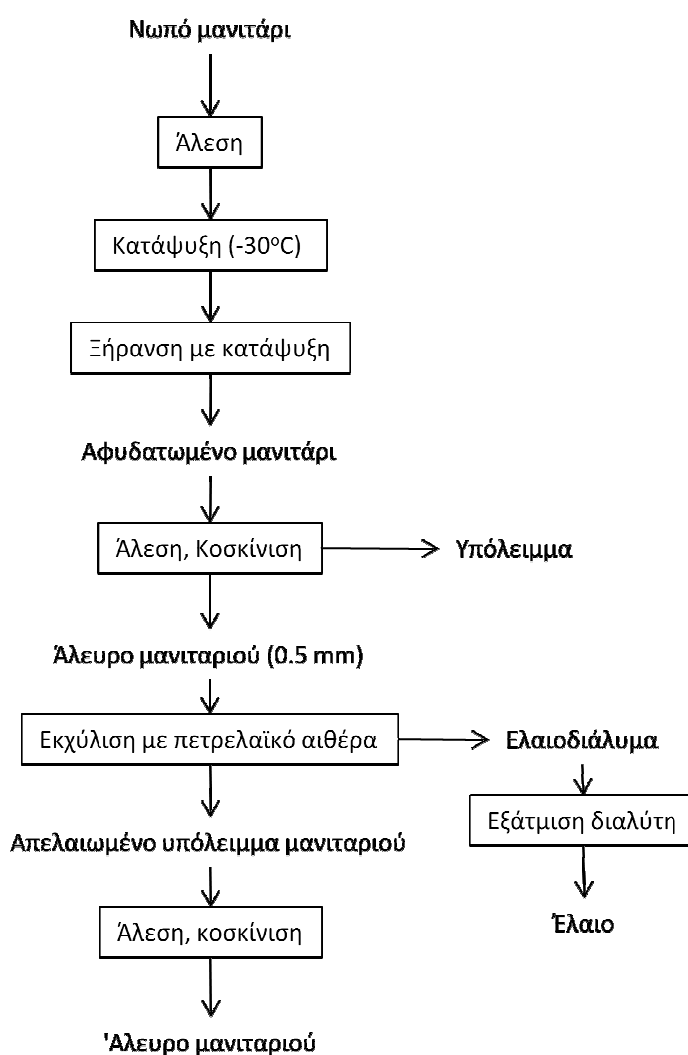
4.3.1 Προκατεργασία Δειγμάτων Μανιταριών

Στην εικόνα 4.1 παρουσιάζεται η διαδικασία προετοιμασίας των μανιταριών, από νωπή μορφή έως τη μορφή τύπου αλεύρου. Σημειώνεται ότι η κατάψυξη και ξήρανση απαιτείται για τα μανιτάρια που προμηθεύτηκαν σε νωπή μορφή, δηλαδή *Lentinula edodes*, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*. Επίσης, η απελαίωση πραγματοποιείται πριν τις εκχυλίσεις μόνο για την περίπτωση των τρουφών, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*. Τα υπόλοιπα μανιτάρια, *Ganoderma lucidum* και *Grifola frondosa*, που προμηθεύτηκαν σε ξηρή μορφή, κοσκινίζονται

(0.5 mm) ώστε να προκύψει άλετρο ομοιόμορφου μεγέθους σωματιδίων και χρησιμοποιούνται απευθείας στις διαδικασίες εκχύλισης.

Επομένως, τα μανιτάρια *Lentinula edodes* αρχικά πολτοποιούνται με χρήση μύλου, συλλέγονται και καταψύχονται στους -30°C , προκειμένου να αφυδατωθούν με κατάψυξη (λυοφιλίωση) σε διάστημα 2-3 ημερών, αναλόγως της ποσότητας. Στη συνέχεια, αλέθονται πάλι με χρήση μύλου, κοσκινίζονται με χρήση κόσκινου μεγέθους 0.5 mm και χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες εκχύλισης σε αυτή τη μορφή.

Οι τρούφες *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, λόγω του υψηλού περιεχόμενου σε λιπαρά γενικώς στις τρούφες, είναι απαραίτητο να απελαιωθούν προτού εκχυλιστούν τα βιοδραστικά τους συστατικά. Προμηθεύτηκαν σε κατεψυγμένη νωπή μορφή, επομένως τεμαχίζονται (αλέθονται) με χρήση μύλου για διευκόλυνση της αφυδάτωσης, επανακαταψύχονται (-30°C) και αφυδατώνονται με κατάψυξη (λυοφιλίωση) (2 ημέρες). Το ξηρό τεμαχισμένο μανιτάρι που προκύπτει αλέθεται για δεύτερη φορά με μύλο και κοσκινίζεται (κόσκινο 0.5 mm). Στο υλικό αυτό πραγματοποιείται η απελαίωση με πετρελαϊκό αιθέρα, ενώ το υπόλειμμα της κοσκίνισης δεν χρησιμοποιείται, καθώς προέρχεται κυρίως από τον φλοιό της τρούφας και εμφανίζει ιδιαίτερη σκληρότητα.

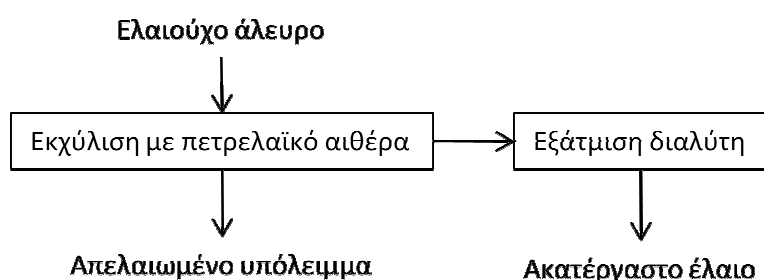


Εικόνα 4.1: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων μανιταριών

4.3.2 Απελαίωση

Η απελαίωση των πρώτων υλών πραγματοποιείται με εκχύλιση με διαλύτη. Ο διαλύτης που επιλέγεται είναι πετρελαϊκός αιθέρας. Η εκχύλιση πραγματοποιείται στις αφυδατωμένες και αλεσμένες πρώτες ύλες, δηλαδή στην υπάρχουσα μορφή των *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, ενώ στα *Lentinula edodes*, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, αφού έχει προηγηθεί ξήρανση με κατάψυξη (λυοφιλίωση), άλεση και κοσκίνιση (0.5 mm). Ακολουθεί το διάγραμμα ροής της διεργασίας (εικόνα 4.2).

Η απελαίωση προηγείται των εκχυλίσεων πρωτεϊνών και υδατανθράκων μόνο στις περιπτώσεις των τρoυφών *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, λόγω του υψηλού περιεχόμενoύ τους σε έλαιο γενικώς στις τρούφες, ενώ για τα υπόλοιπα μανιτάρια πραγματοποιείται ανεξάρτητα των εκχυλίσεων για την αξιολόγησή τους.



Εικόνα 4.2: Διαδικασία εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα (απελαίωσης)

Η εκχύλιση με διαλύτη επηρεάζεται από το είδος του διαλύτη, το μέγεθος του αλεσμένου σπόρου, την υγρασία του, το λόγο στερεού/διαλύτη (w/v) και τον χρόνο της διεργασίας. Επιλέγεται λόγος στερεού/διαλύτη 1 g/125 mL. Η διαδικασία περιγράφεται από τα ακόλουθα στάδια.

1. Ορισμένη ποσότητα πρώτης ύλης (ελαιούχου αλεύρου), ζυγισμένη με ακρίβεια, εισάγεται σε καρτούσα, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται στη διάταξη Soxhlet (εικόνα 4.3). Ο διαλύτης (150-200 mL) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη στην αντίστοιχη θέση της διάταξης (εικόνα 4.4).
2. Ρυθμίζεται η ένταση της θέρμανσης και η εκχύλιση συνεχίζεται για περίπου 3 h.



Εικόνα 4.3: Συσκευή Soxhlet



Εικόνα 4.4: Άποψη εκχύλισης *Tuber aestivum*

3. Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση, σταματά η θέρμανση και το σύστημα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Το ελαιοδιάλυμα τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, ώστε να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη μέσω απόσταξης. Το συμπυκνωμένο ελαιοδιάλυμα μεταγγίζεται σε άλλο δοχείο και αφήνεται μέχρι σταθερού βάρους για εξάτμιση των υπολειμμάτων του διαλύτη σε φούρνο 45°C για μία νύχτα.
5. Το έλαιο που παραλαμβάνεται ζυγίζεται, ώστε να υπολογιστεί η περιεκτικότητα σε έλαιο.

Η περιεκτικότητα σε έλαιο (%w/w) υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση 4.1.

$$\text{Έλαιο} \left(\% \frac{W}{W} \right) = \frac{m_{\text{ελαιου}}}{m_{\text{αρχ}}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.1})$$

Όπου, $m_{\text{ελαιου}}$: η μάζα σταθεροποιημένου ελαίου που παραλαμβάνεται (σε g)

$m_{\text{αρχ}}$: η αρχική μάζα της πρώτης ύλης που εισάγεται στην καρτούσα (σε g)

4.3.3 Παραλαβή Πρωτεϊνικών Προϊόντων (Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων)

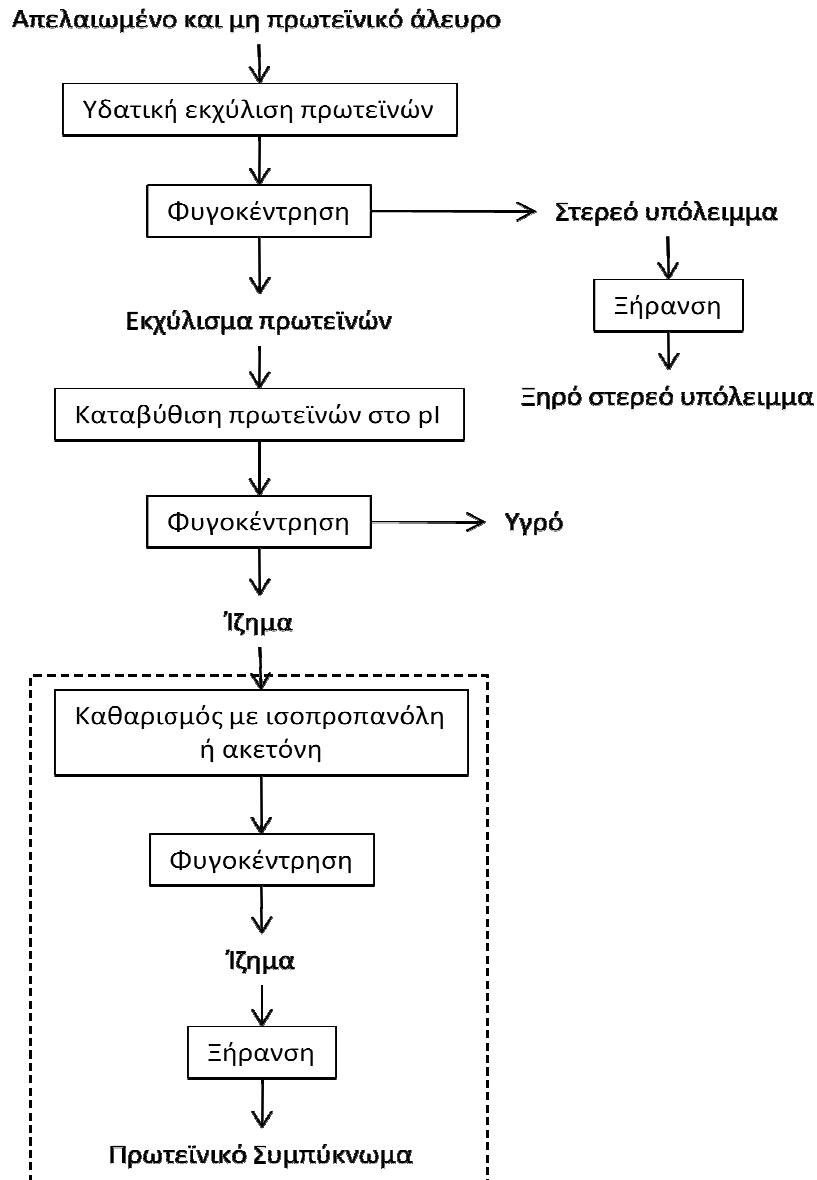
Αρχικά θα παρουσιαστεί ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα ροής των σταδίων που πραγματοποιήθηκαν για την παραλαβή των πρωτεϊνικών προϊόντων (πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων) (εικόνα 4.6). Η διαδικασία που εφαρμόστηκε είναι η κλασική διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών από υπολείμματα ελαιούχου σπόρου. Επαναλαμβάνεται ότι ως πρώτες ύλες απειλωμένες είναι τα άλευρα *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, ενώ τα *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* και *Grifola frondosa* εκχυλίζονται σε μορφή μη απειλωμένου αλεύρου.

Η υδατική εκχύλιση πρωτεϊνών πραγματοποιείται σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα.

1. Εκχύλιση: Ορισμένη ποσότητα πρώτης ύλης εκχυλίζεται με κατάλληλο εκχυλιστικό μέσο (απιονισμένο νερό) σε καθορισμένη αναλογία υγρού – στερεού (25 mL:1 g) σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως υπό ανάδευση για ορισμένο χρονικό διάστημα (1 h). Το pH εκχύλισης του διαλύματος διατηρείται σταθερό, καθόλη τη διάρκεια της εκχύλισης με χρήση διαλυμάτων 0.5N NaOH και 0.5N H₂SO₄. Η θερμοκρασία διατηρείται επίσης σταθερή στους 40°C, με χρήση υδατόλουτρου με σταθερή θερμοκρασία.



Εικόνα 4.5: Υδατική εκχύλιση πρωτεϊνών



Εικόνα 4.6: Διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών για παραλαβή πρωτεϊνικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων) με εκχύλιση-καταβύθιση των πρωτεϊνών και καθαρισμό τους

2. Φυγοκέντρηση: Με το πέρας της εκχύλισης, ακολουθεί φυγοκέντρηση του αιωρήματος σε 2600xg για 10 min (εικόνες 4.7-4.8). Το υπερκείμενο υγρό που αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (πρωτεΐνες σε αιώρηση) συλλέγεται, ογκομετρείται και αραιώνεται ξανά με απιονισμένο νερό. Το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται και ξηραίνεται για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.7: Φυγόκεντρος



Εικόνα 4.8: Δοχεία φυγοκέντρησης

3. Καταβύθιση πρωτεϊνών και καθαρισμός:

Στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προστίθεται σταδιακά, υπό ήπια ανάδευση, κατάλληλη ποσότητα διαλύματος οξέος ($0.5N H_2SO_4$) ή βάσης ($0.5N NaOH$), ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση σε $2600xg$ για 10 min, καταψύχονται και στη συνέχεια ξηραίνονται υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση). Εναλλακτικά, γίνεται έκπλυση στα πρωτεϊνικά ιζήματα πριν την αφυδάτωσή τους, είτε με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης 50% είτε με υδατικό διάλυμα ακετόνης 2:1 v/v και ακολούθως διαχωρισμός με φυγοκέντρηση, με στόχο την καλύτερη απομόνωση των πρωτεϊνών από ανεπιθύμητες ουσίες.

4. Ξήρανση με κατάψυξη (λυοφιλίωση): Το πρωτεϊνικό ίζημα καταψύχεται ($-30^{\circ}C$) για 1 ημέρα και υποβάλλεται σε λυοφιλίωση σε συνθήκες πίεσης (υπό κενό: 0.04 ± 0.005 mbar) και θερμοκρασίας ($-50 \pm 2^{\circ}C$) για διάρκεια 1-3 ημερών (αναλόγως της ποσότητας του δείγματος που ξηραίνεται). Το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα ζυγίζεται μετά την ξήρανση για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και των αποδόσεων της διεργασίας.

Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου (pI): Για τον προσδιορισμό του pI των πρωτεϊνών των μανιταριών επαναλαμβάνεται ένα πείραμα εκχύλισης των πρωτεϊνών έως το στάδιο της παραλαβής του εκχυλίσματος μετά το διαχωρισμό με φυγοκέντρηση του στερεού υπολείμματος όπως ήδη περιγράφηκε. Το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών των μελετώμενων μανιταριών προσδιορίζεται ως η τιμή pH στην οποία εμφανίζεται η μέγιστη καταβύθιση (ελάχιστη διαλυτότητα). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χωρίζεται σε 10 ισόποσα δείγματα (των 45 mL) σε σωλήνες φυγοκέντρου και σε καθένα από αυτά ρυθμίζεται το pH στην επιθυμητή τιμή, ώστε να γίνει σάρωση στην περιοχή τιμών pH 2.80-4.80 με τη βοήθεια διαλυμάτων $0.5 N H_2SO_4$ και $0.5 N NaOH$. Μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων διαχωρίζεται το ίζημα των πρωτεϊνών, αφυδατώνεται υπό κατάψυξη και ζυγίζεται. Ο προσδιορισμός του pI πραγματοποιείται έτσι άμεσα μέσω του βάρους των καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών (μέγιστη καταβύθιση). Για επαλήθευση αυτής της τιμής, το pI προσδιορίζεται και έμμεσα μέσω της θολότητας του υπερκείμενου υγρού των δειγμάτων με θολωσιμετρία (εικόνα 4.9), δηλαδή μετράται η



Εικόνα 4.9: Θολωσίμετρο

θολότητα του υγρού που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση (υπερκείμενου υγρού), αφού διαχωριστούν οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες, όπως επίσης και στο αρχικό πρωτεϊνικό παρασκεύασμα. Η μέτρηση της θολότητας γίνεται ως εξής: γεμίζεται ο σωλήνας του θολωσίμετρου μέχρι τη λευκή γραμμή, πωματίζεται, εισάγεται στο όργανο και λαμβάνεται η ένδειξη του οργάνου. Η ελάχιστη τιμή θολότητας, αντιστοιχεί σε ελάχιστη

διαλυτότητα, άρα στο ρΙ των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται δύο φορές για κάθε πρώτη ύλη (εκτός *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, λόγω περιορισμένης ποσότητας). Το ρΙ που προσδιορίζεται για κάθε πρώτη ύλη μανιταριού, χρησιμοποιείται για την καταβύθιση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνικών προϊόντων (πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων).

Οι σχέσεις με βάση τις οποίες γίνεται ο προσδιορισμός του ρΙ είναι οι ακόλουθες:

$$\% \text{Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες} = \frac{\text{ξηρές καταβ. πρωτ. σε κάθε κύλινδρο}}{\text{ολικές πρωτ. στο εκχύλισμα}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.2})$$

$$\% \text{Μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες} = \frac{\text{πρωτεΐνες στο υπερκείμενο υγρό}}{\text{πρωτεΐνες στο αρχικό διάλυμα}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.3})$$

$$\% \text{Μη καταβ. πρωτ.} = \frac{\text{μη καταβυθ. πρωτ. σε κάθε κύλινδρο}}{\text{ολικές πρωτ. στο εκχύλισμα}} = \frac{V_i \cdot NTU_i}{V_{ολ} \cdot NTU_{ολ}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.4})$$

Όπου, V_i : ο όγκος (mL) σε κάθε κύλινδρο

$V_{ολ}$: ο ολικός όγκος εκχυλίσματος (mL)

NTU_i , $NTU_{ολ}$: η θολότητα (σε NTU) του περιεχομένου κάθε κυλίνδρου και του αρχικού εκχυλίσματος αντίστοιχα.

Με τη βοήθεια των σχέσεων αυτών κατασκευάζονται δύο διαγράμματα: (1) %καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες-ρΗ (σχέση 4.2) και (2) %μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες-ρΗ (σχέση 4.4). Από το πρώτο διάγραμμα, το ρΙ προσδιορίζεται ως η τιμή ρΗ που αντιστοιχεί στο μέγιστο της καμπύλης (μέγιστη καταβύθιση πρωτεϊνών), ενώ από το δεύτερο διάγραμμα ως η τιμή ρΗ που αντιστοιχεί στο ελάχιστο της καμπύλης (ελάχιστη θολότητα αντιστοιχεί σε ελάχιστες μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες άρα μέγιστη καταβύθιση πρωτεϊνών σε αυτό το ρΗ).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕΓΕΘΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

$$\begin{aligned} \% \text{Απόδοση εκχύλισης} &= \frac{\text{εκχυλισμένες πρωτεΐνες}}{\text{πρωτεΐνες στην α' ύλη}} \cdot 100 \\ &= \frac{m_{\text{πρωτ.αι' ύλης}} - m_{\text{πρωτ.στερ.υπολ.}}}{m_{\text{πρωτ.αι' ύλης}}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.5}) \end{aligned}$$

$$\% \text{Απόδοση απομόνωσης} = \frac{\text{πρωτεΐνες συμπυκνώματος}}{\text{εκχυλισμένες πρωτεΐνες}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.6})$$

$$\% \text{Ολική απόδοση} = \frac{\text{πρωτεΐνες συμπυκνώματος}}{\text{πρωτεΐνες α' ύλης}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.7})$$

$$\% \text{συμπυκνώματος} = \frac{m_{\text{πρωτεϊνικού συμπυκνώματος}}}{m_{\text{αρχικού μανιταριού}}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.8})$$

Όπου, $m_{\text{πρωτεϊνικού συμπυκνώματος}}$: η μάζα του συμπυκνώματος πρωτεϊνών που παραλαμβάνεται μετά από εκχύλιση, απομόνωση και ενδεχόμενο καθαρισμό (g) (σε ξηρό βάρος)

$m_{\text{αρχικού μανιταριού}}$: η μάζα αρχικού μανιταριού που εκχυλίστηκε (g) (σε ξηρό βάρος)

Όλες οι ποσότητες πρωτεϊνών εκφράζονται σε ξηρό βάρος (g).

4.3.4 Παραλαβή Υδατανθρακικών Προϊόντων (Υδατανθρακικών Συμπυκνωμάτων β-γλυκανών)

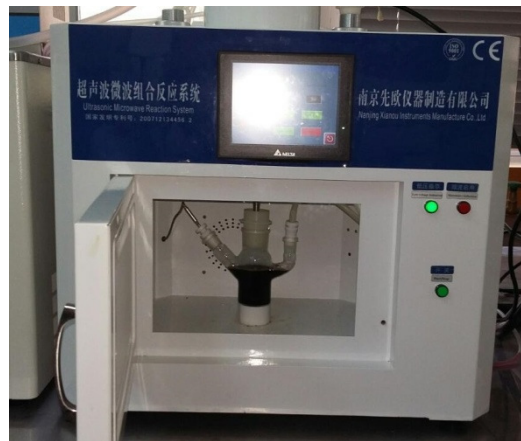
Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση των υδατανθρακικών συστατικών, ειδικά γλυκανών των μανιταριών, μέσω εκχύλισης, συμπύκνωσης του εκχυλίσματος, καταβύθισης των υδατανθράκων με αιθανόλη και ξήρανση με κατάψυξη (λυοφιλίωση).

Η παρασκευή των υδατανθρακικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται με δύο σύγχρονες μεθόδους: με υπέρηχους και με μικροκύματα (Ultrasonic Assisted Extraction και Microwave Assisted Extraction). Προκειμένου να μελετηθεί η απόδοση των εκχυλιζόμενων γλυκανών, επιλέγεται ως μεταβλητή ο χρόνος εκχύλισης, διατηρώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους εκχύλισης (θερμοκρασία, ισχύ υπερήχων/μικροκυμάτων, αναλογία υγρού/στερεού) σταθερές. Ακολουθεί το διάγραμμα ροής (εικόνα 4.11) εκχύλισης και παραλαβής των υδατανθρακικών προϊόντων. Σημειώνεται ότι η πρώτη ύλη είναι το απειλαιωμένο αλεύρο στην περίπτωση των *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum* μόνο, ενώ τα *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* εκχυλίζονται σε μορφή μη απειλαιωμένου αλεύρου, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

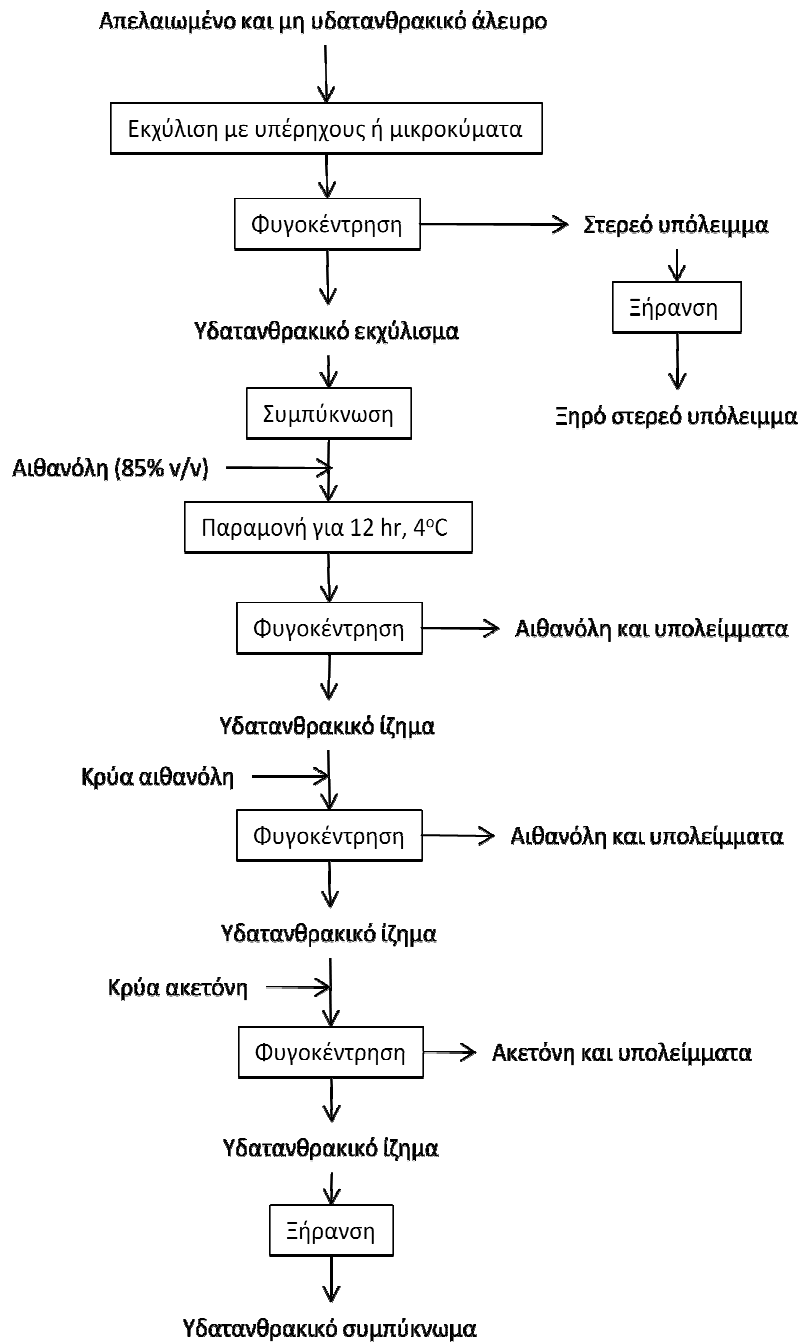
1. Εκχύλιση: Τοποθετείται κατάλληλη ποσότητα δείγματος και απιονισμένου νερού σε αναλογία 25 mL/1 g σε γυάλινο δοχείο.

Με υπέρηχους: Το δοχείο πωματίζεται και εισάγεται στη συσκευή υπερήχων, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 40°C, για να μην υποβαθμιστούν ποιοτικά οι εκχυλιζόμενοι πολυσακχαρίτες. Το πείραμα για τα μανιτάρια *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* και *Grifola frondosa* επαναλαμβάνεται 3 φορές, σε 3 διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης (30, 60 και 90 min). Για τις τρούφες *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, λόγω περιορισμένης ποσότητας, επιλέγονται τα 60 min ως χρόνος εκχύλισης.

Με μικροκύματα: Το ειδικό δοχείο τοποθετείται στη θέση εισόδου του δείγματος, πωματίζεται, τοποθετείται το θερμόμετρο και κλείνεται η πόρτα (εικόνα 4.10). Ρυθμίζονται οι παράμετροι εκχύλισης: ισχύς μικροκυμάτων 400 W, ανάδευση 232 rpm, θερμοκρασία 40°C και ο χρόνος εκχύλισης είναι 5, 10 και 15 min σε 3 διαφορετικά πειράματα για τα *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* και *Grifola frondosa*, ενώ για τα *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum* επιλέγεται ο χρόνος εκχύλισης 30 min.



Εικόνα 4.10: Συσκευή μικροκυμάτων



Εικόνα 4.11: Διαδικασία απομόνωσης υδατανθράκων για παραλαβή υδατανθρακικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων) με εκχύλιση των υδατανθράκων με υπέρηχους (UV) ή μικροκύματα (MW) και καθαρισμό τους

2. Φυγοκέντρηση: Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση, το δείγμα αφήνεται να ψυχθεί μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται (1300xg) (εικόνα 4.12). Το στερεό υπόλειμμα συλλέγεται, ζυγίζεται νωπό και αφυδατώνεται, ώστε να αναλυθεί στη συνέχεια ως προς το περιεχόμενο ολικών και β-γλυκανών.



Εικόνα 4.12: Φυγόκεντρος



Εικόνα 4.13: Περιστροφικός εξατμιστήρας

3. Συμπύκνωση: Το υπερκείμενο υγρό ή υδατανθρακικό εκχύλισμα μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη και τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (εικόνα 4.13) για τη συμπύκνωση του εκχυλίσματος, στο 1/10 περίπου του αρχικού όγκου.
4. Απομόνωση (καταβύθιση) με αιθανόλη: Στο συμπυκνωμένο υδατανθρακικό εκχύλισμα προστίθεται αιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 85% v/v και το μίγμα παραμένει στους 4°C για 12 h.
5. Φυγοκέντρωση: Το αιθανολικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται (1300xg, 20 min) και το υπερκείμενο υγρό (αιθανόλη με διάφορες προσμίξεις) απορρίπτεται.
6. Καθαρισμός: Το ίζημα (υδατανθρακικό συμπύκωμα) επαναδιαλύεται σε ψυχρή αιθανόλη, φυγοκεντρείται πάλι, για μικρότερο όμως χρονικό διάστημα (1300xg, 10 min). Το υπερκείμενο υγρό (αιθανόλη με υπολείμματα προσμίξεων) απορρίπτεται, ενώ το ίζημα (συμπύκνωμα) διαλύεται σε ψυχρή ακετόνη και φυγοκεντρείται (1300xg, 10 min). Το υπερκείμενο υγρό (ακετόνη και υπολείμματα προσμίξεων) απορρίπτεται και το συμπύκνωμα καταψύχεται (-30°C) και αφυδατώνεται με κατάψυξη. Το συμπύκνωμα ζυγίζεται για τον προσδιορισμό της απόδοσης εκχύλισης και απομόνωσης.

Τα εκχυλίσματα και στερεά υπολείμματα φυλάσσονται σε ξηρό και σκιερό μέρος μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους, για τον προσδιορισμό περιεκτικότητας ολικών και β-γλυκανών.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕΓΕΘΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

$$\begin{aligned} \% \text{ Απόδοση εκχύλισης} &= \frac{\text{εκχυλισμένες γλυκάνες}}{\text{γλυκάνες α' ύλης}} \cdot 100 \\ &= \frac{m_{\text{γλυκάνες αι ύλης}} - m_{\text{γλυκάνες στερ.υπολ/τος}}}{m_{\text{γλυκάνες αι ύλης}}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.9}) \end{aligned}$$

$$\% \text{ Απόδοση απομόνωσης} = \frac{\text{γλυκάνες συμπυκνώματος}}{\text{εκχυλισμένες γλυκάνες}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.10})$$

$$\% \text{ Ολική απόδοση} = \frac{\text{γλυκάνες συμπυκνώματος}}{\text{γλυκάνες α' ύλης}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.11})$$

Όπου όλες οι ποσότητες ολικών ή β-γλυκανών εκφράζονται σε ξηρό βάρος (g). Σε αυτό το σημείο ορίζεται το μέγεθος %συμπυκνώματος, ως το %ποσοστό υδατανθρακικού συμπυκνώματος που παραλαμβάνεται σε σχέση με την αρχική ποσότητα που εκχυλίστηκε:

$$\% \text{συμπυκνώματος} = \frac{m_{\text{συμπυκνώματος γλυκανών}}}{m_{\text{αρχικού μανιταριού}}} \cdot 100 \quad (\text{σχέση 4.12})$$

Όπου, $m_{\text{συμπυκνώματος γλυκανών}}$: η μάζα του συμπυκνώματος β-γλυκανών που παραλαμβάνεται μετά την εκχύλιση, απομόνωση και καθαρισμό (g) (σε ξηρό βάρος)

$m_{\text{αρχικού μανιταριού}}$: η μάζα αρχικού μανιταριού που εκχυλίστηκε (g) (σε ξηρό βάρος)

4.4 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

4.4.1 Προσδιορισμός Περιεχόμενου Σε Πρωτεΐνες – Kjeldahl

Πραγματοποιείται ανάλυση Kjeldahl για τον προσδιορισμό του συνολικού αζώτου (%N) και με τη βοήθεια κατάλληλου συντελεστή (x4.38) ειδικού για μανιτάρια μετατροπή του σε %ποσοστό περιεχόμενων πρωτεϊνών, στις πρώτες ύλες (μη απειλωμένες: *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* και απειλωμένες: *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*), τα ξηρά στερεά υπολείμματα και ξηρά πρωτεϊνικά προϊόντα απομόνωσης (πρωτεϊνικά συμπυκνώματα) που παρελήφθησαν από τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών. Ακολουθείται η ακόλουθη διαδικασία:

1. Σε ειδικό σωλήνα καύσης μεταφέρεται ποσοτικά η αναγκαία ποσότητα δείγματος (~1.2000 g), ζυγισμένη σε ζυγό 4 δεκαδικών ψηφίων και προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:
 - 10 g θειικού καλίου (K_2SO_4)
 - 1 g ένυδρου θειικού χαλκού ($CuSO_4 \cdot H_2O$)
 - 25 mL πυκνού θειικού οξέος (95-98% H_2SO_4)
 - Πυρήνες βρασμού
2. Ο σωλήνας τοποθετείται στην ειδική συσκευή καύσης Kjeldahl, όπου θερμαίνεται αρχικά ήπια για 20 min έως ότου αρχίσει ο αφρισμός, ακολούθως σε συνθήκες ήπιου βρασμού για τουλάχιστον 15 min μέχρις ότου διαυγαστεί το περιεχόμενό του και τελικώς σε συνθήκες έντονου βρασμού για 30 min.



Εικόνα 4.14: Σωλήνες καύσης αμέσως μετά την ολοκλήρωση της καύσης (A) και αφότου ψυχθούν (B) σε θερμοκρασία δωματίου

- 5 Ο σωλήνας αφήνεται να ψυχθεί (εικόνα 4.14), προσαρμόζεται στην ειδική συσκευή απόσταξης Kjeldahl (εικόνα 4.15) όπου προστίθενται:
- 75 mL νερού
 - 125 mL διάλυμα NaOH 32% w/w

και υποβάλλεται σε απόσταξη. Το απόσταγμα διαβιβάζεται σε υποδοχέα που περιέχει 50 mL διαλύματος 0.5 N H₂SO₄.

- 6 Μετά τη συλλογή περίπου 200 mL αποστάγματος στον υποδοχέα, το υπολειπόμενο H₂SO₄ τιτλοδοτείται με διάλυμα 0.5 N NaOH (εικόνα 4.16) και δείκτη ερυθρό μεθυλίου-μπλε μεθυλενίου (δείκτης Kjeldahl). Παράλληλα εκτελείται και λευκός προσδιορισμός αλλά και προσδιορισμός πρότυπου δείγματος (Ammonium Iron Sulfate), ώστε να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια της αναλυτικής διεργασίας μέσω του όρου της %ανάκτησης. Σε συστήματα απόσταξης-τιτλοδότησης, ζητείται ανάκτηση καλύτερη του 99.5%.



Εικόνα 4.15: Συσκευή απόσταξης Kjeldahl



Εικόνα 4.16: Απόσταγμα με δείκτη Kjeldahl πριν (δεξιά) και μετά (αριστερά) την τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.5 N

Ο προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών πραγματοποιείται 2 φορές ανά δείγμα, για λόγους ακρίβειας και λαμβάνεται ο μέσος όρος τιμών.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ολικό άζωτο (%N) υπολογίζεται μέσω της σχέσης 4.13:

$$N\% = \frac{1.4007 \cdot |V_1 - V_2| \cdot N}{\beta} \quad (\text{σχέση 4.13})$$

Όπου, N: η κανονικότητα του πρότυπου διαλύματος NaOH (0.5 N)

β: το βάρος του δείγματος (σε g, με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων)

V₁, V₂: καταναλωθέντες όγκοι πρότυπου διαλύματος NaOH κατά την τιτλοδότηση (σε mL), V₁ δείγματος, V₂ λευκού.

Οι περιεχόμενες πρωτεΐνες υπολογίζονται ως το γινόμενο του %N με τον συντελεστή x4.38 που προτείνεται από τη βιβλιογραφία για τις πρωτεΐνες από μανιτάρια.

4.4.2 Προσδιορισμός Περιεχόμενου σε Ολικές και β-γλυκάνες

Η ανάλυση τόσο των αφυδατωμένων πρώτων υλών (μη απειλωμένων, εκτός των περιπτώσεων *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum* που απειλωθήκαν) όσο και των αφυδατωμένων



Εικόνα 4.17: Έτοιμο ενζυμικό kit (Megazyme) για τον προσδιορισμό ολικών και β-γλυκανών

Ν) και ακολούθως η υδρόλυση με 1.3 N HCl σε 100°C για 2 h. Η υδρόλυση σε D-γλυκόζη ολοκληρώνεται με επώαση με ένα μίγμα υψηλής καθαρότητας *exo*-1,3-β-γλυκανάσης και β-γλυκοσιδάσης. Ενώ μερικές γλυκάνες είναι διαλυτές σε θερμό νερό ή θερμό KOH, οι διαλύτες αυτοί δεν είναι αποτελεσματικοί στη διαλυτοποίηση β-γλυκανών από ζύμες ή μανιτάρια. Η ανάλυση αυτών των γλυκανών προαπαιτεί μερική όξινη υδρόλυση προς παρεμπόδιση της ανεπιθύμητης ζελοποίησης και τη διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών με άλλους πολυσακχαρίτες (όπως χιτίνη) ή πρωτεΐνες.

Το kit περιλαμβάνει 6 μπουκάλια, καθένα από τα οποία περιέχει:

1. Ελαιώρημα *exo*-1,3-β-γλυκανάσης (100 U/mL) και β-γλυκοσιδάσης (20 U/mL), 2.0 mL
2. Διάλυμα αμυλογλυκοσιδάσης (1630 U/mL) και ιμπερτάσης (500 U/mL) σε 50% v/v γλυκερόλη, 20 mL.
3. Ρυθμιστικό αντιδραστήριο GOPOD: Ρυθμιστικό (48 mL, pH 7.4), p-υδροξυβενζοϊκό οξύ και αζίδιο του νατρίου (0.4% w/v).
4. Αντιδραστήριο ενζύμων GOPOD: Οξειδάση της γλυκόζης, υπεροξειδάση και 4-αμινοαντιπυρίνη.
5. Πρότυπο διάλυμα D-γλυκόζης (5 mL, 1.00 mg/mL) σε 0.2% w/v βενζοϊκό οξύ.
6. Control παρασκεύασμα β-γλυκάνης ζύμης (~2 g)

Για τη διεξαγωγή αυτών των πειραμάτων είναι απαραίτητα τα εξής διαλύματα:

- **Ρυθμιστικό οξικό νάτριο (200 mM, pH 5.0):** Προστίθενται 11.6 mL παγωμένου οξικού οξέος (glacial acetic acid) σε 900 mL απιονισμένου νερού και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 5.0 με διάλυμα NaOH 4 M. Ο όγκος ρυθμίζεται στο 1 L με απιονισμένο νερό.
- **Ρυθμιστικό οξικό νάτριο (1.2 M, pH 3.8):** Προστίθενται 69.6 mL παγωμένου οξικού οξέος σε 800 mL απιονισμένου νερού και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 3.8 με διάλυμα NaOH 4 M. Ο όγκος ρυθμίζεται στο 1 L με απιονισμένο νερό.
- **Καυστικό κάλιο (2 M):** Προστίθενται 112 g KOH σε 800 mL απιονισμένου νερού και διαλύονται με ανάδευση. Ο όγκος ρυθμίζεται στο 1 L με απιονισμένο νερό.
- **Υδροχλωρικό οξύ (37% v/v; ~10 M)**

στερεών υπολειμμάτων και υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων που προέκυψαν από την εκχύλιση υδατανθρακικών κλασμάτων, πραγματοποιείται με τη βοήθεια έτοιμου ενζυμικού kit (εικόνα 4.17) για τον προσδιορισμό της %περιεκτικότητας σε ολικές και β-γλυκάνες.

Η βασική αρχή της ανάλυσης είναι αρχικά η

διάλυση των 1,3:1,6-β-D-γλυκανών, 1,3-β-D-γλυκανών και α-γλυκανών σε υδροχλωρικό οξύ (συγκέντρωσης 37% ή 10

Στο σημείο αυτό θα παρουσιαστεί η παρασκευή των διαλυμάτων/εναιωρημάτων των παραπάνω αντιδραστηρίων.

1. Στο μπουκάλι 1 προστίθενται 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 200 mM (pH 5.0). Χωρίζεται σε κλάσματα κατάλληλης ποσότητας και φυλάσσεται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου στους -20°C ανάμεσα στις χρήσεις και σε πάγο κατά τη διάρκεια της χρήσης.
2. Το περιεχόμενο του μπουκαλιού 2 χρησιμοποιείται ως έχει.
3. Το περιεχόμενο του μπουκαλιού 3 αραιώνεται σε 1 L με απιονισμένο νερό.
4. Το περιεχόμενο του μπουκαλιού 4 διαλύεται στο αραιωμένο παρασκεύασμα του μπουκαλιού 3. Αυτό το μίγμα αντιδραστηρίων χωρίζεται σε κλάσματα για αποθήκευση (4°C).
5. Το περιεχόμενο του μπουκαλιού 5 χρησιμοποιείται ως έχει.
6. Το περιεχόμενο του μπουκαλιού 6 χρησιμοποιείται ως έχει.

A. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΓΛΥΚΑΝΩΝ

Ακολουθεί η περιγραφή της διαδικασίας προσδιορισμού των ολικών γλυκανών (α- και β-γλυκανών), για τον οποίο πραγματοποιείται διαλυτοποίηση και μερική υδρόλυση των ολικών γλυκανών και D-γλυκόζης σε ολιγοσακχαρίτες, σακχαρόζη και ελεύθερη D-γλυκόζη.

1. Το αλεσμένο δείγμα μανιταριού περνάει από κόσκινο 0.5 mm.
2. Περίπου 100 mg δείγματος (ζυγισμένα με ακρίβεια) τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα μεγέθους 20 x 125 mm. Ο σωλήνας ανακινείται ελαφρά, ώστε να πέσει όλη η ποσότητα δείγματος στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα.
3. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται 1.5 mL διαλύματος HCl (37% v/v), οι σωλήνες πωματίζονται και αναδεύονται σε αναδευτήρα vortex. Ακολούθως τοποθετούνται σε λουτρό στους 30°C για 45 min, ενώ αναδεύονται σε αναδευτήρα vortex ανά 15 min (για πλήρη διάλυση της β-γλυκάνης).
4. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 10 mL απιονισμένου νερού, οι σωλήνες πωματίζονται και αναδεύονται σε αναδευτήρα vortex.
5. Τα πώματα των σωλήνων χαλαρώνονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με νερό υπό βρασμό ($\sim 100^{\circ}\text{C}$). Μετά από 5 min τα πώματα σφίγγονται και η επώαση συνεχίζεται για 2 h.
6. Οι σωλήνες αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου και τα πώματα αφαιρούνται με προσοχή. Προστίθενται 10 mL 2 N KOH.
7. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό οξικού νατρίου (pH 5.0) για το πλύσιμο του σωλήνα και τη ρύθμιση του όγκου. Το μίγμα αναδεύεται με αναστροφή της φιάλης.
8. Ένα κλάσμα από κάθε εναιώρημα διηθείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού.
9. 0.1 mL από κάθε διηθημένο εκχύλισμα μεταφέρεται στον πυθμένα δοκιμαστικού σωλήνα (16 x 100 mm).

10. Προστίθεται 0.1 mL από το μίγμα εχο-β-γλυκανάσης (20 U/mL) και β-γλυκοσιδάσης (4 U/mL) σε 200 mM ρυθμιστικό οξικού νατρίου (pH 5.0) στον πυθμένα κάθε σωλήνα, το μίγμα αναδεύεται σε αναδευτήρα vortex και επωάζεται σε λουτρό 40°C για 60 min.
11. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 3 mL μίγματος GOPOD (οξειδάσης-υπεροξειδάσης) και το μίγμα επωάζεται στους 40°C για 20 min.
12. Τέλος, μετράται η απορρόφηση όλων των διαλυμάτων στα 510 nm (εικόνα 4.18), έναντι λευκού αντιδραστηρίου. Μετράται και η απορρόφηση πρότυπου γλυκόζης.

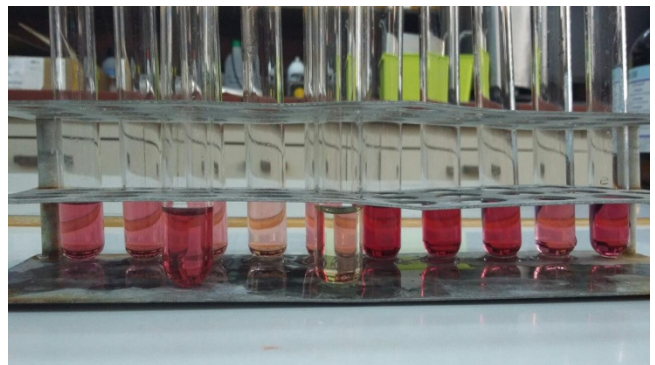


Εικόνα 4.18: Φασματοφωτόμετρο

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ α-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

Ακολουθεί η διαδικασία προσδιορισμού α-γλυκανών στα δείγματα, με διαλυτοποίηση, υδρόλυση και προσδιορισμό α-γλυκάνης, D-γλυκόζης από σακχαρόζη και ελεύθερη D-γλυκόζη, για δείγματα με περιεκτικότητα σε α-γλυκάνη μικρότερη του 10%.

1. Περίπου 100 mg αλεσμένου δείγματος (ζυγισμένα με ακρίβεια) τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα 20 x 125 mm. Ο σωλήνας ανακινείται ελαφρά ώστε να πέσει όλη η ποσότητα δείγματος στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα.
2. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 2 mL 2 M KOH, ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα vortex και επώαση για 20 min σε λουτρό νερού-πάγου, με ενδιάμεσες διακοπές για ανάδευση σε vortex, ώστε να ανασταλούν τα σχηματιζόμενα συσσωματώματα.
3. Προστίθενται 8 mL 1.2 M ρυθμιστικού οξικού νατρίου (pH 3.8) σε κάθε σωλήνα και αμέσως 0.2 mL αμυλογλυκοσιδάσης (1630 U/mL) με ιμπερτάση (500 U/mL). Οι σωλήνες αναδεύονται καλά και τοποθετούνται σε λουτρό 40°C.
4. Επωάζονται στους 40°C για 30 min με ενδιάμεσες διακοπές για ανάδευση σε vortex.
5. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα (περίπου 10.3 mL) φυγοκεντρείται σε 13000xg για 10 min.
6. Μεταφέρεται 0.1 mL του υπερκείμενου υγρού σε δοκιμαστικό σωλήνα (16 x 100 mm), προστίθενται 0.1 mL ρυθμιστικού οξικού νατρίου (200 mM, pH 5.0) και 3 mL αντιδραστηρίου GOPOD. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στους 40°C για 20 min (εικόνα 4.19).
7. Μετράται η απορρόφηση όλων των διαλυμάτων στα 510 nm, έναντι



Εικόνα 4.19: Δοκιμαστικοί σωλήνες προτού μετρηθεί η απορρόφηση στα 510 nm.

λευκού αντιδραστηρίου. Μετράται και η απορρόφηση πρότυπου γλυκόζης.

Τόσο στον προσδιορισμό Α (ολικών γλυκανών) όσο και στον προσδιορισμό Β (α-γλυκανών), το λευκό αντιδραστήριο παρασκευάζεται κάθε φορά με 0.2 mL ρυθμιστικού οξικού νατρίου (200 mM, pH 5.0) και 3.0 mL αντιδραστηρίου GOPOD. Το διάλυμα του πρότυπου της γλυκόζης παρασκευάζεται με 0.1 mL έτοιμου πρότυπου γλυκόζης (μπουκάλι 5), 0.1 mL ρυθμιστικού οξικού νατρίου (200 mM, pH 5.0) και 3.0 mL αντιδραστηρίου GOPOD.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

$$\text{Ολικές γλυκάνες} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \Delta E \cdot F \cdot \frac{100}{0.1} \cdot \frac{1}{100} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{162}{180} = \Delta E \cdot \frac{F}{m} \cdot 90 \quad (\text{σχέση 4.14})$$

$$\alpha - \text{γλυκάνες} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \Delta E \cdot F \cdot 103 \cdot \frac{1}{100} \cdot \frac{100}{m} \cdot \frac{162}{180} = \Delta E \cdot \frac{F}{m} \cdot 9.27 \quad (\text{σχέση 4.15})$$

$$\beta - \text{γλυκάνες} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \text{Ολικές γλυκάνες} - \alpha - \text{γλυκάνες} \quad (\text{σχέση 4.16})$$

Όπου, ΔΕ: η διαφορά της απορρόφηση δείγματος και της απορρόφησης λευκού

F: παράγοντας μετατροπής απορρόφησης σε μg D-γλυκόζης=100 (μg πρότυπου γλυκόζης)/απορρόφηση GOPOD για 100 μg πρότυπου D-γλυκόζης

100/0.1: παράγοντας διόρθωσης όγκου (για ολικές γλυκάνες)

103: παράγοντας διόρθωσης όγκου (για α-γλυκάνες)

1/1000: μετατροπή από μg σε mg

100/m: μετατροπή πίσω σε 100 mg δείγματος

m: μάζα δείγματος που αναλύεται (σε mg)

162/180: παράγοντας μετατροπής από ελεύθερη D-γλυκόζη (όπως προσδιορίζεται) σε ανυδρογλυκόζη, όπως προκύπτει στη β-γλυκάνη.

4.4.3 Μέτρηση Υγρασίας Πρώτων Υλών

Στις πρώτες ύλες, (όπως προμηθεύονται τα *Ganoderma lucidum* και *Grifola frondosa*, μετά από ξήρανση με κατάψυξη, άλεση και κοσκίνιση τα *Lentinula edodes*, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*) προσδιορίζεται η περιεχόμενη υγρασία, ώστε όλοι οι υπολογισμοί να αναχθούν σε ξηρό βάρος (ξ.β.). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές και λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών.

Σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης (με το πώμα) (εικόνα 4.20), τοποθετείται ορισμένη ποσότητα αφυδατωμένης πρώτης ύλης (ζυγισμένη σε αναλυτικό ζυγό). Το φιαλίδιο με το δείγμα εισάγεται σε φούρνο θερμοκρασίας 150°C, αφού αφαιρεθεί το πώμα, όπου παραμένει για 1 ημέρα. Την επόμενη ημέρα, τοποθετείται το πώμα, ζυγίζεται και υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε υγρασία



σύμφωνα με τη σχέση 4.17. Οι ζυγίσεις στο κενό φιαλίδιο και στο φιαλίδιο με το δείγμα πραγματοποιούνται μετά από παραμονή σε ξηραντήρα για 30 min.

$$\text{Υγρασία} \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{m_{\alpha\rho\chi} - m_{\tau\epsilon\lambda}}{m_{\alpha\rho\chi}} \quad (\text{σχέση 4.17})$$

Όπου, $m_{\alpha\rho\chi}$ και $m_{\tau\epsilon\lambda}$ η αρχική και τελική μάζα της πρώτης ύλης αντίστοιχα (σε g).

Εικόνα 4.20: Φιαλίδια μέτρησης υγρασίας: (1) *Ganoderma lucidum*, (2) *Lentinula edodes* και (1') *Grifola frondosa*

4.5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο σχεδιασμός πειραμάτων διακρίνεται στην απομόνωση πρωτεϊνών και απομόνωση υδατανθράκων και συγκεκριμένα β-γλυκανών. Πρώτα θα αναφερθεί ο σχεδιασμός πειραμάτων απομόνωσης πρωτεϊνών και στη συνέχεια απομόνωσης β-γλυκανών.

Ι. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ – ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑΤΩΝ)

Πίνακας 4.1: Σχεδιασμός πειραμάτων απομόνωσης πρωτεϊνών

Είδος μανιταριού	Εκχύλιση	Καταβύθιση
<i>Ganoderma lucidum</i>	pH=10 ή pH=7, t=1 h, T=40°C	pI=3.00
<i>Lentinula edodes</i>	pH=10 ή pH=7, t=1 h, T=40°C	pI=3.60
<i>Grifola frondosa</i>	pH=10 ή pH=7, t=1 h, T=40°C	pI=3.25 ή pI=3.60
<i>Tuber melanosporum</i>	pH=10, t=1 h, T=40°C	pI=3.00
<i>Tuber aestivum</i>	pH=10, t=1 h, T=40°C	pI=3.00

Για τα είδη μανιταριών *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* και *Grifola frondosa*, εξετάζεται επιπλέον και ο καθαρισμός του παραλαμβανόμενου πρωτεϊνικού συμπυκνώματος, δηλαδή εξετάζεται η παραλαβή συμπυκνώματος χωρίς καθαρισμό όπως και με καθαρισμό μέσω διαδοχικών εκπλύσεων με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης και ακετόνης.

Για τα είδη τρούφας *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*, λόγω περιορισμένης ποσότητας πρώτης ύλης εξετάζεται μόνο η περίπτωση καθαρισμού του παραλαμβανόμενου πρωτεϊνικού συμπυκνώματος με διαδοχικές εκπλύσεις και των δύο υδατικών διαλυμάτων.

II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ – ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
(ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑΤΩΝ)

Πίνακας 4.2: Σχεδιασμός πειραμάτων απομόνωσης β-γλυκανών

Είδος μανιταριού	Εκχύλιση		Συμπύκνωση	Εκπλύσεις με αιθανόλη και ακετόνη
	Υπέρηχοι (US)	Μικροκύματα (MW)		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ισχύς =320 W, συχνότητα US=37 kHz, T=40°C, t=30, 55 ή 80 min	Ισχύς =400 W, 232 rpm, T=40°C, t=5, 15 ή 30 min	✓	✓
<i>Lentinula edodes</i>	Ισχύς =320 W, συχνότητα US=37 kHz, T=40°C, t=30, 60 ή 90 min	Ισχύς =400 W, 232 rpm, T=40°C, t=5, 15 ή 30 min	✓	✓
<i>Grifola frondosa</i>	Ισχύς =320 W, συχνότητα US=37 kHz, T=40°C, t=30, 55 ή 80 min	Ισχύς =400 W, 232 rpm, T=40°C, t=5, 15 ή 30 min	✓	✓
<i>Tuber melanosporum</i>	Ισχύς =320 W, συχνότητα US=37 kHz, T=40°C, t=60 min	Ισχύς =400 W, 232 rpm, T=40°C, t=30 min	✓	✓
<i>Tuber aestivum</i>	Ισχύς =320 W, συχνότητα US=37 kHz T=40°C, t=60 min	Ισχύς =400 W, 232 rpm, T=40°C, t=30 min	✓	✓

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Statistica 7 και οι πίνακες που προκύπτουν παρατίθενται στο Παράρτημα της εργασίας.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν ανά πρώτη ύλη, δηλαδή ανά είδος μανιταριού, η σύσταση (%υγρασία, %πρωτεΐνες, %έλαιο, %ολικές γλυκάνες, %β-γλυκάνες) και τα αποτελέσματα απομόνωσης πρωτεϊνικών και υδατανθρακικών συστατικών.

5.1 GANODERMA LUCIDUM

5.1.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης

Στον πίνακα 5.1 βρίσκονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού υγρασίας, πρωτεϊνών, ολικών και β-γλυκανών και ελαίου στην πρώτη ύλη του *Ganoderma lucidum*, η οποία προμηθεύτηκε σε ξηρή μορφή, επομένως προηγήθηκε μόνο κοσκίνιση (0.5 mm). Όλες οι τιμές αναφέρονται επί ξηρού βάρους (%ξ.β.). Ήταν διαθέσιμοι δύο τύποι *G. lucidum*, κινεζικής και ελληνικής προέλευσης.

Πίνακας 5.1: Σύσταση πρώτης ύλης *Ganoderma lucidum* (%ξ.β.)

%	Ελληνικό	Κινεζικό
Υγρασία	12.7±0.08	10.8±0.03
Πρωτεΐνες	8.6±1.06	6.3±0.01
Έλαιο	0.5±0.05	3.3±0.05
Ολικές γλυκάνες	26.9±0.03	27.7±0.02
β-γλυκάνες	26.3±0.04	23.3±0.04

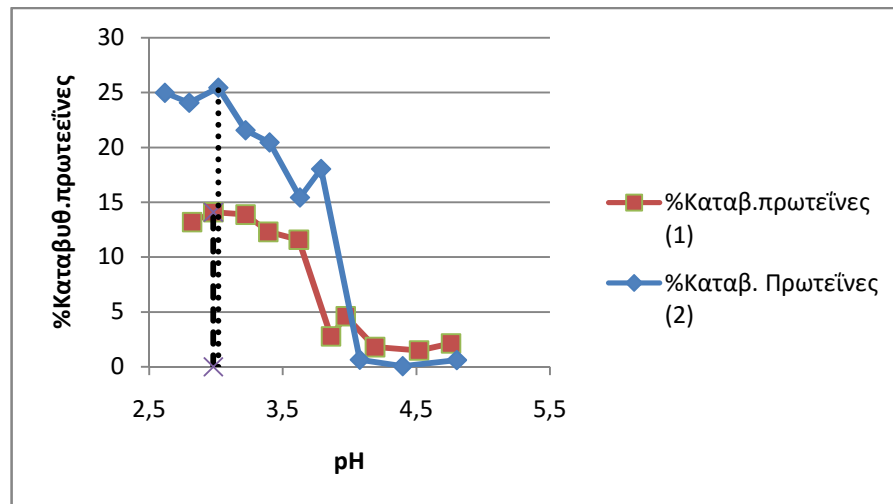
Στη βιβλιογραφία αναφέρονται οι τιμές: 26-28% υδατάνθρακες, 3-5% λίπος και 7-8% πρωτεΐνη. Οι τιμές αυτές συμφωνούν εν μέρει με τις πειραματικά προσδιοριζόμενες και πιο συγκεκριμένα ως προς τις πρωτεΐνες και το έλαιο (του κινεζικού μόνο). Η μεγάλη διαφορά στην περιεκτικότητα ελαίου μεταξύ ελληνικού και κινεζικού πιθανώς οφείλεται σε ενδεχόμενη απελαίωση του ελληνικού από την εταιρεία παραγωγής πριν τη συσκευασία του. Η %περιεκτικότητα σε ολικές και β-γλυκάνες είναι αρκετά ικανοποιητική για την απομόνωσή τους, σε αντίθεση με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο που δεν καθιστά το *Ganoderma lucidum* ως ικανή πρώτη ύλη για την παρασκευή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο προϊόντων *G. lucidum* οφείλονται εν μέρει στις διαφορές καλλιέργειας των δύο πρώτων υλών, που επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τη σύσταση του μανιταριού, αλλά και στο διαφορετικό χρόνο αποθήκευσής τους, που για το κινεζικό ήταν αρκετά μεγαλύτερος. Επιπλέον, λόγω του ότι παρελήφθησαν σε αφυδατωμένη μορφή, δεν είναι γνωστή η τεχνική ξήρανσης που χρησιμοποιήθηκε, με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η υποβάθμιση του προϊόντος ως προς τα θρεπτικά-βιοδραστικά του συστατικά.

5.1.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού Σημείου (pI)

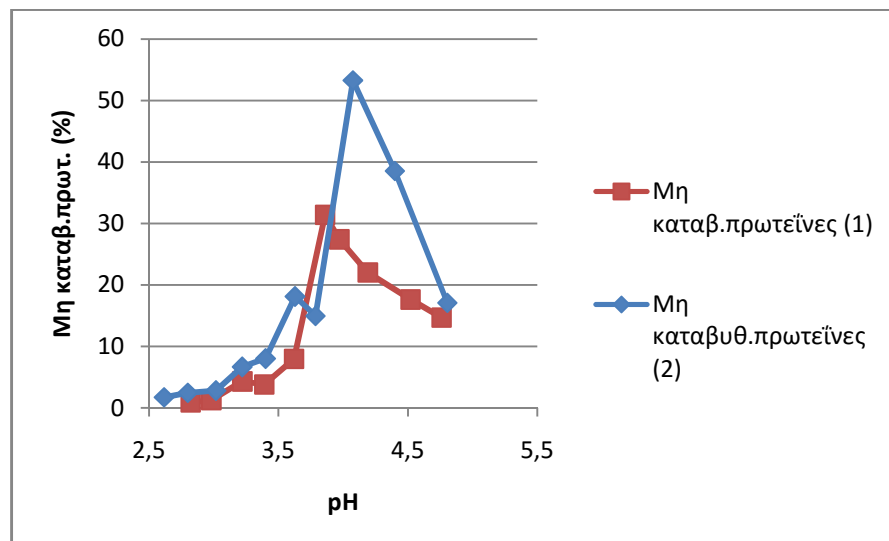
Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) των πρωτεϊνών, δηλαδή η τιμή pH που αντιστοιχεί στην ελάχιστη διαλυτότητα και άρα τη μέγιστη καταβύθισή τους, προσδιορίζεται με δύο τρόπους: άμεσα με μέτρηση του βάρους των καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών (%καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες) και έμμεσα με θολωσιμετρία (θολότητα του υπερκείμενου υγρού) (%μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες).

Στα ακόλουθα διαγράμματα φαίνεται το %ποσοστό καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών (διάγραμμα 5.1), από το οποίο λαμβάνεται η μέγιστη τιμή (max) ως pI, καθώς αντιστοιχεί στη μέγιστη καταβύθιση των περιεχόμενων πρωτεϊνών και το %ποσοστό μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών (διάγραμμα 5.2), που προσδιορίστηκαν μέσω θολωσιμετρίας, από το οποίο λαμβάνεται το ελάχιστο (min), αφού αντιστοιχεί σε ελάχιστη θολότητα υπερκείμενου υγρού άρα μέγιστη καταβύθιση.

Τα δεδομένα των διαγραμμάτων βρίσκονται στους πίνακες 7.1 και 7.2 του παραρτήματος όπου ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε *Ganoderma lucidum* (ελληνικό). Οι τιμές (1) και (2) αναφέρονται στις δύο σειρές πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του pI.



Διάγραμμα 5.1: %Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες συναρτήσει του pH για το *Ganoderma lucidum* (ελληνικό)



Διάγραμμα 5.2: %Μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες συναρτήσει του pH για το *Ganoderma lucidum* (ελληνικό)

Σύμφωνα με το διάγραμμα 5.1, το pI αντιστοιχεί σε τιμή pH 2.98-3.00, ως το pH μέγιστης καταβύθισης και φαίνεται ότι συμφωνούν τα αποτελέσματα των δύο σειρών πειραμάτων. Το διάγραμμα 5.2 δείχνει ότι η ελάχιστη θολότητα (ή μέγιστη καταβύθιση) αντιστοιχεί σε τιμή pH 2.60-2.80, με διαφορά 0.2 στην κλίμακα pH μεταξύ των δύο σειρών πειραμάτων.

Ο προσδιορισμός pI μέσω θολωσιμετρίας, ως έμμεσος, θεωρείται λιγότερο ακριβής, επομένως λαμβάνεται η τιμή pH 3.00 ως pI των πρωτεϊνών του *Ganoderma lucidum*.

$$pI_{Ganoderma\ lucidum} = 3.00$$

5.1.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκχύλισης πρωτεϊνών από το *Ganoderma lucidum* (ελληνικό) παρέχονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 5.2. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων και το pH καταβύθισης ήταν για όλες $pI = 3.00$, όπως προσδιορίστηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Οι παράμετροι που ερευνώνται είναι το pH εκχύλισης (ουδέτερο ή βασικό) και το μέσο καθαρισμού (υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης ή ακετόνης). Υπενθυμίζεται ότι η πρώτη ύλη έχει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 8.6%.

1. Η υδατική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε pH εκχύλισης 10. Μετά την καταβύθιση σε $pH=3.01$, η ποσότητα συμπυκνώματος ως προς τη μάζα πρώτης ύλης που εκχυλίστηκε ήταν ίση με 2.17% w/w (g συμπυκνώματος που παραλήφθηκε/g πρώτης ύλης, ξ.β.). Το συμπύκνωμα έχει %περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 18.22%. Ως αποτέλεσμα, η διεργασία έχει ολική απόδοση ~4.6%, ενώ πιο συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση εκχύλισης (55.2%) και απόδοση απομόνωσης ίση με ~8.3% που κρίνει απαραίτητο τον καθαρισμό του συμπυκνώματος, ώστε να αυξηθεί η καθαρότητα του συμπυκνώματος σε πρωτεΐνη.
2. Η υδατική εκχύλιση πραγματοποιείται σε μικρότερη τιμή pH, δηλαδή 7. Απομονώνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 0.83% από την πρώτη ύλη. Το συμπύκνωμα που απομονώνεται περιέχει 19.2% πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε σημαντική ελάττωση τόσο της ολικής (~1.9%) όσο και της απόδοσης απομόνωσης (~3.7%). Η απόδοση εκχύλισης (~50.5%) κινείται στα ίδια περίπου επίπεδα με την πρώτη σειρά, πέραν μίας μικρής μείωσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι όσο το pH εκχύλισης μειώνεται, μειώνεται και η συνολική απόδοση των πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας σημαντική απώλεια πρωτεϊνών σε ενδιάμεσα στάδια.
3. Επιλέγεται pH εκχύλισης 10 και η καταβύθιση γίνεται σε pH 3.00. Από την πρώτη ύλη απομονώνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 1.35% μετά από καθαρισμό (διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης), το οποίο έχει περιεκτικότητα πρωτεϊνών 51.73%. Ο καθαρισμός οδηγεί σε παρασκεύασμα πολύ υψηλότερης καθαρότητας σε πρωτεΐνη, αυξάνοντας παράλληλα και την ολική απόδοση (~8.1%) και φυσικά την απόδοση απομόνωσης (~25.4%). Σημειώνεται σημαντική μείωση στην απόδοση εκχύλισης, καθώς λαμβάνει την τιμή 31.9%.
4. Στην τελευταία σειρά πειραμάτων, οι πρωτεΐνες εκχυλίζονται και πάλι σε pH 10 και καταβυθίζονται σε pH 3.00. Από την πρώτη ύλη απομονώνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 1.35% μετά από καθαρισμό (διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα

ακετόνης), το οποίο έχει περιεκτικότητα πρωτεϊνών 45.36%. Η χρήση διαλύματος ακετόνης ως μέσο καθαρισμού των πρωτεϊνών του συμπυκνώματος προκαλεί μείωση σε όλους τους όρους απόδοσης που μελετώνται, δηλαδή ολική απόδοση ~7.1%, εκχύλισης ~29.6% και απομόνωσης ~23.9%, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ισοπροπανόλη μπορεί να θεωρηθεί πιο κατάλληλο μέσο καθαρισμού πρωτεϊνών από το *Ganoderma lucidum*, καθώς οδηγεί σε πρωτεϊνικό προϊόν υψηλότερης καθαρότητας και με υψηλότερες αποδόσεις.

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Ganoderma lucidum*

Πείραμα	1	2	3 (Καθαρισμός με ισοπροπανόλη)	4 (Καθαρισμός με ακετόνη)
pH εκχύλισης	10	7	10	10
% συμπύκνωμα (w/w)	2.17	0.83	1.35	1.35
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	18.22	19.21	51.73	45.36
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	3.83	4.33	6.12	6.38
% Απόδοση εκχύλισης	55.20	50.45	31.90	29.55
% Απόδοση απομόνωσης	8.28	3.68	25.42	23.93
% Ολική απόδοση	4.57	1.86	8.11	7.07

5.1.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρώτη ύλη *Ganoderma lucidum* έχει περιεκτικότητα 26.93% ολικές και 26.25% β-γλυκάνες (ενώ το κινεζικό 27.72% ολικές και 22.81% β-γλυκάνες). Οι διαφορές μεταξύ των δύο πρώτων υλών είναι μικρές, οφείλονται όμως στη διαφορετική καλλιέργειά τους. Τα πειράματα εκχύλισης πραγματοποιούνται με χρήση του ελληνικού *Ganoderma lucidum*. Όπως φαίνεται, οι α-γλυκάνες αποτελούν ένα σχεδόν αμελητέο ποσοστό των ολικών γλυκανών, ενώ οι β-γλυκάνες καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές με τη βιβλιογραφία, όπου υποστηρίζεται ότι το *Ganoderma lucidum* έχει περιεχόμενο β-γλυκανών τουλάχιστον 50% (w/w, ξ.β.), δηλαδή το διπλάσιο περίπου από αυτό που προσδιορίστηκε στην παρούσα εργασία. Η μεγάλη αυτή διαφορά οφείλεται σε μεγαλύτερο βαθμό στην άγνωστη και ίσως ακατάλληλη τεχνική ξήρανσης που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και σε πειραματικά σφάλματα.

Με υπέρηχους

Αρχικά, μελετάται η εκχύλιση υδατανθρακικών συστατικών με υπέρηχους συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Οι υπόλοιπες παράμετροι εκχύλισης (αναλογία υγρού/στερεού, θερμοκρασία, ισχύς υπερήχων) διατηρούνται σταθερές. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στους

πίνακες 5.3-5.4 για τις ολικές και β-γλυκάνες αντίστοιχα, οι οποίες εμφανίζουν παρόμοια εξάρτηση - συμπεριφορά αυξανόμενου του χρόνου εκχύλισης.

1. Χρόνος εκχύλισης t=30 min. Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα με βάρος 0.78% ως προς την πρώτη ύλη και με περιεκτικότητα 21.87% ολικές γλυκάνες και 19.58% β-γλυκάνες. Το συμπύκνωμα επομένως έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες από ότι η πρώτη ύλη και το στερεό υπόλειμμα, άρα η εκχύλιση σε αυτές τις συνθήκες δεν αποφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η συμπεριφορά αυτή εκφράζεται και με τους όρους ολικής απόδοσης <1%, απόδοσης εκχύλισης (~7.7%) και απομόνωσης (~7.9%), οι οποίοι είναι όλοι χαμηλοί.
2. Χρόνος εκχύλισης t=55 min. Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα με βάρος 1.14% ως προς την πρώτη ύλη και με περιεκτικότητα 23.61% ολικές γλυκάνες και 22.98% β-γλυκάνες. Οι αποδόσεις υπολογίζονται ως εξής: ολική 1.0%, εκχύλισης ~8.8% και απομόνωσης ~11.4% υπάρχει δηλαδή αύξηση τόσο της καθαρότητας του παρασκευάσματος (χωρίς όμως να ξεπεράσει της πρώτης ύλης ή του στερεού υπολείμματος) όσο και των όρων απόδοσης της διεργασίας. Παρότι υπάρχει αύξηση, δεν έχουν βρεθεί οι κατάλληλες συνθήκες εκχύλισης/απομόνωσης γλυκανών του *G. lucidum*.
3. Χρόνος εκχύλισης t=80 min. Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα με βάρος 1.84% ως προς την πρώτη ύλη και με περιεκτικότητα 21.99% ολικές γλυκάνες και 21.43% β-γλυκάνες. Οι αποδόσεις υπολογίζονται ως εξής: ολική 1.5%, εκχύλισης ~18.0% και απομόνωσης ~8.4%. Υπάρχει αξιοσημείωτη αύξηση της απόδοσης εκχύλισης που συνοδεύεται όμως από πτώση της απόδοσης απομόνωσης, με αποτέλεσμα η ολική απόδοση να εμφανίζει πολύ μικρή αύξηση. Ως προς την καθαρότητα του παρασκευάσματος, παρατηρείται πτώση που σε συνδυασμό με τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανότατα υπάρχουν παράγοντες που παρεμποδίζουν την εκχύλιση και απομόνωση γλυκανών, όπως ενδογενή ένζυμα ή άλλα διαλυτά υλικά όπως σάκχαρα, αμινοξέα ή φαινόλες.

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με υπέρηχους του *Ganoderma lucidum*

t (min)	30	55	80
% συμπύκνωμα (w/w)	0.78	1.14	1.84
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	21.87	23.61	21.99
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	24.75	24.62	22.48
% Απόδοση εκχύλισης	8.48	9.47	18.62
% Απόδοση απομόνωσης	7.43	10.55	8.09
% Ολική απόδοση	0.63	1.00	1.51

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με υπέρηχους του *Ganoderma lucidum*

t (min)	30	55	80
% συμπύκνωμα (w/w)	0.78	1.14	1.84
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	19.58	22.98	21.43
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	24.52	24.35	22.25
% Απόδοση εκχύλισης	7.00	8.15	17.35
% Απόδοση απομόνωσης	8.27	12.23	8.68
% Ολική απόδοση	0.58	1.00	1.51

Με μικροκύματα

Η μελέτη εκχύλισης υδατανθρακικών συστατικών με μικροκύματα πραγματοποιείται συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης με σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους (αναλογία υγρού/στερεού, θερμοκρασία, ισχύς μικροκυμάτων). Τα αποτελέσματα βρίσκονται στους πίνακες 5.5-5.6 (ολικές και β-γλυκάνες αντίστοιχα).

1. Χρόνος εκχύλισης t=5 min. Λαμβάνεται συμπύκνωμα πολυσακχαριτών βάρους 1.73% ως προς την πρώτη ύλη και καθαρότητας 27.54% ολικές και 26.96% β-γλυκάνες, δηλαδή εμπλουτίζεται σε γλυκάνες σε σχέση με την πρώτη ύλη και το στερεό υπόλειμμα, έστω και σε τόσο μικρό βαθμό. Η διεργασία έχει ολική απόδοση ~1.8%, εκχύλισης ~12.0% και απομόνωσης ~14.8 %.
2. Χρόνος εκχύλισης t=15 min. Λαμβάνεται συμπύκνωμα πολυσακχαριτών βάρους 0.64% ως προς την πρώτη ύλη. Το συμπύκνωμα περιέχει 27.44% ολικές και 25.84% β-γλυκάνες, δηλαδή λίγο χαμηλότερης καθαρότητας από το παρασκεύασμα των 5 min. Οι όροι ολικής (-0.6%) και απόδοσης απομόνωσης (-3.0%) μειώνονται σημαντικά λόγω της πολύ μικρότερης ποσότητας συμπυκνώματος που απομονώνεται, παρότι επιτυγχάνεται πολύ καλύτερη εκχύλιση (απόδοσης 21.5%), άρα υπάρχει μεγάλη απώλεια γλυκανών στο στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος.
3. Χρόνος εκχύλισης t=30 min. Λαμβάνεται συμπύκνωμα πολυσακχαριτών βάρους 0.78% ως προς την πρώτη ύλη και έχει τη μεγαλύτερη καθαρότητα από όλα τα συμπυκνώματα (29.09% ολικές και 28.34% β-γλυκάνες). Ωστόσο, ποσοτικά παραλαμβάνεται πολύ μικρή ποσότητα συμπυκνώματος, με αποτέλεσμα η διεργασία να αποκτά συντελεστές απόδοσης: ολική 0.85%, εκχύλισης ~9.4% και απομόνωσης ~9.1%.

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με μικροκύματα του *Ganoderma lucidum*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	1.73	0.64	0.78
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	27.54	27.44	29.09
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	25.52	23.09	26.02
% Απόδοση εκχύλισης	12.60	21.49	10.17
% Απόδοση απομόνωσης	14.01	3.03	8.37
% Ολική απόδοση	1.77	0.65	0.85

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με μικροκύματα του *Ganoderma lucidum*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	1.73	0.64	0.78
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	26.96	25.84	28.34
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	25.21	22.50	25.79
% Απόδοση εκχύλισης	11.45	21.52	8.67
% Απόδοση απομόνωσης	15.49	2.92	9.80
% Ολική απόδοση	1.77	0.63	0.85

Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η υποβοηθούμενη με μικροκύματα εκχύλιση (microwave assisted extraction) οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα για το *G. lucidum*, καθώς οδηγεί σε υδατανθρακικό κλάσμα υψηλότερης καθαρότητας με καλύτερη απόδοση. Παρόλα αυτά, η διεργασία δεν ενδείκνυται για την εκχύλιση υδατανθρακικών κλασμάτων λόγω παρεμποδιστικών παραγόντων, οι οποίοι θα μπορούσαν να αποφευχθούν με κατάλληλη προκατεργασία αναστολής τους.

5.2 LENTINULA EDODES

5.2.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης

Η σύσταση του *Lentinula edodes* όπως προσδιορίζεται πειραματικά αναγράφεται στον πίνακα 5.7. Ως προς το πρωτεϊνικό περιεχόμενο και το περιεχόμενο β-γλυκανών οι πειραματικά προσδιορισμένες τιμές συμφωνούν με της βιβλιογραφίας (22.3% πρωτεΐνη, 38.6% β-γλυκάνες), ενώ πολύ κοντά βρίσκονται και οι ολικές γλυκάνες (44.5% στη βιβλιογραφία). Το ίδιο ισχύει για το περιεχόμενο έλαιο, αφού η βιβλιογραφία αναφέρει ότι περιέχει έλαιο 2.95%.

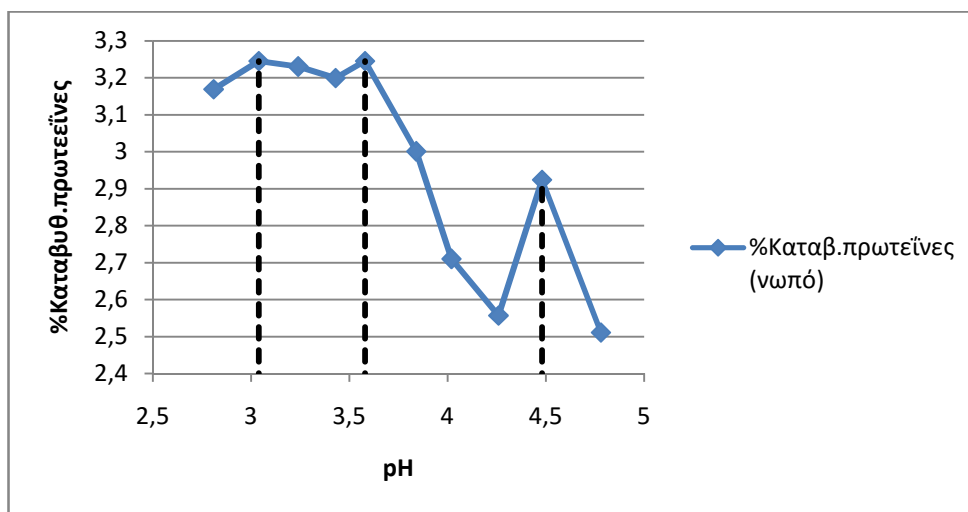
Πίνακας 5.7: Σύσταση πρώτης ύλης *Lentinula edodes* (%ξ.β.)

%Υγρασία	10.7±0.49
%Πρωτεΐνες	22.5±0.33
%Έλαιο	3.2±0.02
%Ολικές γλυκάνες	38.3±0.04
%β-γλυκάνες	37.5±0.04

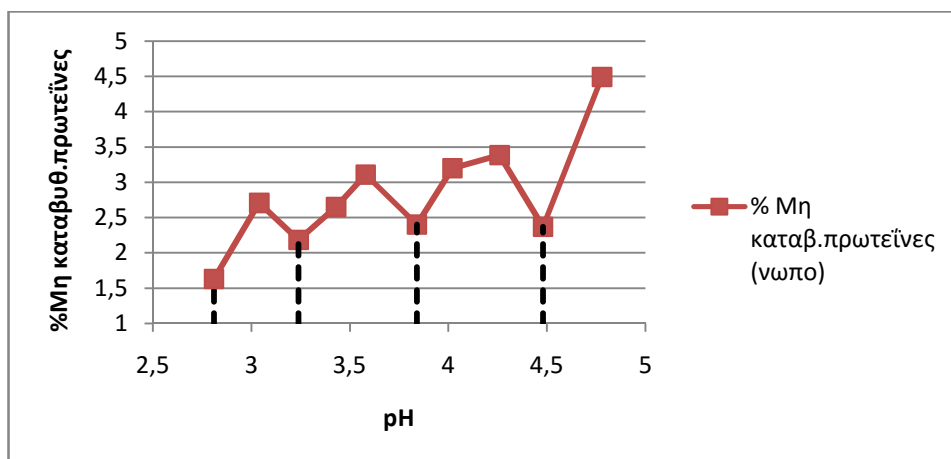
5.2.2 Προσδιορισμός Ισοηλεκτρικού Σημείου Πρωτεϊνών (pI)

Στα διαγράμματα 5.3-5.6 φαίνονται οι %καταβυθιζόμενες και %μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες του *Lentinula edodes* από νωπή και ξηρή πρώτη ύλη συναρτήσεως του pH. Λόγω των μεγάλων διαφορών μεταξύ τους, προτιμάται να μελετηθούν χωριστά τα διαγράμματα που προκύπτουν. Έτσι, παρουσιάζονται τα διαγράμματα 5.3-5.4 από νωπή και τα διαγράμματα 5.5-5.6 από

αφυδατωμένη πρώτη ύλη. Τα δεδομένα των διαγραμμάτων βρίσκονται στους πίνακες 7.3-7.4 του Παραρτήματος.

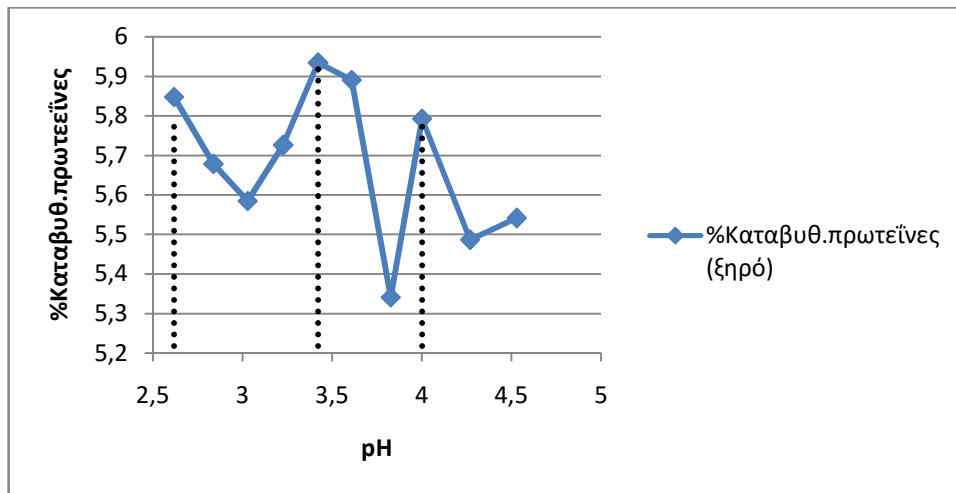


Διάγραμμα 5.3: %Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από νωπή *L. edodes*

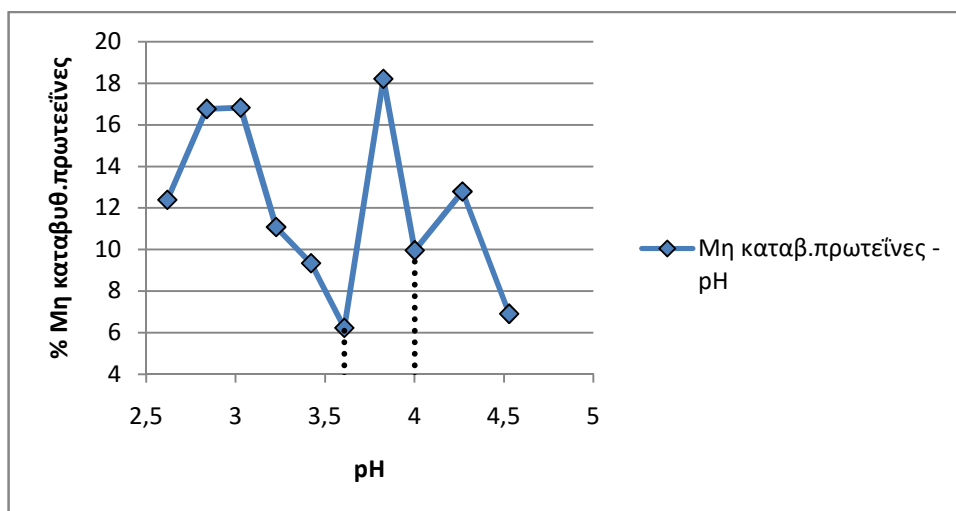


Διάγραμμα 5.4: %Μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από φρέσκια *L. edodes*

Τα αποτελέσματα καταβύθισης συναρτήσεϊ του pH με νωπό *L. edodes* ως πρώτη ύλη υποδεικνύουν την τιμή pH 4.50 ως κοινό σημείο μέγιστης καταβύθισης. Το διάγραμμα %καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών (διάγραμμα 5.3) εμφανίζει ολικό μέγιστο και σε τιμή pH 3.0 και 3.60. Το διάγραμμα 5.4, %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών, εμφανίζει ελάχιστη τιμή σε pH 2.80 και τοπικά ελάχιστα σε pH 3.20, 3.80 και 4.50.



Διάγραμμα 5.5: %Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από ξηρή *L. Edodes*



Διάγραμμα 5.6: %Μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από νωπή *L. Edodes*

Χρησιμοποιώντας αφυδατωμένη *L. edodes* ως πρώτη ύλη για τον προσδιορισμό του pI , τα αποτελέσματα είναι λίγο διαφορετικά. Στο διάγραμμα 5.5, οι καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες εμφανίζουν ολικό μέγιστο σε pH 3.40 και τοπικά μέγιστα σε pH 2.60 και 4.00. Οι μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες (διάγραμμα 5.6) εμφανίζουν ολικό ελάχιστο σε pH 3.60 και τοπικά ελάχιστα σε pH 2.60, 4.00 και 4.50. Παρότι η καταβύθιση είναι υψηλή σε τιμές $pH < 3.00$, δεν λαμβάνονται ως ισοηλεκτρικά σημεία, καθώς σε τόσο χαμηλό pH παρασύρονται και άλλα ανεπιθύμητα συστατικά (χρωστικές και άλλα) που δυσχεραίνουν την απομόνωση και καθαρισμό των πρωτεϊνών.

Από τα παραπάνω, επιλέγεται ως ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών του *L. edodes* το pH 3.60 και τα ακόλουθα πειράματα απομόνωσης θα πραγματοποιηθούν στην τιμή αυτή. Δηλαδή:

$$pI_{Lentinula\ edodes} = 3.60$$

5.2.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Πραγματοποιούνται πέντε σειρές πειραμάτων εκχύλισης πρωτεϊνών από *Lentinula edodes*, από τις οποίες χρησιμοποιείται νωπή πρώτη ύλη στην πρώτη και αφυδατωμένη στις υπόλοιπες με μεταβλητή το pH εκχύλισης και τη χρήση υδατικών διαλυμάτων ισοπροπανόλης ή ακετόνης ως μέσα καθαρισμού. Σε όλες τις σειρές πειραμάτων η καταβύθιση πραγματοποιείται σε $\text{pH } 3.60$, όπως προσδιορίζεται στην προηγούμενη παράγραφο. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 5.8.

1. Η εκχύλιση γίνεται σε νωπή πρώτη ύλη σε pH 10. Το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 5.61% ως προς την πρώτη ύλη και περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό 28.33%, που είναι η χαμηλότερη περιεκτικότητα συγκριτικά με τα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα από ξηρή *L.edodes*. Η διεργασία έχει την ελάχιστη απόδοση εκχύλισης (52.7%), ενώ η ολική απόδοση (~7.1%) και η απόδοση απομόνωσης (~13.4%) βρίσκονται επίσης σε χαμηλά επίπεδα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, καθώς δεν επιτυγχάνεται επαρκής μεταφορά των πρωτεϊνών από το σώμα του μανιταριού στο εκχυλιστικό μέσο.
2. Οι συνθήκες εκχύλισης παραμένουν ίδιες με του πρώτου πειράματος (pH εκχύλισης 10.0, χωρίς χρήση καθαριστικού μέσου) αλλά σε αφυδατωμένη *L. edodes*. Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 9.30% w/w από την πρώτη ύλη που είναι το μεγαλύτερο και τελικά οδηγεί στην υψηλότερη ολική απόδοση (16.21%), παρότι υστερεί σε καθαρότητα συγκριτικά με τα συμπυκνώματα που περνούν από το στάδιο καθαρισμού (39.14% πρωτεΐνη). Στο πείραμα αυτό επιτυγχάνεται η υψηλότερη απόδοση απομόνωσης (23.93%) με σημαντική διαφορά.
3. Με χρήση αφυδατωμένης *L. edodes* πραγματοποιείται εκχύλιση σε pH 7.0 και παραλαμβάνεται συμπύκνωμα (3.37% w/w ως προς την πρώτη ύλη) καθαρότητας 35.77% σε πρωτεΐνες. Όπως ήταν αναμενόμενο, η διεργασία παρουσιάζει την ελάχιστη ολική απόδοση (~5.4%) καθώς και απόδοση απομόνωσης (~7.7%), υποδεικνύοντας ότι είναι απαραίτητο βασικό και όχι ουδέτερο pH κατά τη διάρκεια εκχύλισης πρωτεϊνών από μανιτάρια. Η απόδοση εκχύλισης κινείται σε αντίστοιχες τιμές με τις υπόλοιπες σειρές πειραμάτων (~69.3%).
4. Οι πρωτεΐνες εκχυλίζονται από ξηρή πρώτη ύλη σε pH 10.0 και στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης. Με τη χρήση αυτού του καθαριστικού μέσου, παραλαμβάνεται μικρότερη ποσότητα συμπυκνώματος σε σχέση με την αρχική (3.94% w/w) εμφανίζει όμως τη μέγιστη καθαρότητα (51.26% πρωτεΐνες). Η διεργασία έχει ολική απόδοση 9.00%, απόδοση εκχύλισης 70.97% και απομόνωσης 12.68%.
5. Οι συνθήκες της πέμπτης σειράς πειραμάτων είναι ίδιες με της τέταρτης, με μόνη διαφορά τη χρήση υδατικού διαλύματος ακετόνης για τον καθαρισμό του συμπυκνώματος. Το συμπύκνωμα έχει καθαρότητα 47.80% σε πρωτεΐνες, δηλαδή λίγο μικρότερη από του προηγούμενου και λόγω του ότι παραλαμβάνεται μεγαλύτερη ποσότητα (5.55% w/w σε σχέση με την αρχική) η ολική απόδοση αυξάνεται (~11.8%), με τις επιμέρους αποδόσεις να εμφανίζουν την ίδια τάση: ~72.9% εκχύλισης και 16.2% απομόνωσης).

Πίνακας 5.8: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Lentinula edodes*

Πείραμα	1 (νωπό)	2	3	4 (Καθαρισμός με ισοπροπανόλη)	5 (Καθαρισμός με ακετόνη)
pH εκχύλισης	10	10	7	10	10
% συμπύκνωμα (w/w)	5.61	9.30	3.37	3.94	5.55
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	28.33	39.14	35.77	51.26	47.80
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	13.00	13.24	13.00	13.03	12.24
% Απόδοση εκχύλισης	52.70	67.72	69.29	70.97	72.86
% Απόδοση απομόνωσης	13.44	23.93	7.74	12.68	16.20
% Ολική απόδοση	7.08	16.21	5.36	9.00	11.81

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι παρότι δεν προκύπτει πρωτεϊνικό συμπύκνωμα με επαρκή καθαρότητα, ο καθαρισμός με διάλυμα ακετόνης οδηγεί σε πρωτεϊνικό παρασκεύασμα καθαρότητας ~50%. Επιπλέον, δεν ενδείκνυται η χρήση νωπής πρώτης ύλης μανιταριού για την εκχύλιση και απομόνωση πρωτεϊνικών συστατικών, ενώ ως προς τις συνθήκες εκχύλισης προτείνεται βασικό pH.

5.2.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών

Από ανάλυση ολικών και β-γλυκανών σε αφυδατωμένη *Lentinula edodes*, προσδιορίζεται ότι η πρώτη ύλη περιέχει 38.3% ολικές γλυκάνες και 37.5% β-γλυκάνες (ξ.β.) και στην παρούσα παράγραφο θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσής τους για την παρασκευή υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων. Αρχικά θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα εκχύλισης με υπέρηχους (πίνακες 5.9-5.10) και ακολούθως με μικροκύματα (5.11-5.12).

Με υπέρηχους

1. Χρόνος εκχύλισης t=30 min. Το συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 2.52% w/w ως προς την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 6.90% ολικές και 6.26% β-γλυκάνες, δηλαδή πολύ χαμηλότερη καθαρότητα σε γλυκάνες τόσο από την πρώτη ύλη όσο και από το στερεό υπόλειμμα. Η ολική απόδοση είναι επίσης πολύ χαμηλή, ~0.4% λόγω της μικρής απόδοσης απομόνωσης (~0.6%). Παρότι η εκχύλιση έχει καλή απόδοση, ~66.5%, οι γλυκάνες που εκχυλίζονται αδυνατούν να απομονωθούν με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

2. Χρόνος εκχύλισης t=60 min. Με αύξηση του χρόνου εκχύλισης, σημειώνεται σημαντική μείωση του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος (1.62% w/w ως προς την πρώτη ύλη) και παρότι έχει μεγαλύτερη καθαρότητα σε ολικές γλυκάνες (7.94%) και παρόμοια περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (6.90%), η διεργασία χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ολική απόδοση (~0.3%), καθώς υπάρχει πτώση και στην απόδοση εκχύλισης (~65.5%) και στην απόδοση απομόνωσης (~0.4%). Ούτε σε αυτή την περίπτωση έγινε δυνατή η παραλαβή εμπλουτισμένου υδατανθρακικού κλάσματος.
3. Χρόνος εκχύλισης t=90 min. Επιπλέον αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε συμπύκνωμα μεγαλύτερης ποσότητας (2.62% w/w της πρώτης ύλης) και με μεγαλύτερη καθαρότητα (10.50% ολικές και 9.45% β-γλυκάνες). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη μέγιστη επιτυγχανόμενη ολική απόδοση (~0.6%), όπου η εκχύλιση κινείται στα ίδια επίπεδα με τα προηγούμενα (~65.2%), αλλά η απομόνωση εμφανίζει αυξημένη απόδοση (~0.95%). Παρόλα αυτά, ούτε και σε αυτή την περίπτωση επιτυγχάνεται η παραλαβή κλάσματος εμπλουτισμένου σε γλυκάνες.

Πίνακας 5.9: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με υπέρηχους του *Lentinula edodes*

t (min)	30	60	90
% συμπύκνωμα (w/w)	2.52	1.62	2.62
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	6.90	7.94	10.50
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	31.97	34.63	35.19
% Απόδοση εκχύλισης	66.17	64.93	64.98
% Απόδοση απομόνωσης	0.61	0.46	0.98
% Ολική απόδοση	0.40	0.30	0.63

Πίνακας 5.10: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με υπέρηχους του *Lentinula edodes*

t (min)	30	60	90
% συμπύκνωμα (w/w)	2.52	1.62	2.62
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	6.26	6.90	9.45
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	33.22	33.20	34.18
% Απόδοση εκχύλισης	66.89	65.82	65.41
% Απόδοση απομόνωσης	0.55	0.40	0.89
% Ολική απόδοση	0.37	0.26	0.58

Με μικροκύματα

Παρατίθενται τα αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης υδατανθρακικών κλασμάτων με μικροκύματα συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (5, 15 και 30 min).

1. Χρόνος εκχύλισης t=5 min. Το συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 2.10% w/w σε σχέση με την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 5.53% σε ολικές γλυκάνες και 4.82% σε β-γλυκάνες. Η ολική απόδοση υπολογίζεται ίση με ~0.26%, με τις επιμέρους αποδόσεις στο ~66.1% (εκχύλισης) και ~0.34% (απομόνωσης). Η μεγαλύτερη απώλεια υφίσταται

στο στάδιο απομόνωσης, στο οποίο οι εκχυλισμένες γλυκάνες δεν καταφέρνουν να απομονωθούν από το εκχύλισμα (υδατικό) στο συμπύκνωμα.

2. Χρόνος εκχύλισης t=15 min. Αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε μείωση της ποσότητας παραλαμβανόμενου εκχυλίσματος (1.96% w/w ως προς την πρώτη ύλη) και ταυτόχρονη αύξηση της καθαρότητάς του, καθώς έχει περιεκτικότητα 9.61% ολικές και 8.89% β-γλυκάνες. Τελικά, παρατηρείται αύξηση της ολικής απόδοσης (~0.42%) καθώς και των επιμέρους αποδόσεων (~67.4% απόδοση εκχύλισης και ~0.63% απομόνωσης), χωρίς όμως να επιτυγχάνεται ο στόχος παραλαβής κλασμάτων εμπλουτισμένων σε γλυκάνες.
3. Χρόνος εκχύλισης t=30 min. Περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε επιπλέον μείωση της ποσότητας του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος (1.62% w/w ως προς την πρώτη ύλη) και αύξηση της καθαρότητάς του (περιεκτικότητα σε ολικές και β-γλυκάνες 10.61% και 9.58% αντίστοιχα). Παρόλο που η απόδοση εκχύλισης αυξάνεται (~68.7%), η απόδοση απομόνωσης εμφανίζει μικρότερη τιμή από την αντίστοιχη των 15 min (~0.56%) και τελικά μικρή μείωση εμφανίζει και η ολική απόδοση (~0.38%).

5.11: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με μικροκύματα του *Lentinula edodes*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	2.10	1.96	1.62
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	5.53	9.61	10.61
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	31.33	32.62	30.79
% Απόδοση εκχύλισης	65.71	67.02	68.25
% Απόδοση απομόνωσης	0.41	0.65	0.58
% Ολική απόδοση	0.27	0.43	0.40

5.11: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με μικροκύματα του *Lentinula edodes*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	2.10	1.96	1.62
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	4.82	8.89	9.58
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	30.09	31.41	29.50
% Απόδοση εκχύλισης	66.52	67.71	69.07
% Απόδοση απομόνωσης	0.36	0.60	0.53
% Ολική απόδοση	0.24	0.41	0.36

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τόσο η εκχύλιση με υπέρηχους όσο και με μικροκύματα οδηγούν σε υψηλές τιμές απόδοσης εκχύλισης και αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε συμπύκνωμα μεγαλύτερης καθαρότητας. Για την παραλαβή όμως υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων με ικανοποιητική απόδοση είναι απαραίτητη η διερεύνηση διαφορετικών τεχνικών καθαρισμού ή κατάλληλη προκατεργασία της πρώτης ύλης πριν την εκχύλιση με στόχο την απενεργοποίηση ενζύμων που παρεμποδίζουν την απομόνωση των γλυκανών αλλά και την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών.

5.3 GRIFOLA FRONDOSA

5.3.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης

Ακολουθεί η σύσταση της αφυδατωμένης πρώτης ύλης από μανιτάρι *Grifola frondosa*, όπως προσδιορίζεται από αναλυτικά πειράματα που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

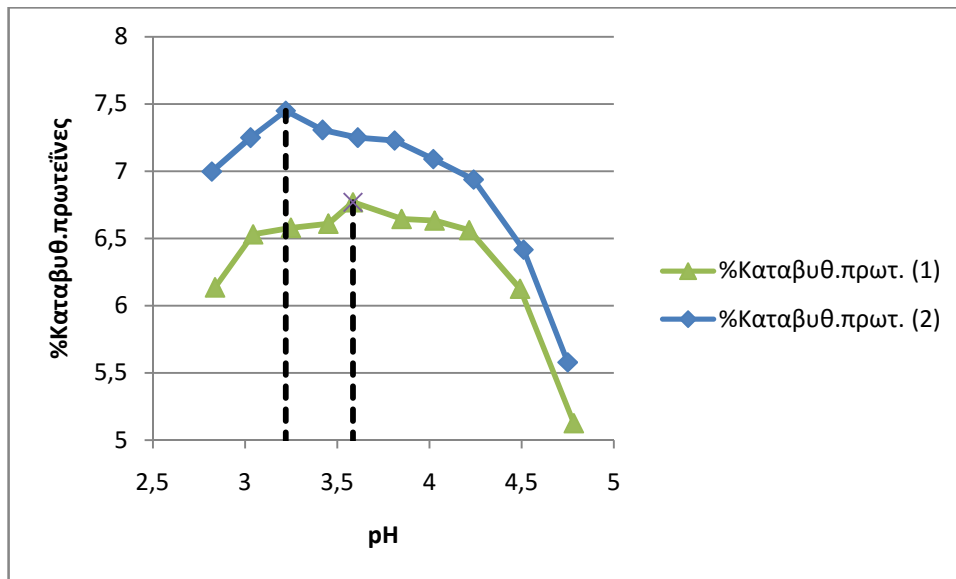
Πίνακας 5.12: Σύσταση πρώτης ύλης *Grifola frondosa* (%ξ.β.)

%Υγρασία	9.7±0.24
%Πρωτεΐνες	14.7±0.27
%Έλαιο	3.3±0.01
%Ολικές γλυκάνες	44.2±0.03
%β-γλυκάνες	42.2±0.04

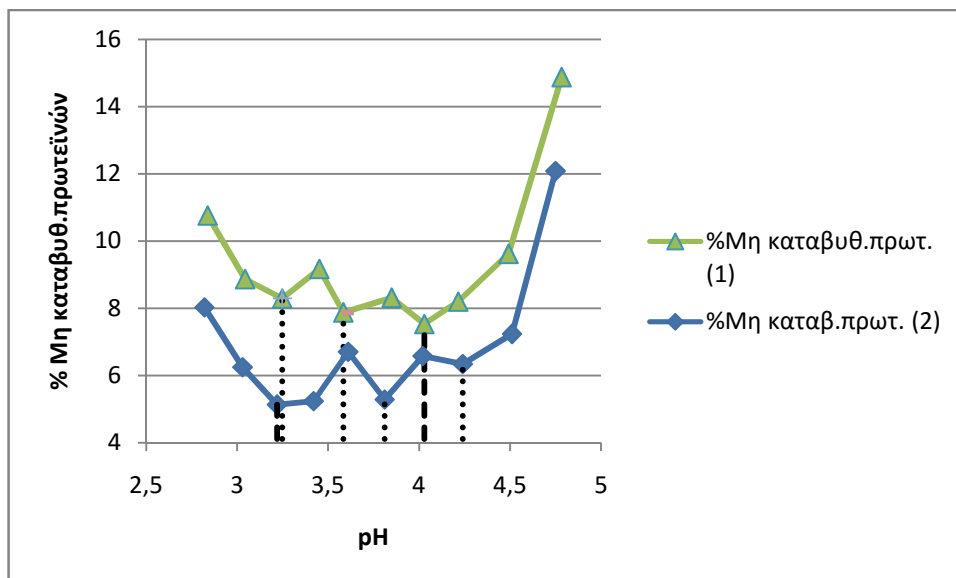
Η βιβλιογραφία αναφέρει για αφυδατωμένη *G. frondosa* τις εξής τιμές: 21% πρωτεΐνη, 3% έλαιο, 44.5% ολικές γλυκάνες και 38.6% β-γλυκάνες. Όπως φαίνεται, πέραν του πρωτεϊνικού περιεχομένου, υπάρχει μεγάλη συμφωνία μεταξύ πειραματικά προσδιοριζόμενων τιμών και τιμών της βιβλιογραφίας. Οι μικρές διαφορές που εμφανίζονται στο περιεχόμενο β-γλυκανών και ελαίου, οφείλονται πιθανότατα στην καλλιέργεια της συγκεκριμένης ποικιλίας και είναι μέσα στο όριο του αποδεκτού. Σημαντική διαφορά υπάρχει στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο της πρώτης ύλης. Πιθανή αιτία είναι η ενδεχόμενη υποβάθμιση των πρωτεϊνών του μανιταριού κατά την αφυδάτωσή τους.

5.3.2 Προσδιορισμός Ισηλεκτρικού Σημείου Πρωτεϊνών (pI)

Πραγματοποιούνται δύο σειρές πειραμάτων για τον προσδιορισμό του ισηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών του *Grifola frondosa*. Στο διάγραμμα 5.7 βρίσκονται τα αποτελέσματα του ποσοστού καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για την πρώτη και δεύτερη σειρά πειραμάτων, ενώ στο διάγραμμα 5.8 τα αποτελέσματα ποσοστού μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών στο αιώρημα συναρτήσει του pH καταβύθισης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από το διάγραμμα καταβυθισμένων λαμβάνεται το μέγιστο, ενώ από το διάγραμμα μη καταβυθιζόμενων το ελάχιστο. Τα δεδομένα με βάση τα οποία κατασκευάζονται τα δύο ακόλουθα διαγράμματα βρίσκονται στους πίνακες 7.5-7.6 του παραρτήματος.



Διάγραμμα 5.7: %Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από *G. frondosa*



Διάγραμμα 5.8: %Μη καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες από *G. frondosa*

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δεν συμφωνούν ως προς το σημείο pH μέγιστης καταβύθισης (διάγραμμα 5.7), καθώς η πρώτη σειρά υποδεικνύει τιμή pH 3.60, ενώ η δεύτερη την τιμή pH 3.20. Ούτε στο διάγραμμα 5.8 υπάρχει συμφωνία ως προς το ελάχιστο σημείο μη καταβυθισμένων πρωτεϊνών, καθώς η πρώτη σειρά υποδεικνύει pH 4.00 ενώ η δεύτερη pH 3.20, με τοπικά ελάχιστα σε pH 3.20, 3.60, 3.80 και 4.20.

Λόγω της μεγαλύτερης αξιοπιστίας του προσδιορισμού pI μέσω της άμεσης μεθόδου %καταβυθισμένων πρωτεϊνών, ελήφθησαν ως pI οι τιμές pH 3.25 και 3.60, δηλαδή:

$$pI_{Grifola\ frondosa} = 3.25\ \text{και}\ 3.60$$

Τα πειράματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *G. frondosa* πραγματοποιήθηκαν στις δύο αυτές τιμές pH.

5.3.3 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Η εκχύλιση πρωτεϊνών του *Grifola frondosa* πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικές τιμές pI , $pI_1=3.25$ και $pI_2=3.60$. Υπενθυμίζεται ότι η πρώτη ύλη έχει περιεκτικότητα 14.7% πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα απομόνωσης πρωτεϊνικών κλασμάτων μέσω καταβύθισης σε $pI=3.25$ βρίσκονται στον πίνακα 5.13, ενώ σε $pI=3.60$ στον πίνακα 5.14.

$pI=3.25$

1. Το pH εκχύλισης είναι 10 και δεν ακολουθεί κάποιος καθαρισμός του συμπυκνώματος. Το συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 15.58% ως προς την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 32.71% πρωτεΐνες. Η εκχύλιση έχει ιδιαίτερα υψηλή απόδοση ~76.6%, απόδοση απομόνωσης ~45.2% και ολική απόδοση ~34.6%. Όλες οι αποδόσεις είναι σε υψηλά επίπεδα και η περιεκτικότητα του συμπυκνώματος σε πρωτεΐνες είναι περίπου η διπλάσια της πρώτης ύλης.
2. Το pH εκχύλισης είναι 7. Η μείωση αυτή του pH εκχύλισης οδηγεί σε πολύ μεγάλη μείωση της ποσότητας παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος (0.78% ως προς την πρώτη ύλη) και αντίστοιχα της απόδοσης απομόνωσης (~1.8%) άρα και ολικής απόδοσης (1.3%). Η απόδοση εκχύλισης παρουσιάζει μικρή μείωση και υπολογίζεται ίση με ~71.5%.
3. Με pH εκχύλισης 10 και καθαρισμό με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης, παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 8.22% ως προς την αρχική ποσότητα. Έχει καθαρότητα 42.62% πρωτεΐνες. Η απόδοση εκχύλισης παρουσιάζει μικρή μείωση (~70.8%) που πιθανώς οφείλεται στην ελάττωση της κλίμακας του πειράματος. Η απόδοση απομόνωσης υπολογίζεται ~33.6% και η ολική ~23.8%.
4. Με pH εκχύλισης 10 και καθαρισμό με υδατικό διάλυμα ακετόνης, παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 9.52% ως προς την πρώτη ύλη και καθαρότητας 44.29% πρωτεΐνες. Η αύξηση τόσο της ποσότητας του συμπυκνώματος όσο και της καθαρότητάς του, οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης απομόνωσης (~40.9%) και της ολικής απόδοσης στο ~28.7%. Η μικρή μείωση της απόδοσης εκχύλισης οφείλεται πιθανώς στην ελαττωμένη κλίμακα πειράματος.

Πίνακας 5.13: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Grifola frondosa* σε $pI=3.25$

Πείραμα	1	2	3 (Καθαρισμός με ισοπροπανόλη)	4 (Καθαρισμός με ακετόνη)
pH εκχύλισης	10	7	10	10
% συμπύκνωμα (w/w)	15.58	0.78	8.22	9.52
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	32.71	24.50	42.62	44.29
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	6.65	7.92	7.77	7.11
% Απόδοση εκχύλισης	76.63	71.45	70.76	70.10
Απόδοση απομόνωσης	45.21	1.82	33.62	40.87
Ολική απόδοση	34.64	1.30	23.79	28.65

Όσον αφορά τα συμπυκνώματα που παραλήφθηκαν με καταβύθιση σε $pI=3.25$, χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλές τιμές απόδοσης εκχύλισης που υποδεικνύουν ότι το *G. frondosa* είναι ενδεχομένως καλή πρώτη ύλη για την εκχύλιση πρωτεϊνών.

$pI=3.60$

1. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε pH 10 και δεν ακολουθεί κάποιος καθαρισμός του συμπυκνώματος. Έτσι, παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 13.06% ως προς την πρώτη ύλη με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 35.23%. Η απόδοση εκχύλισης έχει τη μέγιστη τιμή της (~83.9%), η απόδοση απομόνωσης λαμβάνει την τιμή ~37.3% με αποτέλεσμα η ολική απόδοση να διαμορφώνεται στην τιμή ~31.3%.
2. Το pH εκχύλισης μειώνεται στην τιμή 7 και δεν ακολουθεί καθαρισμός. Το ποσοστό συμπυκνώματος ως προς την πρώτη ύλη είναι ίσο με 0.70% και έχει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ίση με 42.48%. Η απόδοση εκχύλισης είναι ίση με ~70.5% ενώ η απόδοση απομόνωσης ~2.9% και η ολική απόδοση ~2.0%. Παρότι αυξήθηκε η καθαρότητα, μειώθηκαν όλοι οι συντελεστές απόδοσης όπως ήταν αναμενόμενο λόγω του χαμηλού pH εκχύλισης.
3. Με pH εκχύλισης 10 και καθαρισμό με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης, παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 8.63% ως προς την πρώτη ύλη με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 45.48%. Η απόδοση εκχύλισης είναι ~76.8%, απομόνωσης ~34.7% και η ολική απόδοση ~26.7%.
4. Με pH εκχύλισης 10 και καθαρισμό με υδατικό διάλυμα ακετόνης, παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 9.44% με περιεκτικότητα πρωτεϊνών 43.01%. Η απόδοση εκχύλισης υπολογίζεται ~67.7%, απομόνωσης ~40.8% ενώ η ολική απόδοση 27.6%. Παρατηρείται ότι η χρήση ακετόνης ως μέσου καθαρισμού αυξάνει την απόδοση απομόνωσης, όχι όμως και την καθαρότητα του πρωτεϊνικού συμπυκνώματος σε σύγκριση με τη χρήση ισοπροπανόλης.

Πίνακας 5.14: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Grifola frondosa* σε $pI=3.60$

Πείραμα	1	2	3 (Καθαρισμός με ισοπροπανόλη)	4 (Καθαρισμός με ακετόνη) ¹
pH εκχύλισης	10	7	10	10
% συμπύκνωμα (w/w)	13.06	0.70	8.63	9.44
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	35.23	42.48	45.48	43.01
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	5.19	7.66	6.12	6.88
% Απόδοση εκχύλισης	83.88	70.45	76.82	67.68
% Απόδοση απομόνωσης	37.28	2.86	34.73	40.79
% Ολική απόδοση	31.27	2.01	26.68	27.61

Η καταβύθιση σε $ri=3.25$ οδηγεί σε συνδυασμό με καθαρισμό με υδατικό διάλυμα ακετόνης σε πρωτεϊνικό συμπύκνωμα υψηλότερης καθαρότητας με καλύτερες ολικές αποδόσεις από ότι η καταβύθιση σε $ri=3.60$. Η καταβύθιση σε $ri=3.60$, παρουσιάζει υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης και συνδυάζεται καλύτερα με τη χρήση διαλύματος ισοπροπανόλης για την παραλαβή πρωτεϊνικού παρασκευάσματος υψηλής καθαρότητας.

Με βάση το σύνολο των αποτελεσμάτων απομόνωσης πρωτεϊνικών κλασμάτων από το *G. frondosa*, το μανιτάρι αυτό παρουσιάζει πολύ καλή συμπεριφορά ως προς την εκχύλιση πρωτεϊνών με υψηλή ολική απόδοση. Παρότι το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα που προκύπτει δεν μπορεί να χαρακτηριστεί πρωτεϊνικό άλευρο, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στην αρχική σύστασή του (χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες), το *G. frondosa* κρίνεται ως ικανοποιητική πρώτη ύλη για την εκχύλιση πρωτεϊνών.

5.3.4 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών

Η πρώτη ύλη αφυδατωμένης *Grifola frondosa* έχει σύσταση σε γλυκάνες: 44.2% ολικές και 42.2% β-γλυκάνες (ξ.β.). Τα αποτελέσματα απομόνωσης των γλυκανών και παρασκευής εμπλουτισμένων κλασμάτων φαίνονται στους πίνακες 5.15-5.16 με τη χρήση υπέρηχων και στους πίνακες 5.17-5.18 με τη χρήση μικροκυμάτων.

Με υπέρηχους

1. Χρόνος εκχύλισης $t=30$ min: Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 3.31% σε σχέση με την πρώτη ύλη που εκχυλίστηκε και η περιεκτικότητά του είναι 42.89% ολικές γλυκάνες και 32.21% β-γλυκάνες. Η περιεκτικότητα είναι χαμηλότερη από του στερεού υπολείμματος που σημαίνει ότι παρόλο που η εκχύλιση βρισκόταν σε σχετικά καλό επίπεδο (απόδοση εκχύλισης ~48.7%) δεν επιτυγχάνεται απομόνωση των β-γλυκανών (απόδοση απομόνωσης ~3.0% για ολικές και ~10.0% για β-γλυκάνες). Η τιμή της ολικής απόδοσης διαμορφώνεται στην τιμή ~4.9%.
2. Χρόνος εκχύλισης $t=55$ min: Αύξηση του χρόνου εκχύλισης οδηγεί σε μείωση τόσο της ποσότητας συμπυκνώματος (2.43%) όσο και της περιεκτικότητάς του σε ολικές (33.80%) και β-γλυκάνες (27.50%). Έτσι, σημειώνεται μείωση της ολικής απόδοσης (~2.2%). Στην περίπτωση ολικών γλυκανών σημειώνεται σημαντική μείωση της απόδοσης εκχύλισης (~40.9%) και αύξηση της απόδοσης απομόνωσης (~4.5%). Στην περίπτωση β-γλυκανών, παρατηρείται μικρή αύξηση της απόδοσης εκχύλισης (~44.1%) και μείωση της απόδοσης απομόνωσης (~3.6%). Άρα, πέραν της ολικής απόδοσης που συμπεριφέρεται όμοια για τις ολικές και β-γλυκάνες, οι αποδόσεις εκχύλισης και απομόνωσης συμπεριφέρονται αντιστρόφως.
3. Χρόνος εκχύλισης $t=80$ min: Επιπλέον αύξηση του χρόνου εκχύλισης προκαλεί σημαντική αύξηση του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος (10.71%) αλλά και της περιεκτικότητάς του σε ολικές (48.67%) και β-γλυκάνες (31.51%). Οι ολικές γλυκάνες του συμπυκνώματος ξεπερνούν ελάχιστα την αντίστοιχη τιμή περιεκτικότητας του στερεού υπολείμματος, δεν ισχύει το ίδιο όμως και για τις β-γλυκάνες όπου η τιμή περιεκτικότητας του συμπυκνώματος είναι κατά πολύ χαμηλότερη από του στερεού υπολείμματος. Οι τιμές απόδοσης λαμβάνουν τις τιμές ~47.0% (απόδοση εκχύλισης),

~20.9% (απόδοση απομόνωσης) και ~9.9% (ολική απόδοση). Είναι αξιοσημείωτη η αύξηση τόσο της απόδοσης εκχύλισης όσο και απομόνωσης, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη ποσότητα συμπυκνώματος που απομονώθηκε. Η απόδοση εκχύλισης βρίσκεται και εκείνη σε υψηλά επίπεδα και αποκτά τη μέγιστη τιμή της στην περίπτωση των β-γλυκανών.

Πίνακας 5.15: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με υπέρηχους του *Grifola frondosa*

t (min)	30	55	80
% συμπύκνωμα (w/w)	5.31	2.43	10.71
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	42.89	33.80	48.67
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	44.97	43.51	48.34
% Απόδοση εκχύλισης	54.10	40.93	48.30
% Απόδοση απομόνωσης	2.96	4.53	24.41
% Ολική απόδοση	5.15	1.86	11.79

Πίνακας 5.16: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με υπέρηχους του *Grifola frondosa*

t (min)	30	55	80
% συμπύκνωμα (w/w)	5.31	2.43	10.71
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	32.21	27.50	31.51
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	40.20	39.29	48.07
% Απόδοση εκχύλισης	43.38	44.05	46.07
% Απόδοση απομόνωσης	10.02	3.59	17.37
% Ολική απόδοση	4.56	1.58	8.00

Με μικροκύματα

1. Χρόνος εκχύλισης t=5 min: Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 3.01% με περιεκτικότητα 31.84% ολικές και 29.35% β-γλυκάνες. Η απόδοση εκχύλισης είναι ίση με ~38.9%, απομόνωσης ~5.1% και η ολική 2.1%. Τόσο οι τιμές περιεκτικότητας όσο και οι αποδόσεις είναι χαμηλές, γεγονός που δείχνει ότι ο χρόνος αυτός δεν επαρκεί για την απομόνωση των γλυκανών.
2. Χρόνος εκχύλισης t=15 min: Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 3.27% ως προς την πρώτη ύλη, δηλαδή υπάρχει μία μικρή αύξηση και έχει περιεκτικότητα 38.59% σε ολικές και 33.15% σε β-γλυκάνες. Η αύξηση τόσο της ποσότητας συμπυκνώματος όσο και της καθαρότητάς του οδηγεί σε αύξηση όλων των συντελεστών απόδοσης, εκτός της απόδοσης απομόνωσης στην περίπτωση των β-γλυκανών που παρουσιάζει μικρή μείωση. Έτσι, οι τιμές των αποδόσεων διαμορφώνονται ως εξής: ~53.3% η απόδοση εκχύλισης, ~5.1% η απόδοση απομόνωσης και ~2.7% η ολική απόδοση.
3. Χρόνος εκχύλισης t=30 min: Η ποσότητα συμπυκνώματος εμφανίζει μικρή μείωση (3.06% ως προς την πρώτη ύλη) και η περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες αυξάνεται (40.71%), σε αντίθεση με την περιεκτικότητα β-γλυκανών που σημειώνει μικρή μείωση (32.42%). Η απόδοση εκχύλισης λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της (~56.8%) αλλά η απόδοση απομόνωσης (~4.6%) και η ολική απόδοση μειώνονται (~2.6%).

Πίνακας 5.17: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με μικροκύματα του *Grifola frondosa*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	3.01	3.27	3.06
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	31.84	38.59	40.71
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	42.71	39.02	39.66
% Απόδοση εκχύλισης	39.67	50.58	54.41
% Απόδοση απομόνωσης	5.46	5.63	5.18
% Ολική απόδοση	2.17	2.85	2.82

Πίνακας 5.18: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με μικροκύματα του *Grifola frondosa*

t (min)	5	15	30
% συμπύκνωμα (w/w)	3.01	3.27	3.06
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	29.35	33.15	32.42
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	38.20	33.12	33.79
% Απόδοση εκχύλισης	43.40	56.01	59.27
% Απόδοση απομόνωσης	4.83	4.58	3.97
% Ολική απόδοση	2.10	2.57	2.35

Από τα αποτελέσματα εκχύλισης πολυσακχαριτών με υπέρηχους και μικροκύματα, παρατηρείται ότι στην περίπτωση του *G. frondosa* η εκχύλιση με υπέρηχους παρουσιάζει υψηλότερες τιμές περιεκτικότητας σε ολικές γλυκάνες και υψηλότερες ολικές αποδόσεις και απομόνωσης, ενώ η εκχύλιση με μικροκύματα παρουσιάζει υψηλότερες τιμές περιεκτικότητας σε β-γλυκάνες αλλά και υψηλότερες τιμές απόδοσης εκχύλισης. Παρότι οι τιμές αποδόσεων εκχύλισης είναι ικανοποιητικές, κανένα συμπύκνωμα δεν ξεπέρασε σε περιεκτικότητα την πρώτη ύλη επομένως το στάδιο απομόνωσης χρήζει περισσότερης διερεύνησης.

5.4 TUBER MELANOSPORUM

5.4.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης

Ακολουθεί η σύσταση της αφυδατωμένης πρώτης ύλης από την τρούφα *Tuber melanosporum*, όπως προσδιορίζεται από αναλυτικά πειράματα που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Πίνακας 5.19: Σύσταση πρώτης ύλης *Tuber melanosporum* (%ξ.β.)

%Υγρασία	8.1±0.03
%Πρωτεΐνες	23.9±0.04
%Έλαιο	1.0±0.05
%Ολικές γλυκάνες	16.0±0.00
%β-γλυκάνες	8.6±0.02

Η βιβλιογραφία αναφέρει τις ακόλουθες τιμές για αφυδατωμένη τρούφα *T. melanosporum*: 27.6-31.7% πρωτεΐνες και 5-9% έλαιο. Η πειραματικά προσδιοριζόμενη τιμή πρωτεϊνικού περιεχόμενου πλησιάζει την τιμή της βιβλιογραφίας, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα σε έλαιο που προσδιορίστηκε αρκετά μικρότερη. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς σε πειραματικό σφάλμα κατά τη διάρκεια απελαίωσης ή στο στάδιο ωρίμανσης του μανιταριού, όπου πρόοδος της ωρίμανσης συνεπάγεται μείωση του λιπιδικού περιεχόμενου.

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο είναι αρκετά υψηλό ώστε να καθιστά δυνατή θεωρητικά την απομόνωση των πρωτεϊνών του *T. melanosporum* προς παρασκευή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ολικές και ιδίως β-γλυκάνες δεν είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκύψουν «υπερσυμπυκνώματα» γλυκανών σε καλή απόδοση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το περιεχόμενο σε α-γλυκάνες είναι υψηλότερο από όλα τα μανιτάρια που έχουν μελετηθεί στην παρούσα διπλωματική εργασία, μειώνοντας έτσι κατά πολύ την περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες, που αποτελούν το βιοδραστικό κλάσμα πολυσακχαριτών από μανιτάρια.

5.4.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Λόγω περιορισμένης διαθέσιμης ποσότητας του *Tuber melanosporum*, δεν έγινε προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών του, αλλά ελήφθη υπόψη το pI που προτείνει η βιβλιογραφία, δηλαδή το εύρος 5.85-7.80 ^[20]. Κατά τη διάρκεια της καταβύθισης όμως, δεν σημειώθηκε ικανοποιητική καταβύθιση των πρωτεϊνών του *T. melanosporum* σε pH 5.85, επομένως η καταβύθιση πραγματοποιήθηκε τελικά σε pH 3.00, άρα:

$$pI_{Tuber\ melanosporum} = 3.00$$

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης και στη συνέχεια ακετόνης. Τα αποτελέσματα της εκχύλισης και απομόνωσης των πρωτεϊνών του *T. melanosporum* παρουσιάζονται στον πίνακα 5.20.

Πίνακας 5.20: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Tuber melanosporum*

Πείραμα	pI=3.00 Καθαρισμός με ισοπροπανόλη και ακετόνη
ρΗ εκχύλισης	10
% συμπύκνωμα (w/w)	8.67
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	40.68
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	18.97
% Απόδοση εκχύλισης	54.12
% Απόδοση απομόνωσης	27.30
% Ολική απόδοση	14.78

Το συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 8.67% ως προς την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα πρωτεϊνών 40.68%, όπου ούτε σε αυτή την περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί έστω πρωτεϊνικό άλευρο, αλλά είναι από τις υψηλότερες τιμές πρωτεϊνικού συμπυκνώματος που επιτεύχθηκαν. Η απόδοση εκχύλισης υπολογίζεται ~54.1%, απομόνωσης 27.3% και έτσι η ολική απόδοση ~14.8%.

5.4.3 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών

Η εκχύλιση πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με υπέρηχους και μικροκύματα, χωρίς μεταβολή του χρόνου εκχύλισης λόγω περιορισμένης ποσότητας. Υπενθυμίζεται ότι η αφυδατωμένη πρώτη ύλη *Tuber melanosporum* περιέχει 16.0% ολικές και 8.6% β-γλυκάνες.

Με υπέρηχους

Επιλέχθηκε ως χρόνος εκχύλισης τα 60 min, με βάση τα προηγούμενα πειράματα εκχύλισης με υπέρηχους που πραγματοποιήθηκαν, καθώς τα 30 min δεν φαίνεται να επαρκούν για την εκχύλιση γλυκανών, ενώ τα 80 min πιθανώς τις υποβαθμίζουν. Έτσι λαμβάνονται τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Πίνακας 5.21: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με υπέρηχους του *Tuber melanosporum*

t (min)	60
% συμπύκνωμα (w/w)	1.72
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	19.78
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	17.36
% Απόδοση εκχύλισης	30.40
% Απόδοση απομόνωσης	6.98
% Ολική απόδοση	2.12

Δεν είναι διαθέσιμος ο αντίστοιχος πίνακας για τις β-γλυκάνες, διότι λόγω της πολύ χαμηλής περιεκτικότητας της πρώτης ύλης σε β-γλυκάνες (8.6%), δεν έγινε δυνατή η απομόνωσή τους.

Το συμπύκνωμα, λοιπόν, παραλαμβάνεται σε ποσοστό 1.72% ως προς την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 19.78% σε ολικές γλυκάνες, που ξεπερνά κατά λίγο την περιεκτικότητα του στερεού υπολείμματος και της πρώτης ύλης, που σημαίνει ότι η απομόνωση ολικών γλυκανών επιτεύχθηκε σε πολύ μικρό βαθμό. Η απόδοση εκχύλισης υπολογίζεται 30.4%, απομόνωσης ~7.0% και η ολική απόδοση ~2.1%.

Με μικροκύματα

Επιλέγεται ως χρόνος εκχύλισης τα 30 min, ώστε να επαρκεί για την εκχύλιση των γλυκανών. Τα αποτελέσματα για τις ολικές γλυκάνες βρίσκονται στον πίνακα 5.22, ενώ για τις β-γλυκάνες δεν είναι διαθέσιμα, καθώς δεν έγινε δυνατή η απομόνωσή τους λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της πρώτης ύλης σε α-γλυκάνες.

Πίνακας 5.22: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με μικροκύματα του *Tuber melanosporum*

t (min)	30
% συμπύκνωμα (w/w)	3.34%
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	23.17
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	18.60
% Απόδοση εκχύλισης	28.61
% Απόδοση απομόνωσης	16.89
% Ολική απόδοση	4.83

Το συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε ποσοστό 3.34% σε σχέση με την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 23.17% σε ολικές γλυκάνες, δηλαδή ξεπερνά τις αντίστοιχες τιμές του πειράματος εκχύλισης γλυκανών με υπέρηχους (80 min), τόσο ποσοτικά όσο και σχετικά με την καθαρότητά του. Η απόδοση εκχύλισης εμφανίζει μικρή μείωση (~28.6%), σε αντίθεση με την απόδοση απομόνωσης και ολική απόδοση που αυξάνονται (~16.9% και ~4.8% αντίστοιχα).

Επομένως, με πρώτη ύλη *Tuber melanosporum*, η εκχύλιση γλυκανών με μικροκύματα είναι πιο αποτελεσματική από ότι με υπέρηχους, αν και δεν επιτεύχθηκε συμπύκνωμα επιθυμητής καθαρότητας ή απόδοσης, κάτι αναμενόμενο λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκάνες της πρώτης ύλης.

5.5 TUBER AESTIVUM

5.5.1 Σύσταση Πρώτης Ύλης

Η σύσταση της τρούφας *Tuber aestivum*, όπως προέκυψε πειραματικά, παρουσιάζεται στον πίνακα 5.23.

Πίνακας 5.23: Σύσταση πρώτης ύλης *Tuber aestivum* (%ξ.β.)

%Υγρασία	5.9±0.02
%Πρωτεΐνες	18.2±0.04
%Έλαιο	2.1±0.04
%Ολικές γλυκάνες	18.8±0.00
%β-γλυκάνες	12.6±0.05

Η βιβλιογραφία αναφέρει τις ακόλουθες τιμές για το *T. aestivum*: 17.2-20.3% πρωτεΐνη, 2.27% λίπος και 47.0-54.7% ολικούς υδατάνθρακες. Όπως φαίνεται οι πειραματικά προσδιοριζόμενες τιμές είναι πολύ κοντά στις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Συγκριτικά με το *T. melanosporum*, το *T. aestivum* έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, αλλά υψηλότερη σε έλαιο. Όσον αφορά τις γλυκάνες, και το *T. aestivum* έχει σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε α-γλυκάνες, που παρεμποδίζουν την απομόνωση των β-γλυκανών από το κλάσμα των υδατανθράκων. Μεταξύ τους, το *T. aestivum* και *T. melanosporum* έχουν παρόμοιες περιεκτικότητες σε γλυκάνες, με το *T. aestivum* να έχει λίγο υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες και το *T. melanosporum* λίγο υψηλότερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες.

5.5.2 Εκχύλιση Πρωτεϊνών

Λόγω περιορισμένης ποσότητας δεν πραγματοποιήθηκε πειραματικός προσδιορισμός του pI , αλλά ελήφθη υπόψη η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το *T. melanosporum*, δηλαδή αρχικά δοκιμάστηκε το $pI=5.85$, αλλά η καταβύθιση τελικά πραγματοποιήθηκε σε pH 3.00, λόγω της περιορισμένης καταβύθισης που σημειώθηκε σε pH 5.85. Άρα,

$$pI_{Tuber\ aestivum} = 3.00$$

Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές πλύσεις με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης και στη συνέχεια ακετόνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.24.

Πίνακας 5.24: Αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης πρωτεϊνών από το *Tuber aestivum*

Πείραμα	$pI=3.00$ Καθαρισμός με ισοπροπανόλη και ακετόνη
pH εκχύλισης	10
% συμπύκνωμα (w/w)	0.62
% Πρωτεΐνη στο συμπύκνωμα (w/w)	51.64
% Πρωτεΐνη στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	16.67
% Απόδοση εκχύλισης	42.63
% Απόδοση απομόνωσης	4.15
% Ολική απόδοση	1.77

Το πρωτεϊνικό συμπύκνωμα παραλαμβάνεται σε πολύ μικρό ποσοστό 0.62% και έχει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 51.64%, έχει δηλαδή υψηλή καθαρότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα που παρασκευάστηκαν. Η απόδοση εκχύλισης υπολογίζεται ~42.6%, απομόνωσης ~4.2% και η ολική απόδοση ~1.8%. Όπως παρατηρείται όλες οι αποδόσεις είναι αρκετά μικρότερες από τις αντίστοιχες του *T. melanosporum*, γεγονός που οφείλεται στην πολύ μικρή ποσότητα συμπυκνώματος που απομονώθηκε, παρά την υψηλότερη καθαρότητά του.

5.5.3 Εκχύλιση Πολυσακχαριτών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαθέσιμη ποσότητα της τρούφας *T. aestivum* δεν ήταν αρκετά μεγάλη ώστε να δοκιμαστούν διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης των γλυκανών της. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα εκχύλισης με υπέρηχους σε χρόνο 60 min και ένα πείραμα με μικροκύματα σε χρόνο 30 min. Υπενθυμίζεται ότι η πρώτη ύλη περιέχει κατά 18.8% ολικές και 12.6% β-γλυκάνες.

Με υπέρηχους

Ο χρόνος εκχύλισης επιλέχθηκε να είναι ίσος με 60 min, ώστε να επαρκεί για την εκχύλιση των γλυκανών, χωρίς να τις υποβαθμίζει ενδεχομένως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 5.25-5.26.

Πίνακας 5.25: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με υπέρηχους του *Tuber aestivum*

t (min)	60
% συμπύκνωμα (w/w)	3.26
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	39.96
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	21.64
% Απόδοση εκχύλισης	46.65
% Απόδοση απομόνωσης	16.22
% Ολική απόδοση	6.92

Πίνακας 5.26: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με υπέρηχους του *Tuber aestivum*

t (min)	60
% συμπύκνωμα (w/w)	3.26
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	25.43
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	19.59
% Απόδοση εκχύλισης	22.24
% Απόδοση απομόνωσης	29.66
% Ολική απόδοση	6.60

Το συμπύκνωμα γλυκανών παραλαμβάνεται σε ποσοστό 3.26% ως προς την πρώτη ύλη και έχει περιεκτικότητα 39.96% ολικές γλυκάνες και 25.43% β-γλυκάνες, δηλαδή επιτεύχθηκε απομόνωση σε κάποιο βαθμό, όχι όμως ικανοποιητική. Η απόδοση εκχύλισης β-γλυκανών βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα με τιμή ~22.4%, σε αντίθεση με την απόδοση απομόνωσης

(-29.7%). Η απόδοση εκχύλισης ολικών γλυκανών υπολογίζεται ίση με ~46.7%, είναι δηλαδή αρκετά υψηλότερη από την αντίστοιχη των β-γλυκανών, γεγονός που οφείλεται στο σχετικά υψηλό ποσοστό α-γλυκανών. Η απόδοση απομόνωσης ολικών γλυκανών (~16.2%) είναι χαμηλότερη από των β-γλυκανών. Η ολική απόδοση λαμβάνει την τιμή ~6.8%.

Με μικροκύματα

Ως χρόνος εκχύλισης επιλέχθηκαν τα 30 min και τα αποτελέσματα εκχύλισης και απομόνωσης των γλυκανών του *T. aestivum* παρουσιάζονται στους πίνακες 5.27-5.28.

Πίνακας 5.27: Αποτελέσματα εκχύλισης ολικών γλυκανών με μικροκύματα του *Tuber aestivum*

t (min)	30
% συμπύκνωμα (w/w)	3.79
% Ολικές γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	31.91
% Ολικές γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	23.25
% Απόδοση εκχύλισης	21.62
% Απόδοση απομόνωσης	29.73
% Ολική απόδοση	6.43

Πίνακας 5.28: Αποτελέσματα εκχύλισης β-γλυκανών με μικροκύματα του *Tuber aestivum*

t (min)	30
% συμπύκνωμα (w/w)	3.79
% β- γλυκάνες στο συμπύκνωμα (w/w)	12.24
% β- γλυκάνες στο στερεό υπόλειμμα (w/w)	18.76
% Απόδοση εκχύλισης	5.27
% Απόδοση απομόνωσης	70.00
% Ολική απόδοση	3.69

Παραλαμβάνεται συμπύκνωμα σε ποσοστό 3.79% ως προς την πρώτη ύλη. Η περιεκτικότητά του σε ολικές γλυκάνες είναι ίση με 31.91% και σε β-γλυκάνες 12.24%, που σημαίνει ότι επιτεύχθηκε εν μέρει απομόνωση των ολικών γλυκανών, σε αντίθεση με τις β-γλυκάνες που το περιεχόμενο του συμπυκνώματος είναι μικρότερο από του στερεού υπολείμματος και περίπου ίσο με της πρώτης ύλης, άρα δεν έγινε δυνατή η απομόνωση των β-γλυκανών. Σχετικά με τις ολικές γλυκάνες, η απόδοση εκχύλισης κινείται σε χαμηλά επίπεδα (~21.6%), όπως και η ολική απόδοση ~6.4%). Η απόδοση απομόνωσης (~29.7%) είναι υψηλή σε σχέση με των υπόλοιπων μανιταριών. Σχετικά με τις β-γλυκάνες, προκύπτει ασυνήθιστα υψηλή τιμή απόδοσης απομόνωσης (70.0%) που οφείλεται όμως στην πολύ χαμηλή απόδοση εκχύλισης (~5.3%), γεγονός που σημαίνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των περιεχόμενων β-γλυκανών δεν εκχυλίστηκε αλλά έμεινε στο στερεό υπόλειμμα. Η ολική απόδοση υπολογίζεται ίση με ~3.7%.

Συγκριτικά, από τις δύο μεθόδους εκχύλισης πολυσακχαριτών που μελετήθηκαν, δηλαδή με υπέρηχους και μικροκύματα, η μεγαλύτερη καθαρότητα σε β-γλυκάνες επιτεύχθηκε με υπέρηχους, όπως και η μεγαλύτερη απόδοση εκχύλισης και ολική απόδοση. Επομένως, για την περίπτωση του *T. aestivum*, προτείνεται η χρήση υπερήχων για την εκχύλιση των γλυκανών του,

αν και η αρχική του σύσταση, με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες, δεν καθιστά εφικτή την ικανοποιητική απομόνωσή τους.

5.6 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

Αρχικά θα αξιολογηθούν τα υπό εξέταση μανιτάρια, ανάλογα με τη σύστασή τους σε θρεπτικά και βιοδραστικά συστατικά που απασχόλησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, δηλαδή ως προς την % περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, έλαιο, ολικές γλυκάνες και β-γλυκάνες (ξ.β.). Στον πίνακα 5.29 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η σύσταση στα βασικά θρεπτικά και τα άλλα βιοδραστικά συστατικά για όλα τα μανιτάρια που εξετάστηκαν.

Πίνακας 5.29: Συνολικά αποτελέσματα σύστασης των υπό εξέταση μανιταριών

Σύσταση (% ξ.β.)	<i>Ganoderma lucidum</i>		<i>Lentinula edodes</i>	<i>Grifola frondosa</i>	<i>Tuber melanosporum</i>	<i>Tuber aestivum</i>
	ελληνικό	κινεζικό				
Πρωτεΐνες	8.6	6.3	22.5	14.7	23.9	18.2
Έλαιο	0.5	3.3	3.2	3.3	1.0	2.1
Ολικές γλυκάνες	26.9	27.7	38.3	44.2	16.0	18.8
β-γλυκάνες	26.3	23.3	37.5	42.2	8.6	12.6

Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη έχει το *Tuber melanosporum*, ακολουθεί το *Lentinula edodes* με μικρή διαφορά, το *Tuber aestivum*, το *Grifola frondosa* και τέλος το *Ganoderma lucidum*.

Σχετικά με το περιεχόμενο έλαιο, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα φαίνεται να έχει το *G. frondosa* και κινεζικό *G. lucidum*, με μικρή διαφορά ακολουθεί το *L. edodes*, στη συνέχεια οι τρούφες *T. aestivum* και *T. melanosporum* και τέλος το ελληνικό *G. lucidum*.

Την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές γλυκάνες έχει το *G. frondosa*, μετά το *L. edodes*, ακολουθεί το *G. lucidum* και τέλος οι τρούφες *T. melanosporum* και *T. aestivum*.

Τέλος, ως προς τις β-γλυκάνες, η σειρά είναι αντίστοιχη των ολικών γλυκανών, με το *G. frondosa* να έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα και τις τρούφες να έχουν την χαμηλότερη περιεκτικότητα με τη διαφορά ότι το *T. aestivum* ξεπερνά το *T. melanosporum* σε %περιεκτικότητα β-γλυκανών.

5.7 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Στο σημείο αυτό θα αξιολογηθούν τα συμπυκνώματα που παρασκευάστηκαν από κάθε μανιτάρι, τόσο ως προς την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες ή γλυκάνες αντίστοιχα, όσο και προς την απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών ή γλυκανών. Ο λόγος που μελετάται η απόδοση εκχύλισης μάλλον από ότι οι υπόλοιποι συντελεστές απόδοσης είναι, διότι οι αποδόσεις εκχύλισης σε γενικές γραμμές παρουσίασαν από μέτριες έως πολύ υψηλές τιμές, ενώ τα επόμενα στάδια απομόνωσης των συστατικών δεν οδήγησαν σε επιτυχείς αποδόσεις.

Πιο συγκεκριμένα, στον πίνακα 5.30 παρουσιάζονται ανά εξεταζόμενο μανιτάρι, οι μέγιστες περιεκτικότητες σε πρωτεΐνες, οι μέγιστες αποδόσεις εκχύλισης πρωτεϊνών, οι μέγιστες περιεκτικότητες σε ολικές και β-γλυκάνες και οι μέγιστες αποδόσεις εκχύλισης γλυκανών με υπέρηχους (US) ή μικροκύματα (MW), στις συνθήκες που επιτεύχθηκαν.

Στην περίπτωση του *T. melanosporum* τα αποτελέσματα δεν είναι πλήρη, καθώς λείπουν τα μεγέθη: % περιεκτικότητα β-γλυκανών και οι αντίστοιχοι συντελεστές απόδοσης, γεγονός που οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα της πρώτης ύλης σε β-γλυκάνες με αποτέλεσμα να μην επιτευχθεί η απομόνωσή τους και επακόλουθα ο αναλυτικός προσδιορισμός τους στα υδατανθρακικά προϊόντα.

Πίνακας 5.30: Συνολικά αποτελέσματα εκχύλισης αξιόλογων συστατικών των υπό εξέταση μανιταριών

		<i>Ganoderma lucidum</i>		<i>Lentinula edodes</i>		<i>Grifola frondosa</i>		<i>Tuber melanosporum</i>		<i>Tuber aestivum</i>	
% πρωτεΐνη		51.7	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • ισοπροπανόλη 	51.3	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.60 • ισοπροπανόλη 	45.5	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.60 • ισοπροπανόλη 	40.7	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • ισοπροπανόλη και ακετόνη 	51.6	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • ισοπροπανόλη και ακετόνη
%απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών		55.2	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • χωρίς καθαρισμό 	72.9	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.60 • ακετόνη 	83.9	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.60 • χωρίς καθαρισμό 	54.1	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • ισοπροπανόλη και ακετόνη 	42.6	<ul style="list-style-type: none"> • pH_{εκχ}=10 • ρI=3.00 • ισοπροπανόλη και ακετόνη
%ολικές γλυκάνες	US	23.6	t = 55 min	10.5	t = 90 min	48.7	t = 80 min	19.8	t = 60 min	40.0	t = 60 min
	MW	29.1	t = 30 min	10.6	t = 30 min	40.7	t = 30 min	23.2	t = 30 min	31.9	t = 30 min
%απόδοση εκχύλισης ολικών γλυκανών	US	18.6	t = 80 min	66.2	t = 30 min	54.1	t = 30 min	30.4	t = 60 min	46.7	t = 60 min
	MW	21.5	t = 15 min	68.3	t = 30 min	54.4	t = 30 min	28.6	t = 30 min	21.6	t = 30 min
%β-γλυκάνες	US	23.0	t = 55 min	9.5	t = 90 min	32.2	t = 30 min	*	*	25.4	t = 60 min
	MW	28.3	t = 30 min	9.6	t = 30 min	33.2	t = 15 min	*	*	12.2	t = 30 min
%απόδοση εκχύλισης β-γλυκανών	US	17.4	t = 80 min	66.9	t = 30 min	46.1	t = 80 min	*	*	22.2	t = 60 min
	MW	21.5	t = 15 min	69.1	t = 30 min	59.3	t = 30 min	*	*	5.3	t = 30 min

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, το συμπύκνωμα μεγαλύτερης καθαρότητας απομονώθηκε από το *G. lucidum* (55.2% πρωτεΐνη) και ακολουθούν το *T. aestivum* (51.6%) και *L. edodes* (51.3%) με πολύ μικρή διαφορά. Η εκχύλιση στις περιπτώσεις αυτές πραγματοποιήθηκε σε pH 10, η καταβύθιση σε ρI 3.0-3.6 και για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε είτε αποκλειστικά υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης είτε διαδοχικές εκπλύσεις τόσο με διάλυμα ισοπροπανόλης όσο και ακετόνης.

Την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών παρουσιάζει το *G. frondosa* (83.9%) με πολύ μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα μανιτάρια. Ακολουθούν τα *L. edodes* (72.9%), *G. lucidum* (55.1%) και *T. melanosporum* (54.1%). Οι αποδόσεις αυτές επιτεύχθηκαν όλες σε pH εκχύλισης 10 και υποδεικνύουν ότι τα μανιτάρια είναι δυνητικά καλές πρώτες ύλες για την εκχύλιση πρωτεϊνών, με απαραίτητη τη διερεύνηση του σταδίου απομόνωσής τους, ώστε να ληφθούν πρωτεϊνικά άλευρα ή ακόμα και υπερσυμπυκνώματα.

Προχωρώντας στις ολικές γλυκάνες, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα εμφανίζει υδατανθρακικό συμπύκνωμα από το *G. frondosa* (48.7% ολικές γλυκάνες) που επιτεύχθηκε με εκχύλιση με υπέρηχους και χρόνο εκχύλισης 80 min. Ακολουθεί το συμπύκνωμα του ίδιου μανιταριού από εκχύλιση με μικροκύματα και χρόνο 30 min (40.7%) και μετά τα συμπυκνώματα από *T. aestivum*, *G. lucidum*, *T. melanosporum* και τέλος *L. edodes*.

Την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης ολικών γλυκανών παρουσιάζει συμπύκνωμα του *L. edodes* (68.3% και 66.2% με μικροκύματα και υπέρηχους αντίστοιχα και χρόνο εκχύλισης 30 min). Ακολουθούν το *G. frondosa*, *T. aestivum*, *T. melanosporum* και *G. lucidum*.

Σχετικά με τις β-γλυκάνες, την μέγιστη περιεκτικότητα εμφανίζουν συμπυκνώματα του μανιταριού *G. frondosa* (33.2% και 32.2% β-γλυκάνες με μικροκύματα και υπέρηχους αντίστοιχα και χρόνο εκχύλισης 30 και 90 min). Ακολουθούν τα συμπυκνώματα β-γλυκανών των *G. lucidum*, *T. aestivum* και *L. edodes*.

Η σειρά αυτή όμως μεταβάλλεται όσον αφορά την απόδοση εκχύλισης β-γλυκανών, όπου τη μέγιστη απόδοση παρουσιάζουν τα συμπυκνώματα του *L. edodes* (69.1% και 66.9% με μικροκύματα και υπέρηχους αντίστοιχα και χρόνο εκχύλισης 30 min), ακολουθούμενα από τα *G. frondosa*, *T. aestivum* και *G. lucidum*.

Παρατηρείται ότι στα τρία μανιτάρια *G. lucidum*, *L. edodes* και *G. frondosa*, η μέγιστη απόδοση εκχύλισης ολικών αλλά και β-γλυκανών επιτυγχάνεται μέσω εκχύλισης με μικροκύματα, σε αντίθεση με τις τρούφες *T. melanosporum* και *T. aestivum* όπου η μέγιστη απόδοση γλυκανών επιτυγχάνεται με εκχύλιση με υπέρηχους.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

6.1 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

6.1.1 Συγκριτικά Αποτελέσματα Πρωτεϊνικών Συμπυκνωμάτων

Στους πίνακες 7.7-7.11 του παραρτήματος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παραλαβής πρωτεϊνικών προϊόντων. Για την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τα τρία μανιτάρια *G. lucidum*, *L. edodes* και *G. frondosa*, καθώς για τις τρούφες *T. melanosporum* και *T. aestivum* πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα απομόνωσης πρωτεϊνικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων) άρα τα αποτελέσματά τους δεν ήταν πλήρη ώστε να συμπεριληφθούν στη στατιστική ανάλυση.

Στατιστικά λοιπόν, φαίνεται ότι ο παράγοντας του είδους του μανιταριού έχει σημαντική επίδραση ($P < 0.05$) στην απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών, ολική απόδοση και στην απόδοση βάρους, δηλαδή στο %ποσοστό του παραλαμβανόμενου συμπυκνώματος. Η %περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη των συμπυκνωμάτων αλλά και η απόδοση απομόνωσης δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το είδος μανιταριού. Σχετικά με την απόδοση εκχύλισης, την χαμηλότερη τιμή εμφανίζει το *G. lucidum* (38.9%) με σημαντική διαφορά από τα άλλα δύο είδη, ακολουθεί το *L. edodes* (70.5%) ενώ τη μεγαλύτερη τιμή παρουσιάζει το *G. frondosa* (72.5%), με τα *L. edodes* και *G. frondosa* να μην εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Η απόδοση απομόνωσης παρουσιάζει όμοια συμπεριφορά με την %περιεκτικότητα πρωτεϊνών, όπου οι τιμές παρότι διαφέρουν μεταξύ τους, δεν φαίνεται να επηρεάζονται από κάποιον παράγοντα ξεχωριστά αλλά από αλληλεπίδρασή τους. Η ολική απόδοση πρωτεϊνών, όπως αναφέρθηκε ήδη, επηρεάζεται από το είδος μανιταριού, με την ίδια αύξουσα σειρά όπως η απόδοση εκχύλισης, αλλά σε αυτή την περίπτωση τα *G. lucidum* και *L. edodes* δεν εμφανίζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

6.1.2 Συγκριτικά Αποτελέσματα Υδατανθρακικών Συμπυκνωμάτων

Όπως θα αναλυθεί ευθύς αμέσως, στην εκχύλιση ολικών και β-γλυκανών, ο παράγοντας είδος μανιταριού έχει σημαντική επίδραση σε όλες τις μελετώμενες παραμέτρους ($P < 0.05$). Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τα τρία μανιτάρια *G. lucidum*, *L. edodes* και *G. frondosa*, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί η περιορισμένη ποσότητα τρούφων *T. melanosporum* και *T. aestivum* δεν επέτρεψε τη διεξαγωγή όλων των σειρών πειραμάτων ώστε τα αποτελέσματά τους να χρησιμοποιηθούν στη στατιστική ανάλυση. Τα αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης υδατανθρακικών κλασμάτων βρίσκονται στους πίνακες 7.12-7.20 του παραρτήματος.

Όλα τα μανιτάρια διαφέρουν σημαντικά ως προς τις τιμές απόδοσης εκχύλισης ολικών και β-γλυκανών και η αύξουσα σειρά είναι *G. lucidum* (13.5% ολικών ή 12.4% β-γλυκανών), *G. frondosa* (48.0% ολικών ή 48.7% β-γλυκανών) και *L. edodes* (66.2% ολικών και 66.9% β-γλυκανών). Στην απόδοση απομόνωσης ολικών και β-γλυκανών, τα αποτελέσματα αλλάζουν λίγο με την αύξουσα σειρά να διαμορφώνεται ως εξής: *L. edodes* (0.6%) *G. frondosa* (8.0% ολικών και 7.4% β-γλυκανών) και *G. lucidum* (8.6% ολικών και 9.6% β-γλυκανών), άρα το *L. edodes* διαφέρει σημαντικά από τα άλλα δύο είδη, όχι όμως τα *G. lucidum* και *G. frondosa* μεταξύ τους. Η ολική απόδοση ολικών και β-γλυκανών επηρεάζεται και εκείνη με τη σειρά της από το είδος μανιταριού και η αύξουσα σειρά είναι *L. edodes* (0.4%), *G. lucidum* (1.1%) και *G. frondosa* (4.4% ολικών και 3.5% β-γλυκανών), με το *G. frondosa* να διαφέρει σημαντικά από τα δύο άλλα είδη. Η αύξουσα σειρά περιεκτικότητας ολικών και β-γλυκανών είναι η ακόλουθη: *L. edodes* (8.6% ολικές και 6.5% β-γλυκάνες), *G. lucidum* (25.3% ολικές και 24.2% β-γλυκάνες) και *G. frondosa* (39.4% ολικές και 31.0% β-γλυκάνες), επομένως όλα τα είδη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Στην % περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες, φαίνεται πως επιδρά στατιστικά σημαντικά και η μέθοδος εκχύλισης, με τους υπέρηχους να οδηγούν σε χαμηλότερη τιμή (19.0%) και τα μικροκύματα σε υψηλότερη (22.2%) αντίστοιχα. Σχετικά με την απόδοση βάρους συμπυκνώματος, η αύξουσα σειρά είναι: *G. lucidum* (1.2%), *L. edodes* (2.1%) και *G. frondosa* (4.3%), με τα *G. lucidum* και *G. frondosa* να διαφέρουν σημαντικά.

6.2 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Λόγω των σύγχρονων τάσεων στη διατροφή που εστιάζουν σε τρόφιμα με υψηλή θρεπτικότητα αλλά και ευεργετική δράση στην υγεία του ανθρώπου, στράφηκε το ενδιαφέρον στα μανιτάρια, τα οποία χάρη στη σύστασή τους έχουν υψηλή θρεπτική αξία και χάρη στα βιοδραστικά συστατικά τους δρουν προληπτικά έναντι πολλών χρόνιων ασθενειών και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τα μανιτάρια χαρακτηρίζονται από υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (περιέχοντας τα περισσότερα απαραίτητα αμινοξέα), σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (με υψηλό βαθμό ακορεστότητας), υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες, υψηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (κύριο κλάσμα πολυσακχαριτών), ενώ περιέχουν ακόμη βιταμίνες και μέταλλα (ασβέστιο, φωσφόρο, σελήνιο και άλλα).

Λόγω λοιπόν της υψηλής θρεπτικότητας και ενισχυτικής δράσης για την υγεία, γίνεται προσπάθεια δημιουργίας λειτουργικών τροφίμων από μανιτάρια, προς ενίσχυσή τους με τα αξιόλογα συστατικά τους. Για τον ίδιο λόγο επιχειρήθηκε η απομόνωση των αξιόλογων συστατικών μανιταριών (πρωτεϊνών, β-γλυκανών και ελαίου) στην παρούσα διπλωματική εργασία, από τα μανιτάρια *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Tuber melanosporum* και *Tuber aestivum*.

Αρχικά αξιολογήθηκαν τα μανιτάρια ως προς τη σύστασή τους. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη έχει η τρούφα *T. melanosporum* (23.9%), ακολουθεί το *Lentinula edodes* (22.5%), το *Tuber aestivum* (18.2%), το *Grifola frondosa* (14.7%) και τέλος το *Ganoderma lucidum* (6.3-8.6%). Όλα τα μελετώμενα είδη μανιταριών έχουν λοιπόν, αξιοποιήσιμο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για την παραλαβή πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, εκτός του *G. lucidum*. Όσον αφορά το υδατανθρακικό περιεχόμενο, ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες έχει το *G.*

frondosa (42.2%), με τα *L. edodes* (37.5%) και *G. lucidum* (26.3%) να ακολουθούν. Τα τρία αυτά μανιτάρια έχουν επομένως αξιοποιήσιμη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες και καθιστούν δυνατή την απομόνωση β-γλυκανών, σε αντίθεση με τις τρούφες *T. melanosporum* και *T. aestivum* που χαρακτηρίζονται από μη αξιοποιήσιμο γλυκανικό περιεχόμενο (8.6% και 12.6% αντίστοιχα). Τελευταίο συστατικό που αξιολογήθηκε είναι το έλαιο, που βρίσκεται σε υψηλότερη περιεκτικότητα στα *G. frondosa* και *G. lucidum* (3.3%), *L. edodes* (3.2%) και λιγότερο στις τρούφες *T. aestivum* (2.1%) και *T. melanosporum* (1.0%), παρότι η βιβλιογραφία προτείνει ότι οι τρούφες έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε έλαιο. Αποτελεί γεγονός όμως, ότι οι τιμές σύστασης δεν είναι απόλυτες αλλά διαφοροποιούνται ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής, το στάδιο ανάπτυξης, το μέσο καλλιέργειας, το τμήμα του μανιταριού και άλλα. Όλες οι τιμές δίνονται επί ξηρού βάρους.

Εξετάστηκε η απομόνωση πρωτεϊνών από τα μανιτάρια με σκοπό την παρασκευή πρωτεϊνικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων) ακολουθώντας την κλασική μέθοδο της υδατικής εκχύλισης, καταβύθισης στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών (pI) και ξήρανσής τους (λυοφιλίωση). Από το πρώτο στάδιο παραγωγής πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, εξετάστηκε η παράμετρος pH εκχύλισης δοκιμάζοντας τις τιμές 7 ή 10 (ουδέτερο ή βασικό pH), όπου βρέθηκε ότι βέλτιστη τιμή είναι pH 10 καθώς οδηγεί σε αυξημένη τιμή απόδοσης απομόνωσης, απόδοσης βάρους άρα και ολικής απόδοσης. Σημειώνεται ότι το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών των μανιταριών κυμαινόταν από 3.00-3.60. Από το στάδιο καθαρισμού των παραλαμβανόμενων πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων, μελετήθηκε πρώτον η επίδραση του μέσου καθαρισμού με δύο διαφορετικά διαλύματα: υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης ή ακετόνης. Η χρήση μέσου καθαρισμού αυξάνει σημαντικά την καθαρότητα σε πρωτεΐνη των συμπυκνωμάτων αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα δύο διαλύματα.

Σε όλα τα μανιτάρια επιτεύχθηκαν μεγάλες αποδόσεις εκχύλισης, αγγίζοντας το 83.9% από το *G. frondosa* ενώ η μέγιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη έφτασε το 51.7% από το *G. lucidum*. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα μανιτάρια είναι ικανές πρώτες ύλες για την εκχύλιση πρωτεϊνών, απαιτείται όμως περισσότερη διερεύνηση του σταδίου καταβύθισης και απομόνωσης πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων ώστε να αυξηθεί τόσο η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη όσο και της ολικής απόδοσης της διεργασίας.

Δεδομένων των πολύ καλών αποτελεσμάτων απόδοσης εκχύλισης, ιδιαίτερα στην περίπτωση του *G. frondosa*, αξίζει η διερεύνηση άλλων μεθόδων εκχύλισης πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, για τα μανιτάρια με αξιοποιήσιμο ποσοστό πρωτεϊνών (*T. melanosporum*, *L. edodes*, *T. aestivum* και *G. frondosa*) μπορεί να γίνει χρήση αλάτων, όπως Na_2SO_3 (0.25-0.50% w/v) ή NaCl (2.5-5.0% w/v) ή ρυθμιστικών διαλυμάτων στην υδατική εκχύλιση πρωτεϊνών, που έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την καθαρότητα των παραλαμβανόμενων συμπυκνωμάτων, αντί διαλύματος NaOH που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Ακόμα, ήδη δοκιμάζεται η εκχύλιση πρωτεϊνών υποβοηθούμενη με υπέρηχους ή με μικροκύματα. Αντί ισοηλεκτρικής καταβύθισης, οι εκχυλισμένες πρωτεΐνες μπορούν να παραληφθούν με συμπύκνωση του διαλύματος με μεμβράνες υπερδιήθησης ή με απευθείας ξήρανση του εκχυλίσματος με ψεκασμό. Επιπλέον, θα μπορούσε να προηγηθεί απελαίωση του πρωτεϊνικού αλεύρου πριν την εκχύλιση πρωτεϊνών για όλα τα μανιτάρια. Στα πρωτεϊνικά αξιοποιήσιμα μανιτάρια, μπορεί να επακολουθήσει μελέτη και ανάλυση των παραλαμβανόμενων πρωτεϊνικών κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η παραλαβή υδατανθρακικών προϊόντων (συμπυκνωμάτων) ακολουθώντας δύο σύγχρονες μεθόδους: εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους και με μικροκύματα, μεταβάλλοντας τον χρόνο εκχύλισης (30, 55-60 και 80-90 min με υπέρηχους, ενώ 5, 15 και 30 min με μικροκύματα). Και οι δύο μέθοδοι οδήγησαν σε υψηλές αποδόσεις εκχύλισης ολικών και β-γλυκανών, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα μανιτάρια είναι ικανές πρώτες ύλες για την εκχύλιση γλυκανών, όπως είναι αναμενόμενο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε γλυκάνες (μέχρι 44.2% ολικές γλυκάνες όπως προσδιορίστηκε). Η υψηλότερη τιμή απόδοσης εκχύλισης (69.1%) σημειώθηκε από το *G. frondosa* μέσω εκχύλισης με μικροκύματα σε χρόνο 30 min. Μεταξύ των δύο μεθόδων εκχύλισης, δεν σημειώθηκε διαφορά στους συντελεστές απόδοσης, ούτε στην περιεκτικότητα ολικών γλυκανών, παρά μόνο στην περιεκτικότητα β-γλυκανών, όπου η εκχύλιση με μικροκύματα οδηγεί σε υψηλότερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (22.2% και 19.0% για μικροκύματα και υπέρηχους αντίστοιχα) των υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων. Ο παράγοντας χρόνος εκχύλισης στατιστικά δεν επιδρά στην απόδοση εκχύλισης ή την περιεκτικότητα σε γλυκάνες των υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων. Παρόλα αυτά, ο χρόνος 30 min εκχύλισης με υπέρηχους ή 5 min εκχύλισης με μικροκύματα δεν φαίνεται να επαρκεί για την εκχύλιση και απομόνωση γλυκανών.

Κατά το στάδιο απομόνωσης και καθαρισμού των υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων, φαίνεται πως παρεμποδίστηκε η απομόνωση γλυκανών, καθώς δεν επιτεύχθηκε η παραλαβή συμπυκνώματος γλυκανών, δηλαδή συμπυκνώματος με περιεκτικότητα β-γλυκανών ανώτερη της πρώτης ύλης. Οι υψηλότερες τιμές απόδοσης εκχύλισης ολικών και β-γλυκανών επιτεύχθηκαν από το *L. edodes*, ενώ η μέγιστη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες (33.2%) επιτεύχθηκε σε υδατανθρακικό συμπύκνωμα του *G. frondosa*. Σε αυτά τα δύο μανιτάρια λοιπόν, που σημείωσαν τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, προτείνεται περισσότερη διερεύνηση όλων των σταδίων εκχύλισης και απομόνωσης γλυκανών, δεδομένου ότι δεν υπάρχει κλασική μέθοδος παραλαβής υδατανθρακικών κλασμάτων γενικότερα στη βιβλιογραφία. Άλλες μέθοδοι που έχουν δοκιμαστεί στη βιβλιογραφία και θα μπορούσαν να εφαρμοστούν και στα εν λόγω μανιτάρια είναι η υδατική εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού ή η χρήση διαφορετικού εκχυλιστικού μέσου όπως αιθανόλης (95%), αντί νερού ακολουθούμενη από διήθηση αντί φυγοκέντρησης. Επιπλέον, προτείνεται να συνδυαστούν οι δύο διεργασίες παραλαβής πρωτεϊνικών και υδατανθρακικών συμπυκνωμάτων, ώστε να προκύπτουν δύο ειδών προϊόντα από την ίδια διεργασία, με διαχωρισμό αρχικά του ενός θρεπτικού κλάσματος, π.χ. των πρωτεϊνών, και εν συνεχεία του άλλου, π.χ. των γλυκανών. Κρίνεται απαραίτητη και η μελέτη των αντιθρεπτικών παραγόντων, που παρεμποδίζουν την εκχύλιση των β-γλυκανών, όπως είναι τα ενδογενή ένζυμα ή άλλα διαλυτά υλικά, όπως ελεύθερα σάκχαρα, αμινοξέα ή φαινόλες και η προσπάθεια απενεργοποίησης ή απομάκρυνσής τους.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 7.1: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για *Ganoderma lucidum* (1)

ρΗ	V _{υπερκ.υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη (g)	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.82	44.5	5	0.9082	0.0310	13.1850
2.98	44.0	7	1.2571	0.0331	14.0782
3.22	44.0	24	4.3102	0.0326	13.8655
3.39	44.5	21	3.8143	0.0289	12.2918
3.62	44.5	44	7.9918	0.0272	11.568
3.86	45.0	171	31.4082	0.0065	2.7646
3.97	44.5	151	27.4265	0.0108	4.5935
4.19	45.0	120	22.0408	0.0042	1.7864
4.52	45.0	96	17.6327	0.0035	1.4886
4.76	45.0	80	14.6939	0.0050	2.1266

Πίνακας 7.2: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για *Ganoderma lucidum* (2)

ρΗ	V _{υπερκ.υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη (g)	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.62	43	5	1.7200	0.0587	24.9647
2.80	44	7	2.4640	0.0566	24.0716
3.02	43,8	8	2.8032	0.0598	25.4325
3.22	43,8	19	6.6576	0.0507	21.5623
3.40	43,5	23	8.004	0.0481	20.4566
3.63	43,5	52	18.0960	0.0363	15.4381
3.79	46,7	40	14.944	0.0424	18.0324
4.08	45	148	53.2800	0.0015	0.6379
4.40	45	107	38.5200	0.0001	0.0425
4.80	44,5	48	17.0880	0.0014	0.5954

Πίνακας 7.3: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για νωπή *Lentinula edodes*

ρΗ	V _{υπερκ.υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη (g)	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.81	20.0	53	1.6308	0.0207	3.1689
3.04	20.0	88	2.7077	0.0212	3.2454
3.24	20.0	71	2.1846	0.0211	3.2301
3.43	20.5	84	2.6492	0.0209	3.1995
3.58	20.0	101	3.1077	0.0212	3.2454
3.84	20.0	78	2.4000	0.0196	3.0005
4.02	20.0	104	3.2000	0.0177	2.7096
4.26	20.0	110	3.3846	0.0167	2.5565
4.48	19.5	79	2.3700	0.0191	2.9240
4.78	20.0	146	4.4923	0.0164	2.5106

Πίνακας 7.4: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για αφυδατωμένη *Lentinula edodes*

ρΗ	V _{υπερκ.υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη (g)	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.62	45.0	179	12.3923	0.1490	5.8473
2.84	45.0	242	16.7539	0.1447	5.6786
3.03	45.0	243	16.8231	0.1423	5.5844
3.23	45.0	160	11.0769	0.1459	5.7257
3.42	44.0	138	9.3415	0.1512	5.9337
3.61	45.0	90	6.2308	0.1501	5.8905
3.83	45.0	263	18.2077	0.1361	5.3411
4.00	44.0	147	9.9508	0.1476	5.7924
4.27	44.0	189	12.7939	0.1398	5.4863
4.53	44.0	102	6.9046	0.1412	5.5412

Πίνακας 7.5: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για αφυδατωμένη *Grifola frondosa* (1)

ρΗ	V _{υπερκ.υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.84	46.5	376	10,75938	0.1982	6.1341
3.04	46.0	313	8,860308	0.2110	6.5302
3.25	46.0	293	8,294154	0.2125	6.5767
3.45	46.0	324	9,171692	0.2135	6.6076
3.58	46.0	278	7,869538	0.2187	6.7686
3.85	45.0	300	8,307692	0.2147	6.6448
4.03	45.0	272	7,532308	0.2143	6.6324
4.22	45.0	296	8,196923	0.2120	6.5612
4.49	44.5	351	9,612	0.1979	6.1248
4.78	44.5	543	14,86985	0.1656	5.1252

Πίνακας 7.6: Υπολογισμός %καταβυθιζόμενων και %μη καταβυθιζόμενων πρωτεϊνών συναρτήσει του pH για αφυδατωμένη *Grifola frondosa* (2)

pH	V _{υπερκ-υγρού} (mL)	Θολότητα (NTU)	%Μη καταβ. πρωτεΐνες	Ξηρή παραληφθείσα πρωτεΐνη (g)	%Καταβυθιζόμενες πρωτεΐνες
2.82	46.0	288	8.0291	0.2337	6.9969
3.03	45.0	229	6.2455	0.2421	7.2484
3.22	45.0	188	5.1273	0.2488	7.4490
3.42	46.0	192	5.2364	0.2440	7.3053
3.61	44.6	248	6.7035	0.2421	7.2484
3.81	44.5	196	5.2861	0.2414	7.2274
4.02	44.5	244	6.5806	0.2368	7.0897
4.24	44.5	235	6.3379	0.2317	6.9370
4.51	41.0	291	7.2309	0.2143	6.4161
4.75	44.0	453	12.0800	0.1863	5.5778

Ακολουθούν τα στατιστικά αποτελέσματα για την εκχύλιση και απομόνωση πρωτεϊνών. Οι παράγοντες που εξετάζονται είναι το είδος του μανιταριού (όπου 1: *G. lucidum*, 2: *L. edodes*, 3: *G. frondosa*), το pH εκχύλισης (όπου 1: pH 10 και 2 pH 7) και το μέσο καθαρισμού του συμπυκνώματος (όπου 1: χωρίς καθόλου καθαρισμό, 2: με υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης και 3: με υδατικό διάλυμα ακετόνης). Οι παράμετροι που ερευνώνται είναι η απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών, απόδοση απομόνωσης, ολική απόδοση, %περιεκτικότητα πρωτεϊνών και απόδοση μάζας, δηλαδή %συμπυκνώματος.

Πίνακας 7.7: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση εκχύλισης πρωτεϊνών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	33086.40	1	33086.40	463.6465	0.000028
Είδος μανιταριού	2134.44	2	1067.22	14.9552	0.013914
Καθαρισμός	156.03	2	78.01	1.0932	0.418056
Error	285.45	4	71.36		

Duncan test; variable απόδοση εκχ. (πρωτεΐνες (είδος-καθαρισμός 3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 71.361, df = 4.0000

Είδος μανιταριού	{1}	{2}	{3}
	38.883	70.517	72.497
1		0.010292	0.009041
2	0.010292		0.788521
3	0.009041	0.788521	

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	25446.29	1	25446.29	3563.499	0.000281
Είδος μανιταριού	484.38	2	242.19	33.917	0.028640
pH εκχύλισης	11.65	1	11.65	1.631	0.329760
Error	14.28	2	7.14		

Duncan test; variable απόδοση εκχ. (πρωτεΐνες (είδος pH εκχύλισης 3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 7,1408, df = 2,0000

Είδος μανιταριού	{1} 52.825	{2} 68.605	{3} 74.040
1		0.028085	0.014270
2	0.028085		0.174379
3	0.014270	0.174379	

Πίνακας 7.8: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση απομόνωσης πρωτεϊνών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	5884.936	1	5884.936	78.33126	0.000900
Είδος μανιταριού	927.799	2	463.899	6.17472	0.059857
Καθαρισμός	14.603	2	7.301	0.09718	0.909466
Error	300.515	4	75.129		

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	1369.873	1	1369.873	6.910311	0.119352
Είδος μανιταριού	309.053	2	154.527	0.779508	0.561953
pH εκχύλισης	686.512	1	686.512	3.463105	0.203817
Error	396.472	2	198.236		

Πίνακας 7.9: Στατιστικά αποτελέσματα για ολική απόδοση πρωτεϊνών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	2299.203	1	2299.203	161.6824	0.000220
Είδος μανιταριού	815.287	2	407.644	28.6659	0.004254
Καθαρισμός	35.227	2	17.613	1.2386	0.381372
Error	56.882	4	14.220		

Duncan test; variable απόδοση ολική (πρωτεΐνες (είδος-καθαρισμός 3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 14.220, df = 4.0000

Είδος μανιταριού	{1} 6.5833	{2} 12.3400	{3} 29.0270
1		0.135076	0.002161
2	0.135076		0.005794
3	0.002161	0.005794	

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	681.3873	1	681.3873	5.414078	0.145457
Είδος μανιταριού	217.7594	2	108.8797	0.865122	0.536158
pH εκχύλισης	366.6017	1	366.6017	2.912896	0.229995
Error	251.7094	2	125.8547		

Πίνακας 7.10: Στατιστικά αποτελέσματα για ολική απόδοση βάρους πρωτεϊνών (%συμπυκνώματος)

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	360.7467	1	360.7467	114.7859	0.000430
Είδος μανιταριού	134.9211	2	67.4605	21.4653	0.007265
Καθαρισμός	33.8663	2	16.9331	5.3880	0.073284
Error	12.5711	4	3.1428		

Duncan test; variable απόδοση βάρους (πρωτεΐνες (είδος-καθαρισμός 3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3,1428, df = 4,0000

Είδος μανιταριού	{1}	{2}	{3}
	1.6233	6.2633	11.1070
1		0,032908	0,003176
2	0,032908		0,028857
3	0,003176	0,028857	

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	681.3873	1	681.3873	5.414078	0.145457
Είδος μανιταριού	217.7594	2	108.8797	0.865122	0.536158
pH εκχύλισης	366.6017	1	366.6017	2.912896	0.229995
Error	251.7094	2	125.8547		

Πίνακας 7.11: Στατιστικά αποτελέσματα για %περιεκτικότητα πρωτεϊνών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	15469.56	1	15469.56	325.4934	0.000055
Είδος μανιταριού	98.64	2	49.32	1.0377	0.433476
Καθαρισμός	599.57	2	299.79	6.3078	0.057955
Error	190.11	4	47.53		

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	4791.200	1	4791.200	452.4439	0.002203
Είδος μανιταριού	351.548	2	175.774	16.5987	0.056822
pH εκχύλισης	18.691	1	18.691	1.7651	0.315310
Error	21.179	2	10.590		

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης εκχύλισης και απομόνωσης συμπυκνωμάτων γλυκανών. Οι παράγοντες που εξετάζονται είναι οι εξής: απόδοση εκχύλισης ολικών γλυκανών, απόδοση απομόνωσης ολικών γλυκανών, ολική απόδοση ολικών γλυκανών, %περιεκτικότητα ολικών γλυκανών, απόδοση βάρους (%συμπυκνώματος), απόδοση εκχύλισης β-γλυκανών, απόδοση απομόνωσης β-γλυκανών, ολική απόδοση β-γλυκανών και %περιεκτικότητα β-γλυκανών. Οι παράμετροι που διερευνώνται είναι το είδος μανιταριού (όπου 1: *G. lucidum*, 2: *L. edodes*, 3: *G. frondosa*), η μέθοδος εκχύλισης [όπου 1: υπέρηχοι (US) και 2: μικροκύματα (MW)] και ο χρόνος εκχύλισης (όπου 1: 30 min US ή 5 min MW, 2: 55-60 min US ή 15 min MW και 3: 80-90 min US και 30 min MW).

Πίνακας 7.12: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση εκχύλισης ολικών γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	32587.34	1	32587.34	1229.453	0.000000
Είδος μανιταριού	8600.72	2	4300.36	162.244	0.000000
Μέθοδος εκχύλισης	10.76	1	10.76	0.406	0.535908
Χρόνος εκχύλισης	27.19	2	13.60	0.513	0.611296
Error	318.07	12	26.51		

Duncan test; variable απόδοση εκχ. ολ.γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 26,506, df = 12,000

Είδος μανιταριού	{1} 13.472	{2} 66.177	{3} 47.998
1		0.000095	0.000172
2	0.000095		0.000211
3	0.000172	0.000211	

Πίνακας 7.13: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση απομόνωσης ολικών γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	593.2864	1	593.2864	21.51660	0.000572
Είδος μανιταριού	237.4061	2	118.7031	4.30498	0.038960
Μέθοδος εκχύλισης	15.4939	1	15.4939	0,56191	0.467932
Χρόνος εκχύλισης	46.3484	2	23.1742	0,84045	0.455405
Error	330.8811	12	27.5734		

Duncan test; variable απόδοση απομ. ολ.γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 27.573, df = 12.000

Είδος μανιταριού	{1}	{2}	{3}
	8.5800	0.6150	8.0283
1		0.027287	0.858776
2	0.027287		0.031010
3	0.858776	0.031010	

Πίνακας 7.14: Στατιστικά αποτελέσματα για ολική απόδοση ολικών γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	69.93502	1	69.93502	15.13607	0.002147
Είδος μανιταριού	56.17874	2	28.08937	6.07940	0.015019
Μέθοδος εκχύλισης	6.79576	1	6.79576	1.47081	0.248553
Χρόνος εκχύλισης	10.43501	2	5.21751	1.12923	0.355347
Error	55.44507	12	4.62042		

Duncan test; variable απόδοση ολική ολ.γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 4.6204, df = 12.000

Είδος μανιταριού	{1}	{2}	{3}
	1.0683	0.4050	4.4400
1		0.602916	0.018874
2	0.602916		0.008930
3	0.018874	0.008930	

Πίνακας 7.15: Στατιστικά αποτελέσματα για %περιεκτικότητα ολικών γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	10713.06	1	10713.06	642.3606	0.000000
Είδος μανιταριού	2871.40	2	1435.70	86.0854	0.000000
Μέθοδος εκχύλισης	0.43	1	0.43	0.0259	0.874751
Χρόνος εκχύλισης	59.34	2	29.67	1.7789	0.210563

Duncan test; variable %ολικές γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 16.678, df = 12.000					
Error	200.13	12	16.68		

Είδος μανιταριού	{1} 25.2570	{2} 8.5150	{3} 39.417
1		0.000179	0.000220
2	0.000179		0.000095
3	0.000220	0.000095	

Πίνακας 7.16: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση βάρους (%συμπυκνώματος)

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	113.2011	1	113.2011	34.36805	0.000077
Είδος μανιταριού	31.4032	2	15.7016	4.76703	0.029945
Μέθοδος εκχύλισης	4.3022	1	4.3022	1.30616	0.275380
Χρόνος εκχύλισης	8.2694	2	4.1347	1.25530	0.319870
Error	39.5255	12	3.2938		

Duncan test; variable απόδοση βάρους (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3.2938, df = 12.000					
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--

Είδος μανιταριού	{1} 1.1517	{2} 2.0733	{3} 4.2983
1		0.396539	0.013939
2	0.396539		0.055331
3	0.013939	0.055331	

Πίνακας 7.17: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση εκχύλισης β-γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	32745.82	1	32745.82	1472.467	0.000000
Είδος μανιταριού	9254.83	2	4627.42	208.079	0.000000
Μέθοδος εκχύλισης	86.68	1	86.68	3.898	0.071820
Χρόνος εκχύλισης	75.15	2	37.57	1.690	0.225686
Error	266.86	12	22.24		

Duncan test; variable απόδοση εκχ. β-γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 22.239, df = 12.000					
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--	--

Είδος μανιταριού	{1} 12.3570	{2} 66.9030	{3} 48.6970
1		0.000095	0.000172
2	0.000095		0.000186
3	0.000172	0.000186	

Πίνακας 7.18: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση απομόνωσης β-γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	613.4337	1	613.4337	39.28744	0.000041
Είδος μανιταριού	265.3181	2	132.6590	8.49616	0.005028
Μέθοδος εκχύλισης	19.8870	1	19.8870	1.27367	0.281138
Χρόνος εκχύλισης	28.9047	2	14.4524	0.92560	0.422826
Error	187.3679	12	15.6140		

Duncan test; variable απόδοση απομ. β-γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 15.614, df = 12.000

Είδος μανιταριού	{1} 9.5650	{2} 0.5550	{3} 7.3933
1		0.002608	0.360103
2	0.002608		0.011285
3	0.360103	0.011285	

Πίνακας 7.19: Στατιστικά αποτελέσματα για ολική απόδοση β-γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	49.07102	1	49.07102	25.31736	0.000293
Είδος μανιταριού	33.07391	2	16.53696	8.53196	0.004954
Μέθοδος εκχύλισης	2.84809	1	2.84809	1.46942	0.248764
Χρόνος εκχύλισης	4.34054	2	2.17027	1.11972	0.358205
Error	23.25883	12	1.93824		

Duncan test; variable απόδοση ολική β-γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1.9382, df = 12.000

Είδος μανιταριού	{1} 1.0567	{2} 0.3700	{3} 3.5267
1		0.409869	0.009835
2	0.409869		0.002709
3	0.009835	0.002709	

Πίνακας 7.20: Στατιστικά αποτελέσματα για απόδοση %περικετικότητα β-γλυκανών

	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	P
Intercept	7619.540	1	7619.540	1400.048	0.000000
Είδος μανιταριού	1920.007	2	960.004	176.395	0.000000
Μέθοδος εκχύλισης	44.683	1	44.683	8.210	0.014212
Χρόνος εκχύλισης	4.585	2	2.293	0.421	0.665560
Error	65.308	12	5.442		

Duncan test; variable %β-γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5.4423, df = 12.000

Είδος μανιταριού	{1} 24.1880	{2} 6.5117	{3} 31.0230
1		0.000172	0.000425
2	0.000172		0.000095
3	0.000425	0.00095	

Duncan test; variable %β-γλυκ. (υδατάνθρακες (1-3)) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5,4423, df = 12,000

Μέθοδος εκχύλισης	{1} 18.9990	{2} 22.1500
1		0.014370
2	0.014370	

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Chang S. T., Miles P. G., (1989). *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. Boca Raton, CRC Press
- [2] Chang S.T., Ooi V. E. C., (2008). *Mushrooms as Functional Foods*, edited by Cheung P. C., John Wiley & Sons, pp. 3-4, 19, 149-173
- [3] Stamets P., (2005). *Mycelium Running : How Mushrooms can help save the world*, Ten Speed Press, Berkeley, pp. 1-30
- [4] Chikthimmah N., Beelman R. B., (2005). Microbial Spoilage of Fresh Mushrooms from *Microbiology of Fruits and Vegetables*, CRC Press, pp. 135-138
- [5] Ritz K., (2005). *Fungi* pp.110-111
- [6] Courtecuisse R. and Duhem B., (1995). *Mushrooms and Toadstools of Britain and Europe*, Harper Collins Publishers, Fulham Palace Road, London (UK), pp. 77-85
- [7] Wachtel-Galor S., Yuen J., Buswell J. A., Benzie I. F. F., (2011). Chapter 9: *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi) in *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd edition, CRC Press/Taylor & Francis
- [8] Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L., (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds
- [9] Trigoso A., Medellin J. S., (2011). Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research, *Revision Mexicana de Micologia* 34, pp. 63-83
- [10] <https://www.mushroomnutrition.com/>
- [11] Anderson S., Marcouiller D., (1988). Growing Shiitake Mushrooms, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University
- [12] Martínez-Flores H. E., Maya-Cortés D. C., Figueroa-Cárdenas J. D., Garnica-Romo M. G., Ponce-Saavedra J., (2009), Chemical composition and physicochemical properties of shiitake mushroom and high fiber products, *Journal of Food*, Vol. 7, No. 1, pp. 7-14
- [13] Nikitina V. E., Tsivileva O. M., Pankratov A. N., Bychkov N. A., (2007), *Lentinula edodes* Biotechnology – From Lentinan to Lectins, *Food Technol. Biotechnol.* 45 (3),pp. 230–237
- [14] Mao G., Zou Y., Feng W., Wang W., Zhao T., Ye C., Zhu Y., Wu X., Yang L., Wu X., (2014). Extraction, preliminary characterization and antioxidant activity of Se-enriched Maitake polysaccharide, *Carbohydrate Polymers* 101, pp. 213-219
- [15] Svagelj M., Berovic M., Gregori A., Wraber B., Simcic S., Boh B., (2012). Immunomodulating Activities of Cultivated Maitake Medicinal Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Higher Basidiomycetes) on Peripheral Blood Mononuclear Cells, *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14 (4), pp. 377-383
- [16] <http://www.medicalmushrooms.net/>

- [17] Mao J. L., Chang C. N., Huang S. J., Chen C. C., (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia, *Food Chemistry* 87, pp. 111-118
- [18] Mao J. L., Lin H. C., Song S. F., (2002). Antioxidant properties of several specialty mushrooms, *Food Research International* 35, pp. 519-526
- [19] Wang S., Marccone M. F., (2011). The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles, *Food Research International* 44, pp. 2567-2581
- [20] Zarivi O., Cesare P., Aimola P., Ragnelli A. M., Scirri C., Cimini A., Bonfigli A., Pacioni G., Michele Miranda, (2000). Biochemical, electrophoretic and immunohistochemical aspects of malate dehydrogenase in truffles (Ascomycotina), *FEMS Microbiology Letters* 185, pp. 213-219
- [21] Patel S., (2012). Food, Health and Agricultural Importance of Truffles: A Review of Current Scientific Literature, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, Vol. 6 (1), pp. 15-27
- [22] Sillo F., Gissi C., Chignoli D., Ragni E., Popolo L., Balestrini R., (2013). Expression and phylogenetic analyses of the Gel/Gas proteins of *Tuber melanosporum* provide insights into the function and evolution of glucan remodeling enzymes in fungi, *Fungal Genetics and Biology* 53, pp. 10-21
- [23] Cullere L., Ferreira V., Chevret B., Venturini M.E., Sanchez-Gimeno A. C., Blanco D., (2010). Characterization of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry, *Food Chemistry* 122, pp. 300-306
- [24] Beara I. N., Lesjak M. M., Cetojevic-Simin D. D., Marjanovi Z. S., Ristic J. D., Mrkonjic Z. O., Mimica-Dukic N. M., (2014). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles, *Food Chemistry* 165, pp. 460-466
- [25] Rajarathnam S., Sashirekha M. N., (2003). Use of Wild Mushrooms in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier Sciences, 2nd Edition, pp. 4048-4054
- [26] Eo S. K., Kim Y. S., Lee C. K., Han S. S., Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*, *Journal of Ethnopharmacology* 68, pp. 175-181
- [27] Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V., Pizzoferrato L., (1999)]. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study, *Food Chemistry* 65, pp. 477-482
- [28] Caglarirmak N., (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula Edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds, *Food Chemistry* 105, pp.1188-1194
- [29] Quaicoe E. H., Amoah C., Obodai M., Odamtten G. T., (2014). Nutrient Requirements and Environmental Conditions for the Cultivation of the Medicinal Mushroom (*Lentinula Edodes*) (Berk.) in Ghana, *International Journal of Scientific & Technology Research* Volume 3, Issue 12, pp. 45-50

- [30] Phillips K. M., Ruggio D. M., Haytowitz D. B., (2011). Folate composition of 10 types of mushrooms determined by liquid chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry* 129, pp. 630-636
- [31] Tsai S. Y., Weng C. C., Huang S. J., Chen C. C., Mau J. L., (2006). Nonvolatile taste components of *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia, *LWT* 39, pp. 1066-1071
- [32] Kodama N., Kakuno T., Nanba H., (2003). Stimulation of the natural immune system in normal mice by polysaccharide from maitake mushroom, *Mycoscience* 44, pp. 257-261
- [33] Harki E., Bouya D., Dargent R., (2006). Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt., *Food Chemistry* 99, pp.394-400
- [34] Pacioni G., Rapino C., Zarivi O., Falconi A., Leonardi M., Battista N., Colafarina S., Sergi M., Bonfigli A., Miranda M., Basacchi D., Maccarrone M., (2015). Truffles containing endocannabinoid metabolic enzymes and anandamide, *Phytochemistry* 110, pp. 104-110
- [35] Zhao W., Chai D. D., Li H. M., Chen M., Tang Y. J., (2014). Significance of metal ion supplementation in the fermentation medium on the structure and anti-tumor activity of *Tuber* polysaccharides produced by submerged culture of *Tuber melanosporum*, *Process Biochemistry* 49, pp. 2030-2038
- [36] Kivrak I., Kivrak S., Harmandar M., (2014). Amino acid, fatty acid, phenolic, sugar and volatile compounds of *Tuber aestivum* Vittad. from southwestern Turkey: Nutritional value with antioxidant properties, *Mitteilungen Klosterneuburg* 64, pp. 4
- [37] Kruzelyi D., Vetter J., (2013). Complex chemical evaluation of the summer truffle (*Tuber aestivum* Vittadini) fruit bodies, *Journal of Applied Botany and Food Quality* 87, pp. 291-295
- [38] Villares A., Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Ramos A., (2012). Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. Truffles, *Journal of Food Composition and Analysis* 26, pp. 177-182
- [39] Belitz H. –D., Grosch W., Schieberle P., (2014). Κεφάλαιο 1: Αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες και Κεφάλαιο 4: Υδατάνθρακες in *Χημεία Τροφίμων*, 4^η ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα
- [40] Ahmed H., (2005). Extraction of Protein and Purification of Protein in *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization*, CRC Press, London
- [41] Aluko R. E. (2000). The extraction and purification of proteins: an introduction in *Proteins in food processing*, edited by Yada R. Y., CRC Press
- [42] Kavitha R., Damodharan N., Uwadokakelechi D., Bukola O. B., (2015). Ultrasonic-Assisted Extraction and Antibacterial Activities of Protein Recovered from White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*), *International Journal of PharmTech Research*, Vol. 8, No. 5, pp. 991-995
- [43] Tehrani M. H. H., Fakhre hoseini E., Nejad M. K., Mehregan H., Hakemi-Vala M., (2012). Search for Proteins in the Liquid Extract of Edible Mushroom, *Agaricus bisporus*, and Studying their Antibacterial Effects, *Iran J Pharm Res.* 11 (1), pp. 145-150

- [44] Williams D. L., Lowman D. W., Ensley H. E., (2005). Chapter 1: Introduction to the Chemistry and Immunobiology of β -Glucans in *Toxicology of 1 \rightarrow 3-Beta-Glucans – Glucans as a Marker for Fungal Exposure*, edited by Young S. H. and Castranova V., Taylor & Francis Group, CRC Press
- [45] Τζιά Κ., (2009). Συστατικά τροφίμων – Χημεία και ιδιότητες in *Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Συστατικά-Ιδιότητες-Ποιότητα-Μικροβιολογία-Ρεολογία-Συσκευασία*, Ε. Μ. Πολυτεχνείο
- [46] Lazaridou A., Biliaderis C. G., Izydorczyk M. S., (2007). Cereal β -Glucans: Structures, Physical Properties and Physiological Functions in *Functional Food Carbohydrates*, edited by Biliaderis C. and Izydorczyk M. S., CRC Press
- [47] Villares A., (2014). Polysaccharides from Mushrooms: A Natural Source of Bioactive Carbohydrates in *Polysaccharides – Natural Fibers in Food and Nutrition*, edited by Benkeblia N., CRC Press
- [48] Oreopoulou V., Tzia C., (2007). Chapter 11: Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, *Antioxidants, and Colorants in Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Springer
- [49] Brummer Y., Cui S. W., (2006). Chapter 20: Detection and Determination of Polysaccharides in Foods in *Food Polysaccharides and Their Applications*, edited by Stephen A. M., Phillips G. O. and Williams P. A., 2nd edition, CRC Press