



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
ΤΟΥΣ ΣΑΝ ΦΥΣΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΕΥΚΗ-ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΣΠΥΡΙΔΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Π. ΧΡΙΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

■ **Πάυλος Χριστακόπουλος**

Αναπλ. Καθηγητής Ενζυμικής και Μικροβιολογικής Τεχνολογίας Ε.Μ.Π.

(Επιβλέπων Καθηγητής)

■ **Δημήτρης Κέκος**

Καθηγητής Ενζυμικής και Μικροβιολογικής Τεχνολογίας Ε.Μ.Π.

(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

■ **Μόσχος Πολυσίου**

Καθηγητής Ενόργανης Ανάλυσης-Οργανικής Χημείας Γ.Π.Α.

(Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

■ **Φραγκίσκος Κολίσης**

Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Ε.Μ.Π.

■ **Λέανδρος-Αλέξανδρος Σκαλτσούνης**

Καθηγητής Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

■ **Φωκιαλάκης Νικόλας**

Λέκτορας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Ε.Κ.Π.Α.

■ **Καταπόδης Πέτρος**

Λέκτορας Βιοχημικής Μηχανικής ΒΕΤ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής
έτυχε χορήγηση υποτροφίας
από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

L.-M. Papaspyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos, (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical Engineering Journal*, 50 (3), 131–138.

L.-M. Papaspyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos, (2011). Growth and biomass production with enhanced β -glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Science*, 11(1), 65-74.

L.-M. Papaspyridi, P. Christakopoulos. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of dietary fibres and glucans by submerged cultures of two greek mushroom species *Ganoderma australe* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Alimentaria*, accepted.

L.-M. Papaspyridi, V.J. Sinanoglou, I.F Strati, P. Katapodis, P. Christakopoulos. Fatty acid profiles of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma australe* grown in a batch stirred tank bioreactor. *Acta Alimentaria*, accepted.

L.-M. Papaspyridi, N. Aligiannis, P. Christakopoulos, A.-L. Skaltsounis, N. Fokialakis. Production of Bioactive Metabolites of Pharmaceutical and Nutraceutical Interest by Submerged Fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*, submitted.

L.-M. Papaspyridi, E. Topakas, P. Christakopoulos. Production and identification of valuable fatty acids and terpenoids by Submerged Fermentation of *Ganoderma australe* in a Batch Stirred Tank Bioreactor. *In preparation*.

L.-M. Papaspyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos, (2007). Studies on the production of statins by greek isolates of Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 131 (2S), S61-S62.

L.-M. Papaspyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos, (2009). Optimization of the medicinal mushroom *G. australe* biomass production using Response Surface Methodology. *Planta Medica*, 75, 946.

L.-M. Papaspyridi, N. Aligiannis, P. Christakopoulos, A.-L. Skaltsounis, N. Fokialakis. Production of Bioactive Metabolites with Pharmaceutical and Nutraceutical Interest by Submerged Fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor. *Procedia Food Science*, accepted.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Λ.-Μ. Παπασπυρίδη, Π. Καταπόδης, Ζ. Γκόνου-Ζαγκου, Ε. Καψανάκη-Γκότση, Π. Χριστακόπουλος. Βιοτεχνολογική παραγωγή στατινών από ελληνικούς εδώδιμους Βασιδιομύκητες με σκοπό την ένταξη τους στη διατροφή μας για πρόληψη και θεραπεία της υπερχοληστεριναΐμιας. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα, 29-31 Μαρτίου 2007, Πρακτικά Συνεδρίου 329-333

Λ.-Μ. Παπασπυρίδη, Π. Καταπόδης, Ζ. Γκόνου-Ζαγκου, Ε. Καψανάκη-Γκότση, Π. Χριστακόπουλος. Φυσιολογική Μελέτη Βασιδιομυκήτων που απομονώθηκαν στην Ελλάδα για την παραγωγή στατινών. 6^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Αθήνα, 31 Μαρτίου- 2 Ιουνίου 2007, Πρακτικά Συνεδρίου, 1169-1172 (Τόμος Β)

L.-M. Papasyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos. Screening of Basidiomycetes for statin production. XV Congress of European Mycologists (XVCEM), St. Petersburg, Russia, 16-21 September 2007

L.-M. Papasyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos. Studies on the production of statins by greek isolates of Basidiomycetes. 13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, Spain, 16-19 September 2007

Λ.-Μ. Παπασπυρίδη, Π. Καταπόδης, Ζ. Γκόνου-Ζαγκου, Ε. Καψανάκη-Γκότση, Π. Χριστακόπουλος. «Βελτιστοποίηση παραγωγής βιομάζας επιλεγμένων στελεχών Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα». 1^ο Εθνικό Συνέδριο Επιστημονικής Εταιρείας Μικροβιόκοσμος, Αθήνα, 12-14 Δεκεμβρίου 2008

L.-M. Papasyridi, P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi, P. Christakopoulos. Optimization of the medicinal mushroom *G.australe* biomass production using Response Surface Methodology. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva, Switzerland, 16-20 August 2009

L.-M. Papasyridi, N. Aligiannis, P. Christakopoulos, A.-L. Skaltsounis, N. Fokialakis. Production of Bioactive Metabolites with Pharmaceutical and Nutraceutical Interest by Submerged Fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor. 11th International Congress on Engineering and Food, Athens, Greece, 22-26 May 2011

L.-M. Papasyridi, E. Topakas, N. Aligiannis, P. Christakopoulos, A.-L. Skaltsounis, N. Fokialakis. Optimization of biomass production with enhanced bioactive compound content by the medicinal mushroom *Ganoderma australe* under submerged culture. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya, Turkey, 4-9 September 2011

Στους γονείς μου, Κώστα και Ντίνα

H

παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή Παύλου Χριστακόπουλου.

Καθώς η διδακτορική διατριβή είναι μια μακροχρόνια και επίπονη διαδικασία θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που στάθηκαν αρωγοί σε αυτήν μου τη προσπάθεια.

Κατ'αρχήν θέλω να εκφράσω τις την ευγνωμοσύνη μου στον Αναπλ. Καθηγητή Παύλο Χριστακόπουλο για την αδιάκοπη συμπαράσταση, την άριστη καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς υπήρξε πάντοτε πρόθυμος να ακούσει τους προβληματισμούς μου και να προτείνει εναλλακτικές λύσεις, μεταδίδοντας παράλληλα την εμπιστοσύνη του και την αισιοδοξία του. Για μένα δεν ήταν απλά ο επιβλέπων καθηγητής αλλά ο δάσκαλός μου.

Ο Καθηγητής Δημήτρης Κέκος, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής με βοήθησε σημαντικά υποδεικνύοντας χρήσιμες συμβουλές, πάντα πρόθυμος για επιστημονικές και όχι μόνο συζητήσεις. Τον ευχαριστώ για το χρόνο που αφιέρωσε εν γένει στη διατριβή μου και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του.

Ο Καθηγητής Μόσχος Πολυσίου μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής μου συμπαράσταθη καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου από προπτυχιακό επίπεδο ακόμα. Τον ευχαριστώ για το ειλικρινές ενδιαφέρον του.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέτασή μου και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν προς ανάγνωση της διατριβής μου. Επιπλέον όμως, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Φραγκίσκο Κολίση για το ενδιαφέρον του κατά την εκπόνηση της εργασίας μου. Ακόμα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Λέανδρο-Αλέξανδρο Σκαλτσούνη για την ευγενική φιλοξενία του στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων καθώς και για απλόχερη παραχώρηση όλων των αναγκαίων μέσων για την απρόσκοπτη προώθηση της μελέτης μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα το Λέκτορα Καταπόδη Πέτρο και το Λέκτορα Φωκιαλάκη Νικόλα για την σημαντική βοήθεια τους τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής, αφού αποτέλεσαν για μένα πραγματικά σύμμαχοι κατά τη διάρκεια όλης της προσπάθειας μου. Τους ευχαριστώ πολύ για την υπομονή τους.

Θα ήταν παράλειψη μου στο σημείο αυτό να μην εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον πάντοτε παρόντα Καθηγητή Βασίλη Μακρή, που με παρότρυνε στην έρευνα αλλά και για τη συνεχή ηθική συμπαράστασή που μου πρόσφερε καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας

Επίσης ευχαριστώ τη Λέκτορα Ζάπη Γκόνου-Ζάγκου καθώς και τη Λέκτορα Ευαγγελία Καιψανάκη-Γκότση του Τομέα Συστηματικής και Οικολογίας Μυκήτων του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. που μας παρείχαν το βιολογικό υλικό για τη διατριβή, αλλά και για τις χρήσιμες συμβουλές τους σε θέματα μικροβιολογίας των μυκήτων, καθώς επίσης για τη κριτική διόρθωση της μελέτης μου.

Ακόμα, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες μου στο Δρα Βαγγέλη Τόπακα για τις επιστημονικές συμβουλές και την ουσιαστική στήριξη που μου πρόσφερε όλο αυτό το διάστημα.

Επιπλέον, ευχαριστώ το Λέκτορα Νεκτάριο Αληγιάννη για το ενδιαφέρον του που έδειξε για την ανάγνωση των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ενόργανης Ανάλυσης του Τ.Ε.Ι. Αθηνών, Βασιλεία Σινάνογλου αλλά και την υποψ. Δρα Ρένα Στρατή για τη σημαντική συνεισφορά τους στη μελέτη προσδιορισμού των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία, όπως και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους ερευνητές από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και ιδιαίτερα τη Δρα Χριστίνα Βαφειάδη, τη Δρα Στέλλα Καλαντζή, την υποψ. Δρα Μαρία Δημαρόγκωνα, το Δρα Γιάννη Δόγαρη, το Δρα Χάρη Ξηρό και τον υποψ. Δρα Σταύρο Γκρέμο για το ζεστό περιβάλλον συνεργασίας. Ακόμα, ευχαριστώ τη Δρα Μίκυ Μαμμά για την προθυμία και το ενδιαφέρον της, και βεβαίως τις φίλες μου Δρα Ελισάβετ Κούρτογλου και Υποψ. Δρα Μαρία Μουκούλη με τις οποίες συμπορευτήκα έχοντας κοινές αγωνίες και προβληματισμούς όλο αυτό το διάστημα.

Ευχαριστώ ακόμα τη Μαρία Λαλιώτη για την άριστη συνεργασία, την υπομονή της αλλά και την ακούραστη διάθεσή της να με βοηθήσει τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής μου. Και βέβαια, ευχαριστώ και όλους τους άλλους μεταπτυχιακούς φοιτητές από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων που εκτός από το ερευνητικό ενδιαφέρον τους με αγάλιασαν στο δικό τους χώρο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ το Γιώργο, τον Πάνο, τον Αποστόλη, την Κατερίνα, την Τίνα, και τη Γεωργία.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους συναδέλφους ερευνητές από το Εργαστήριο Τροφίμων Ε.Μ.Π. που με βοήθησαν στα πειράματα προσδιορισμού της χημικής σύστασης των μυκήτων, αλλά και για την ηθική συμπαράστασή τους.

Κλείνοντας, αμέριστη ήταν η προσφορά του συζύγου μου Γρηγόρη που στάθηκε δίπλα μου με υπομονή και ανέχθηκε την ιδιαιτερότητα της πολύωρης πειραματικής εργασίας μου στο Εργαστήριο, αλλά και των γονέων μου, Κώστα και Ντίντας καθώς της αδελφής μου, Δήμητρας για την προτροπή, την ενθάρρυνση και την αισιοδοξία τους...

Αθήνα, Ιούλιος 2011

Λέρια Παπασπυρίδη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	σελ.
Συντμήσεις και Ξενόγλωσσοι Όροι	1
Περίληψη	3
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ	
1.1. Ιστορική Αναδρομή	8
1.2 Μανιτάρια: Ορισμός, Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	8
1.3 Βιομηχανικές Εφαρμογές Μακρομυκήτων	10
1.4 Οικονομικές και Κοινωνικές Επιδράσεις της Βιομηχανίας Μανιταριών	11
1.5 Εμπορική Καλλιέργεια Μανιταριών	12
1.6 Παγκόσμια και Ελληνική Παραγωγή Μανιταριών	15
1.7 Διατροφική Αξία Μανιταριών	16
1.8 Λειτουργικά Διατροφικά Συστατικά των Μακρομυκήτων	21
1.8.1 Ολικές Διαιτητικές Ίνες	22
1.8.1.1 Χιτίνη	23
1.8.1.2 Γλουκάνες	24
1.8.2 Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα	27
1.8.3 Αντιοξειδωτικά	29
1.8.4 Τερπενοειδή	30
1.8.5 Αρωματικές Ενώσεις	32
1.9 Φαρμακευτική Αξία των Μακρομυκήτων	33
1.9.1 Αντικαρκινική Δράση	34
1.9.2 Αντιαθηρογενετική Δράση	34
1.9.3 Αντιμικροβιακή Δράση	35
1.9.4 Υπογλυκαιμική Δράση	35
1.9.5 Αντιφλεγμονώδης Δράση	35
1.10 Παραγωγή Φαρμακευτικών Προϊόντων από Μακρομύκητες	36
1.11 Ανάπτυξη Μακρομυκήτων σε Βυθισμένη Καλλιέργεια	37
1.11.1 Στερεά και Υγρή Βυθισμένη Καλλιέργεια	37
1.11.2 Ανάπτυξη και Σύνθεση Προϊόντων των Μακρομυκήτων σε Συνθήκες ΖΥΚ	39

1.11.2.1 Φυσιικοί Παράγοντες	40
1.11.2.2 Χημικοί Παράγοντες	46
1.11.2.3 Βιολογικοί Παράγοντες	56
1.11.3 Αριστοποίηση των Παραμέτρων Καλλιέργειας των Μακρομυκήτων	60
1.12 Περιγραφή των Μελετούμενων Ειδών Μακρομυκήτων	60
1.12.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	60
1.12.1.1 Ταξινομικά και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	61
1.12.1.2 Ανάπτυξη σε Βυθισμένη Καλλιέργεια	62
1.12.1.3 Διατροφική και Φαρμακευτική αξία	63
1.12.1.4 Βιοενεργές Ενώσεις ειδών του γένους <i>Pleurotus</i>	64
1.12.1.4.1 Πολυσακχαρίτες	64
1.12.1.4.2 Τερπενοειδή και Στεροειδή	65
1.12.1.4.3 Αρωματικές και Πτητικές Ενώσεις	67
1.12.1.4.4 Πρωτεΐνες και Λεκτίνες	67
1.12.1.4.5 Ριβονουκλεάσες, DNA	68
1.12.2 <i>Ganoderma australe</i>	68
1.12.2.1 Ταξινομικά και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	69
1.12.2.2 Ανάπτυξη σε Βυθισμένη Καλλιέργεια	70
1.12.2.3 Φαρμακευτική Αξία	73
1.12.2.4 Βιοενεργές Ενώσεις Ειδών του γένους <i>Ganoderma</i>	74
1.12.2.4.1 Πολυσακχαρίτες	74
1.12.2.4.2 Τερπενοειδή και Στεροειδή	75
1.12.2.4.3 Πρωτεΐνες και Λεκτίνες	80
1.12.2.4.4 Νουκλεοζίτες και Νουκλεοτίδια	80
1.12.2.4.5 Αλκαλοειδή, Βιταμίνες, Αρωματικές Ενώσεις και Λιπαρά οξέα	81

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	82
2.1 Μικροοργανισμοί	82
2.1.1 Επιλογή στελεχών Βασιδιομυκήτων	82
2.1.2 Διατήρηση στελεχών Βασιδιομυκήτων	83

2.2. Χημικά αντιδραστήρια	84
2.3 Υλικά-Όργανα-Χρωματογραφικές Τεχνικές	84
2.4 Ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες μικρής κλίμακας	86
2.4.1 Αρχική αξιολόγηση στελεχών	86
2.4.2 Αξιολόγηση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών	86
2.4.3 Αξιολόγηση πηγών άνθρακα και αζώτου για τα επιλεγμένα μέσα ανάπτυξης	87
2.4.3.1 Ανάλυση με την FF Biolog μικροσυστοιχεία (Biolog FF MicroPlate)	87
2.4.3.2 Προσδιορισμός των καταλληλότερων πηγών άνθρακα και αζώτου	90
2.4.3.3 Προσδιορισμός της άριστης αρχικής συγκέντρωσης των επιλεγμένων πηγών άνθρακα και αζώτου	91
2.4.4 Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση	91
2.5 Ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας	93
2.5.1 Προσδιορισμός των εναπομεινάντων σακχάρων στην καλλιέργεια	94
2.6 Χημική Ανάλυση του μυκηλίου και των καρποσωμάτων	95
2.6.1 Προσδιορισμός της περιεχόμενης Υγρασίας	95
2.6.2 Προσδιορισμός των περιεχόμενων Πρωτεϊνών	95
2.6.3 Προσδιορισμός του περιεχόμενου Λίπους	97
2.6.4 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων	99
2.6.5 Προσδιορισμός της περιεχόμενης τέφρας	100
2.6.6 Προσδιορισμός των Ολικών Διαιτητικών Ινών (TDF)	100
2.6.7 Προσδιορισμός των Ολικών Γλουκανών (α - και β - γλουκάνες)	102
2.6.8 Προσδιορισμός των Εξωκυτταρικών Πολυσακχαριτών (EPS)	102
2.7 Μελέτη των Βιοδραστικών Μεταβολιτών	103
2.7.1 Εκχύλιση	103
2.7.1.1 Εκχύλιση της βιομάζας του <i>P. ostreatus</i> με την τεχνική ASE	103
2.7.1.2 Εκχύλιση της βιομάζας του <i>G. australe</i>	105
2.7.2 Απομόνωση και Ταυτοποίηση των Μεταβολιτών	106
2.7.2.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	107
2.7.2.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	107
2.7.2.3 Υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (VLC)	107
2.7.2.4 Παρασκευαστική Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	108

2.7.2.5 Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC)	109
2.7.2.6 Υγρή χρωματογραφία ανοιχτού τύπου, μοριακού αποκλεισμού	110
2.7.2.7 Χρωματογραφία Προσρόφησης	111
2.7.2.8 Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (FCPC)	112
2.7.2.9 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS)	116
2.7.2.10 Φασματοσκοπία μάζας (MS)	117
2.7.2.11 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ 119

3.1 Αξιολόγηση στελεχών Βασιδιομυκήτων ως προς την παραγωγή βιομάζας	119
--	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *G. australe* ATHUM 4345

4.1 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με μικροσυστοιχεία FF Biolog	123
4.2 Αξιολόγηση μέσων ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες	129
4.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή βιομάζας	130
4.4 Επίδραση πηγών αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	132
4.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	134
4.6 Συνδυαστική επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	137
4.7 Μελέτη της ανάπτυξης του <i>G. australe</i> σε βιοαντιδραστήρα 20-L	141
4.8 Χημική σύσταση του μυκηλίου του <i>G. australe</i> από την ανάπτυξή του σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας	144
4.9 Επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων	147
4.10 Επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή ολικών διαιτητικών ινών και γλουκανών	154

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 159

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *P. ostreatus* ATHUM 4438

5.1 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με μικροσυστοιχεία FF Biolog	159
5.2 Αξιολόγηση μέσων ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες	165
5.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή βιομάζας	167
5.4 Επίδραση πηγών αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	171
5.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	173
5.6 Συνδυαστική επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας	175
5.7 Μελέτη της ανάπτυξης του <i>P. ostreatus</i> σε βιοαντιδραστήρα	179
5.8 Χημική σύσταση του μυκηλίου του <i>P. ostreatus</i> από την ανάπτυξή του σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας	184
5.9 Επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων	188
5.10 Επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών	195

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 200

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ *G. australe* ATHUM 4345

6.1 Χρωματογραφικός Έλεγχος του προφίλ μεταβολιτών	201
6.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του (LGT) ολικού εκχυλίσματος	201
6.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA1 κλάσματος	202
6.2.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA2 κλάσματος	207
6.2.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGC2 κλάσματος	211
6.2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA3 κλάσματος	214

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 224

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ *P. ostreatus*
ATHUM 4438**

7.1 Χρωματογραφικός Έλεγχος του Προφίλ μεταβολιτών	224
7.2 Παραλαβή εκχυλισμάτων του <i>P. ostreatus</i> με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE)	226
7.3 Σύγκριση των Εκχυλισμάτων ASE με TLC	227
7.4 Μελέτη της χημικής σύστασης του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος	229
7.4.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA9	234
7.4.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA10	238
7.4.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRA	248
7.4.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA12	249
7.4.3.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMB7	250
7.4.4 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA13	253
7.5 Μελέτη της χημικής σύστασης του μεθανολικού εκχυλίσματος	256
7.5.1 Μελέτη του LPXDM κλάσματος με FCPC	257
7.5.1.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE	260
7.5.1.1.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRC	261
7.5.1.1.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRD	265
7.5.1.1.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE10	268
7.5.1.1.4 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE12	270
7.5.1.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXM7	270
7.5.1.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRE	272

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 278

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

8.1 Συνοπτικά Συμπεράσματα Διδακτορικής Διατριβής	279
8.1.1 Παραγωγή βιολειτουργικών συστατικών και βιοενεργών μεταβολιτών από το <i>G. australe</i> σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας	279
8.1.2 Παραγωγή βιολειτουργικών συστατικών και βιοενεργών μεταβολιτών από το <i>P. ostreatus</i> σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας	288

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σύντμηση	Πλήρης ονοματολογία
ACN	AC eto N itrile Ακετονιτρίλιο
ALA	A - L inoleic Acid α-λινολενικό οξύ
ARA	AR ahidonic Acid Αραχιδονικό οξύ
ASE	Accelerated Solvent Extraction Επιταχυνόμενη Εκχύλιση
CD ₃ OD	Deuterated Methanol Δευτεριωμένη Μεθανόλη
CDCl ₃	Deuterated Chloroformium Δευτεριωμένο Χλωροφόρμιο
CSL	Corn Steep Liquor Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού
DHA	D ocosa H exaenoic Acid Εικοσιδωα-εξα-εν-οϊκό οξύ
EPA	E icosa P entaenoic Acid Εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ
ESI	Electrospray Ionization Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού
EtOAc	Ethyl Acetate Οξικός Αιθυλεστέρας
FAMES	Fatty Acid Methyl Esters Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας
GLU	GLU cose Γλυκόζη
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας
MeOH	Methanol Μεθανόλη
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης
MUFA	MonoUnsaturated Fatty Acids Μονοακόρεστα Λιπαρά Οξέα
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acids Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα

RSM	Response Surface Methodology Μεθοδολογία της Επιφανειακής Απόκρισης
SFA	Saturated Fatty Acids Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα
SM	Soybean Meal Αλεσμένη Σόγια
TDF	Total Dietary Fibers Ολικές Διαιτητικές Ίνες
TFA	Total Fatty Acids Συνολικά Λιπαρά Οξέα
TLC	Thin Layer Chromatography Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας
UFA	Unsaturated Fatty Acids Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα
VLC	Vacuum Liquid Chromatography Υγρή χρωματογραφία στήλης ανοιχτού τύπου υπό κενό
XYL	XYlose Ξυλόζη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
YE	Yeast Extract Εκχύλισμα ζύμης
ΚΚΟ	Κύκλος του Κιτρικού Οξέος
ΖΣΚ	Ζύμωση Στερεάς Κατάστασης
ΖΥΚ	Ζύμωση Υγρής Κατάστασης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν δύο είδη μακρομυκήτων ιδιαίτερου φαρμακευτικού και διατροφικού ενδιαφέροντος με σκοπό τη βιοτεχνολογική αξιοποίησή τους ως φυσική πηγή βιολειτουργικών διατροφικών συστατικών. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε το κοσμοπολιτικό ο εδώδιμο *P. ostreatus* με άριστες οργανοληπτικές ιδιότητες, καθώς και το *G. australe*, το γένος του οποίου θεωρείται από τα σημαντικότερα ως προς την παραγωγή πολύτιμων φαρμακευτικών ενώσεων. Τα στελέχη των παραπάνω μακρομυκήτων που μελετώνται για πρώτη φορά, συλλέχτηκαν από τον Ελλαδικό χώρο και βρίσκονται κατατεθειμένα στη Συλλογή Καλλιεργειών ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών (ATHUM 4438 και ATHUM 4345, αντίστοιχα).

Δεδομένου ότι η διεργασία παραγωγής των καρποσωμάτων των μακρομυκήτων των οποίων η ανάπτυξη γίνεται σε κορμούς δέντρων ή σε υποστρώματα από λιγνινοκυτταρινούχα υλικά και που εφαρμόζεται σήμερα για τα περισσότερα από τα διαθέσιμα στην αγορά προϊόντα μακρομυκήτων κρίνεται χρονικά ασύμφορη και μη αποδοτική, η ανάπτυξη των μακρομυκήτων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες υγρής βυθισμένης καλλιέργειας.

Στα πλαίσια αυτής της προσέγγισης και γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία τις δυσκολίες ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε διεργασίες υγρής καλλιέργειας ο αρχικός στόχος της παρούσας μελέτης προσανατολίστηκε στον προσδιορισμό του καταλληλότερου μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας. Η επιλεκτική αφομοίωση 95 διαφορετικών πηγών άνθρακα από τα επιλεγμένα στελέχη μακρομυκήτων με τη χρήση της μεγάλης αποδοτικότητας μεταβολικής ανάλυσης FF Biolog (Hayward, CA) επέτρεψε την αρχική χαρτογράφηση του μεταβολισμού τους και τον περαιτέρω ορθότερο σχεδιασμό του μέσου ανάπτυξης για την παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών από αυτούς τους μικροοργανισμούς. Ακολούθησε η μελέτη των πηγών άνθρακα για τις οποίες σημειώθηκε υψηλή τιμή μιτοχονδριακής ενεργότητας με βάση την παραπάνω μεταβολική ανάλυση καθώς και 10 διαφορετικών πηγών αζώτου που αναφέρονται στη σύγχρονη διεθνή βιβλιογραφία, ως προς την επίδρασή τους στην παραγωγή βιομάζας και για τα δύο στελέχη μακρομυκήτων σε μικρής κλίμακας υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Στη συνέχεια, με τη μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης βασιζόμενη σε κεντρικό πειραματικό σχεδιασμό διερευνήθηκε η βέλτιστη σύνθεση του μέσου ανάπτυξης για την παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας.

Σχετικά με το *G. australe*, μετά τη μελέτη αριστοποίησης χρησιμοποιώντας το βέλτιστο μέσο ανάπτυξης (13.7 g/L γλυκόζη, 30 g/Λεκχύλισμα ζύμης, 2.2 g/L KH_2PO_4 και 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) η παραγόμενη βιομάζα αυξήθηκε κατά 48%. Αντίστοιχα για το *P. ostreatus*, η παραγόμενη βιομάζα χρησιμοποιώντας το βέλτιστο μέσο ανάπτυξης (57g/L ξυλόζη, 37g/L εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, 1 g/L K_2HPO_4 και 0.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) αυξήθηκε κατά 15%. Ακολούθησε κλιμάκωση μεγέθους με τη δοκιμή του βέλτιστου μέσου ανάπτυξης και για τους δύο μακρομύκητες σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου συνεχούς ανάδευσης όγκου 20L. Για το *G. australe*, ο ολικός ρυθμός ανάπτυξης σχεδόν διπλασιάστηκε στην περίπτωση της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες στις φιάλες. Επιπλέον, η τιμή $Y_{x/s}$ βρέθηκε κατά 73% περίπου υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που έχει αναφερθεί έως σήμερα για το ίδιο είδος σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας. Σχετικά με το *P. ostreatus*, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βρέθηκε υψηλότερος κατά 22% περίπου σε σχέση με τον αντίστοιχο που έχει αναφερθεί ξανά για τον ίδιο μικροοργανισμό. Ακόμα, η τιμή $Y_{x/s}$ καθώς και της παραγωγικότητας βρέθηκε η υψηλότερη που έχει αναφερθεί από τα έως σήμερα δεδομένα για τον ίδιο μικροοργανισμό σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα. Και για τους δύο μακρομύκητες, οι καλύτερες συνθήκες αερισμού φαίνεται να είναι ο πλέον σημαντικός παράγοντας για την παρατηρηθείσα αύξηση της παραγωγικότητας. Η απόδοση των διατροφικά πολύτιμων ολικών διαιτητικών ινών και των ολικών γλουκανών που προσδιορίστηκαν στο μυκήλιο από την ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων στο βιοαντιδραστήρα, βρέθηκαν επί ξηρού περίπου 340 mg/g και 95mg/g αντίστοιχα για το *G. australe*, και 625 mg/g και 140 mg/g αντίστοιχα για το *P. ostreatus*.

Λαμβάνοντας υπόψη το ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των μακρομυκήτων στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων ως πηγή φαρμακοδιατροφικών συστατικών σε διατροφικά συμπληρώματα, μελετήθηκε ακόμα η σύσταση της βιομάζας από την ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα ως προς το περιεχόμενό της σε πρωτεΐνες, λίπος, τέφρα και τις διατροφικές πολύτιμες διαιτητικές ίνες καθώς και τις ολικές γλουκάνες (α - και β -γλουκάνες), σε σχέση με του φυσικά απαντώμενου καρποσώματος και για τα δύο είδη μακρομυκήτων. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων και των δύο μακρομυκήτων μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης με GC του μη πολικού λιπαρού εκχυλίσματος που προήλθε από τα μυκήλια και τα αντίστοιχα καρποσώματα. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προέκυψαν

και για τους δύο μακρομύκητες σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο μυκήλιο από τη βυθισμένη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα και το αντίστοιχο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμα. Οι διαφορές που σημειώθηκαν ίσως να δικαιολογούνται λαμβάνοντας υπόψη ότι οι δύο μορφές ανάπτυξης αντιπροσωπεύουν διαφορετικές φάσεις του βιολογικού κύκλου του Βασιδιομύκητα. Επιπλέον, το μυκήλιο αναπτύχθηκε *in vitro* σε απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες που δύσκολα ταυτίζονται με τις πραγματικά υφιστάμενες συνθήκες ανάπτυξης που επικρατούν στην φύση.

Επίσης, με σκοπό την οικονομικά συμφέρουσα μέγιστη απόδοση των διατροφικά πολύτιμων και βιολογικά ενεργών πολυσακχαριτών που παράγουν οι μακρομύκητες, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή αυτών σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε φιάλες. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η χρήση γλυκόζης και μαλτόζης ως πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης του *G. australe* και του *P. ostreatus* αντίστοιχα, και εκχυλίσματος ζύμης ως πηγή αζώτου και για τις δύο περιπτώσεις, προώθησαν την παραγωγή διαιτητικών ινών, ενώ συγχρόνως οδήγησαν στην υψηλότερη παραγωγή των βιολογικά ενεργών β-γλουκανών.

Τέλος, το αντικείμενο της διατριβής κινήθηκε και στην επιστημονική περιοχή των φυσικών προϊόντων μικροβιακής προέλευσης, την απομόνωσή τους και τη δομική ταυτοποίησή τους. Με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών που παράχθηκαν από τους δύο Βασιδιομύκητες σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα, διεξάχθηκε αρχικά λιοφυλίωση και εκχύλιση της συλλεγόμενης βιομάζας. Η εκχύλιση για το *G. australe* πραγματοποιήθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και κυκλοεξάνιο, ενώ για το *P. ostreatus* εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), κατά την οποία παρελήφθησαν τέσσερα εκχυλίσματα, το κυκλοεξανικό, το διχλωρομεθανικό, το μεθανολικό και το υδατικό. Για την ταυτοποίηση των ουσιών που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν φασματοσκοπικές τεχνικές (^{13}C -NMR, ^1H -NMR και 2D NMR, ESI-HRMS), χημικές συσχετίσεις σε συνδυασμό με τις GC/MS αναλύσεις, καθώς επίσης διεξάχθηκε σύγκριση με τα σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα.

Για το *G. australe*, εφαρμόστηκε κλασματοποίηση του αρχικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας τεχνικές υγρής χρωματογραφίας (VLC και παρασκευαστικής TLC), ενώ απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 5 μεταβολίτες. Ειδικότερα, απομονώθηκαν η εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη (**1**), το λινολεϊκό οξύ (**2**), το 19- οκτακοσενοϊκό οξύ (**3**), ένα ανάλογο της αυστρολακτόνης (**4**) και το 9-παλμιτολεϊκό οξύ (**5**). Βασιζόμενοι σε σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα, όλοι οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το μυκήλιο του *G. australe* φαίνεται να είναι ιδιαίτερου φαρμακοδιατροφικού ενδιαφέροντος. Η παρουσία του

19-οκτακοσενοϊκού οξέος που αποτελεί ένα πολύ μακράς αλυσίδας ακόρεστο λιπαρό οξύ, δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν για το *G. australe*. Αν και η απομόνωση της εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλης και του 9-παλμιτολεϊκού οξέος από τα καρποσώματα του *G. australe* έχει αναφερθεί και στο παρελθόν από άλλους ερευνητές, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η παρουσία τους στο μυκήλιο του μακρομύκητα προερχόμενο από την ανάπτυξή του σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα.

Τέλος, σχετικά με το *P. ostreatus*, από το διχλωρομεθανικό και μεθανολικό εκχύλισμα απομονώθηκαν οι κυριότεροι μεταβολίτες του με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος βασίστηκε κυρίως στις χρωματογραφικές τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης, του μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20, καθώς και της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Βασικά συστατικά του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του είδους *P. ostreatus* αποτέλεσαν λιπαρά οξέα και παράγωγά τους, καθώς και δύο φαινολικοί μεταβολίτες, ένα αλκαλοειδές και ένα νουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα: το παλμιτικό οξύ (1), ο μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (2), ο μεθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος (3), ο αιθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος (4), το στεαρικό οξύ (5), ο αιθυλεστέρας του στεαρικού οξέος (6), το ελαϊκό οξύ (7), ο μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (8), το βενζοϊκό οξύ (9), η *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη (10), η π-υδροξυβενζαλδεΐδη (11), το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ (12) και η ουρακίλη (13).

Για την αποτελεσματική εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφική τεχνική της προσρόφησης, χρησιμοποιώντας ρητίνη τύπου XAD-4. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του φαινολικού κλάσματος που προέκυψε βασίστηκε κυρίως στην τεχνική της χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση, του μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20, καθώς και της παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα του *P. ostreatus* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα: η 3-φορμύλ-πυρρόλη (14), το π-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (15), η ουριδίνη (16), η ουρακίλη (13), το νικοτινικό οξύ (17) και το νικοτιναμίδιο (18).

Με βάση σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα, όλοι οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το μυκήλιο του *P. ostreatus* βρίσκουν ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, αρωμάτων και φαρμάκων, δεδομένου ότι είναι βιοδραστικές ενώσεις. Μάλιστα, η *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη, το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ, η 3-

φορμύλ-πυρρόλη και το π-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ αποτελούν φυσικά προϊόντα που ενώ έχουν στο παρελθόν αναφερθεί για άλλους μύκητες, απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το *P. ostreatus*.

Συνοψίζοντας, τα δεδομένα αυτής της εργασίας αποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη διεργασία ανάπτυξης του *G. australe* και του *P. ostreatus* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας οδήγησαν σε υψηλή παραγωγή βιομάζας πλούσια σε βιοδραστικούς μεταβολίτες. Επιπλέον, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής θέτουν τη βάση και για μια ελκυστικά συμφέρουσα και αποδοτική προσέγγιση παραγωγής αυτών των συστατικών ιδιαίτερου φαρμακευτικού και διατροφικού ενδιαφέροντος σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιομηχανική κλίμακα.

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή

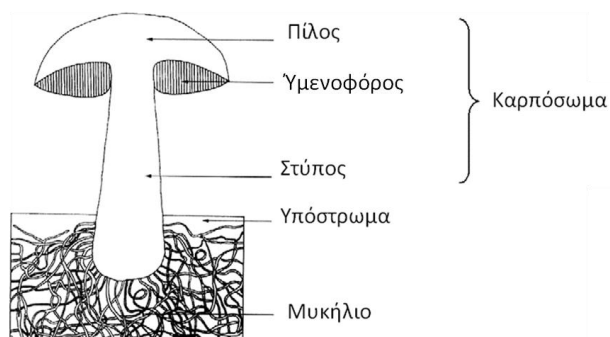
Οι πρώτες αναφορές σε μύκητες χρονολογικά ανάγονται στην εποχή των αρχαίων Ελλήνων και Ρωμαίων. Στους Ρωμαίους ανήκει η παλαιότερη γνωστή απεικόνιση μύκητα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε μια τοιχογραφία που διασώθηκε στην Πομπηία κατά την έκρηξη του Βεζουβίου (79 μ.Χ.) στην οποία απεικονίζονται μανιτάρια. Ο Ιπποκράτης τον 5^ο αιώνα π.Χ., ο Θεόφραστος και αργότερα ο Πλούταρχος και ο Διοσκουρίδης αναφέρουν στα κείμενά τους τα μανιτάρια. Επίσης, ο αρχαίος συγγραφέας Νίκανδρος, στο έργο του «Γεωργικά», επισημαίνει με ένα ιδιαίτερο τρόπο την ύπαρξη δηλητηριωδών μανιταριών.

Η συλλογή και κατανάλωση των μανιταριών ήταν γνωστή από τους προϊστορικούς χρόνους. Οι Αιγύπτιοι, οι Βαβυλώνιοι και αργότερα οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι ήταν συλλέκτες μανιταριών, τα οποία τα θεωρούσαν ως «τροφή θεών και βασιλέων». Ωστόσο, μερικές φορές τα μανιτάρια προκαλούσαν δέος και συνάμα φόβο λόγω των δηλητηριωδών ιδιοτήτων τους. Τα παραισθησιογόνα μανιτάρια θεωρήθηκαν «μαγικοί» οργανισμοί και η απανταχού παρουσία τους συνδέθηκε με δεισιδαιμονίες, μύθους και παραδόσεις, ενώ παράλληλα επηρέασαν βασικές φιλοσοφίες και θρησκείες σε γνωστούς πολιτισμούς της αρχαιότητας (Ελλάδα, Ινδία, Κ. Αμερική). Για παράδειγμα, οι αρχαίοι πίστευαν ότι οι τρούφες παράγονται όταν βρέχει, καθώς πίστευαν ότι με τους κεραυνούς οι υπόγειοι αυτοί μύκητες ξεπετάγονταν από το έδαφος.

1.2 Μανιτάρια: Ορισμός, μορφολογία

Ο όρος *μύκης* χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Θεόφραστο (4^{ος} π.Χ. αιώνας) στο έργο του «Περί Φυτών Ιστορίαι» για να χαρακτηρίσει αυτό που αποκαλούμε σήμερα *μανιτάρι*. Η λέξη *μανιτάρι* είναι ουσιαστικά παραφθορά της λέξης *αμανίτης* που παραπέμπει στο γένος *Amanita* με σαρκώδη καρποσώματα.

Μανιτάρια, σύμφωνα με τους Chang & Miles (1992), ορίζονται οι μακρομύκητες με διακριτά καρποσώματα, δηλαδή ορατά με γυμνό μάτι, που αναπτύσσονται υπέργεια ή υπόγεια. Τα καρποσώματα σχηματίζονται κατά την εγγενή αναπαραγωγή των μακρομυκήτων και το μέγεθος τους μπορεί να κυμαίνεται από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και άνω του μισού μέτρου.



Σχήμα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων που διακρίνονται σε ένα μακρομύκητα (μανιτάρι)

Τα καρποσώματα αποτελούν συνεπώς αναπαραγωγικές δομές, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και μοναδικός σκοπός τους είναι η παραγωγή σπορίων για τη διαίωσιση των ειδών (Σχ. 1.1). Το υπόλοιπο τμήμα του μακρομύκητα, που αποτελεί το σώμα (θαλλό) του μύκητα με μεγάλη διάρκεια ζωής, καλείται μυκήλιο, έχει τη μορφή ενός τριχόμορφου, αραχνοειδούς έως και βαμβακόμορφου ιστού και συναντάται συνήθως κάτω από το έδαφος και σε νεκρούς ή ζωντανούς κορμούς δέντρων. Σημειώνεται ότι, με τη στενή έννοια, ο όρος μανιτάρι αναφέρεται μόνο στο καρπόσωμα του μακρομύκητα.

Ως μακρομύκητες αναφέρονται, στην πλειονότητά τους, είδη Βασιδιομυκήτων αλλά και ένας μικρός αριθμός ειδών Ασκομυκήτων. Τα καρποσώματα των Βασιδιομυκήτων (βασιδιοκάρπια) εμφανίζουν ποικιλομορφία και έχουν διάφορα σχήματα (π.χ. ομπρέλας, ροπάλου, κοχυλιού κ.ά). Τα δύο βασικά τμήματα που διακρίνονται στο καρπόσωμα των περισσότερων Βασιδιομυκήτων είναι ο πύλος και ο στύπος. Ο πύλος στο κάτω μέρος του φέρει συνήθως ελάσματα ή σωλήνες, σπανιότερα οδόντες. Η επιφάνεια των ελασμάτων και των οδόντων, όπως και το εσωτερικό των σωλήνων, καλύπτονται-επιστρώνονται από το υμένιο που φέρει τα βασίδια και τα κυστίδια. Τα βασίδια είναι τα γόνιμα κύτταρα και παράγουν συνήθως τέσσερα ή σπανιότερα δύο ή ένα βασιδιοσπόρια, ενώ τα κυστίδια είναι άγονα διαφοροποιημένα κύτταρα. Από οικολογική άποψη, οι μακρομύκητες διακρίνονται σε σαπροτροφικούς, παρασιτικούς και σε συμβιωτικούς, στους οποίους περιλαμβάνονται και οι μυκορριζικοί. Οι περισσότεροι μακρομύκητες είναι σαπροτροφικοί και τρέφονται αποικοδομώντας οργανικές ενώσεις νεκρών κυττάρων. Πολλοί Βασιδιομύκητες είναι μάλιστα αποκλειστικοί αποικοδομητές της κυτταρίνης και της λιγνίνης. Σημαντικός είναι και ο ρόλος των μυκορριζικών μακρομυκήτων οι οποίοι αναπτύσσουν συμβιωτική σχέση με τις ρίζες των φυτών.

Κάποια από τα εδώδιμα είδη μανιταριών είναι μυκορριζικά, όπως η μαύρη τρούφα (*Tuber melanosporum*), γεγονός στο οποίο οφείλεται η δυσκολία καλλιέργειάς τους εμπορικά (Hall et al. 2003).

Ο αριθμός των διαφορετικών ειδών μανιταριών στη γη εκτιμάται να είναι 140.000, από τα οποία μόνο το 10% είναι σήμερα γνωστά (Wasser 2002). Ακόμα όμως και από τα γνωστά είδη, το ποσοστό των μακρομυκήτων που έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τις ποικίλες ιδιότητές τους είναι πολύ μικρό. Λαμβάνοντας συνεπώς υπόψη το γεγονός αυτό, καθώς και τη δυνατότητα που έχουν οι μύκητες για την παραγωγή βιολογικά δραστικών μεταβολιτών, όπως επιπλέον την εμπειρία και τις βελτιωμένες μεθόδους που υπάρχουν σήμερα για τη γενετική, χημική και φαρμακευτική ανάλυσή τους, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μακρομύκητες αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη ομάδα οργανισμών για έρευνα. Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερα είδη μακρομυκήτων χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη διατροφή ή αξιοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς (Fan et al. 2006).

1.3 Βιομηχανικές εφαρμογές των μακρομυκήτων

Η βιοτεχνολογική αξία των μυκήτων οφείλεται κυρίως σε προϊόντα που παράγονται από αυτούς. Ως επιστημονικός κλάδος, η βιοτεχνολογία των μυκήτων περικλείει τις αρχές και τις πρακτικές της τεχνολογίας των ζυμώσεων και των διαδικασιών περαιτέρω επεξεργασίας για την αξιοποίηση τους σε ποικίλες εφαρμογές για την υγεία, το περιβάλλον και τη γεωργία. Οι ελεγχόμενες τεχνικές της υγρής βυθισμένης καλλιέργειας δίνουν μια πρωτοποριακή ώθηση στην παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών από τους μύκητες, παρέχοντας ενδεχόμενα για την ανάπτυξη μιας οικονομικά βιώσιμης βιομηχανικής δραστηριότητας.

Ο τρόπος με τον οποίο οι μακρομύκητες προσλαμβάνουν τα θρεπτικά στοιχεία από τη φύση καθορίζει και τον ανάλογο χειρισμό τους για καλλιέργεια σε ζυμωτήρες. Για παράδειγμα, η πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων πραγματοποιείται με διαφορετικούς τρόπους από το μύκητα της λευκής ή της καστανής σήψης (Songulashvili et al. 2007). Οι μύκητες της λευκής σήψης είναι οι μοναδικοί οργανισμοί που αποδομούν όλα τα πολυμερή του ξύλου, και παράγουν κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και μοναδικά οξειδωτικά (λιγνινολυτικά) εξωκυτταρικά ένζυμα που αποδομούν την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη σε χαμηλού βάρους ενώσεις που μπορούν να αφομοιωθούν ως διατροφικά συστατικά. Αντιθέτως, ο μύκητας της καστανής σήψης αποδομεί μόνο τα κυτταρινούχα και ημικυτταρινούχα συστατικά του ξύλου.

Οι εδώδιμοι μακρομύκητες είναι γνωστοί για την υψηλή θρεπτική και γαστρονομική τους αξία, ως πολύτιμες πηγές ενέργειας και πρωτεΐνης, ενώ ταυτόχρονα καταναλώνονται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, το *Pleurotus ostreatus*, το *Lentinula edodes* και το *Flammulina velutipes* καταναλώνονται ευρέως σε όλο τον κόσμο, αφού συνιστούν μια υγιεινή τροφική επιλογή, χαμηλή σε λίπος και θερμιδικό περιεχόμενο, αλλά πλούσια σε πρωτεΐνες, ανόργανα μέταλλα και διαιτητικές ίνες (Manzi & Pizzoferrato 2000). Τα κυτταρικά τοιχώματα των εδώδιμων μανιταριών περιέχουν χιτίνη, ημικυτταρίνες, γλουκάνες, μαννάνες, και ειδικά διακλαδιζόμενες μη κυτταρινούχες β-γλουκάνες, οι οποίες είναι γνωστές για τις ωφέλιμες επιδράσεις που προσφέρουν στην ανθρώπινη υγεία (Chen & Seviour 2007).

Το φάσμα των βιομηχανικών εφαρμογών των μακρομυκήτων που έχουν ερευνηθεί μέσω κυρίως των τεχνικών της βυθισμένης υγρής καλλιέργειας αλλά και της παραδοσιακής καλλιέργειας τους, συνοψίζονται παρακάτω:

1. Παραγωγή του μυκηλίου των εδώδιμων μακρομυκήτων για ανθρώπινη και ζωϊκή κατανάλωση ως τροφή, καθώς και για ανάπτυξη φυσικών αρωματικών ενώσεων και αρωματικών παραγόντων (Lomascolo et al. 1999, Tsai et al. 2009).
2. Παραγωγή εκλεκτών χημικών ενώσεων όπως υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες, (Ooi & Liu 1999,) βιταμίνες, ένζυμα (Rogalski et al. 2006), οργανικά οξέα και νουκλεοτίδια (Eyal 1991, Rau et al. 1992, Wang & McNeil 1995).
3. Παραγωγή βιολογικά δραστικών ενώσεων με ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές, όπως αντιβιοτικά (Gehrig et al. 1998), αντικαρκινικά (Daba & Ezeronye 2003), αντιμικροβιακά (Liu & Wang 2007, Ngai & Ng 2003) και για τον έλεγχο των αφλατοξινών (Zjalic et al. 2006).
4. Εφαρμογές σε διεργασίες που στοχεύουν στην ανακύκλωση βιομηχανικών και αγροτικών απορριμμάτων (Adamovic et al. 1998, Ambrósio & Campos-Takaki 2004, Elissetche et al. 2006, Fu & Viraraghavan 2001, Lee et al. 2003, Revankar & Lele 2007, Shojaosadati et al. 1999, Villas-Bôas et al. 2002).

1.4 Οικονομικές και κοινωνικές επιδράσεις της βιομηχανίας μανιταριών

Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο εύρος των προαναφερόμενων εφαρμογών της βιομηχανίας των μανιταριών, αντιλαμβανόμαστε την θετική επίδρασή της στην επίλυση τριών σύγχρονων προβλημάτων: της έλλειψης τροφής, της υποβιβασμένης ανθρώπινης υγείας και της καταστροφής του περιβάλλοντος.

Από την στιγμή που η καλλιέργεια μανιταριών αποτελεί μια εντατική αγροβιομηχανική δραστηριότητα, είναι δυνατό να συνεισφέρει οικονομικά και κοινωνικά προσφέροντας εισόδημα και εργασία, ειδικά στις αγροτικές περιοχές των αναπτυσσόμενων χωρών.

Αξίζει να αναφερθεί, ότι η επιστήμη των μανιταριών είναι μια σχετικά νεοεφαρμοζόμενη επιστήμη. Η βιομηχανία των μανιταριών δεν έχει αναπτυχθεί τόσο όσο αυτή των καλλιεργούμενων φυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η επιστημονική έρευνα πάνω στα μανιτάρια να υστερεί γενικά, συγκριτικά με τις έρευνες στα φυτά και τα ζώα (Sonnenberg et al. 2005). Ωστόσο την τελευταία δεκαετία παρατηρείται μια αναπτυσσόμενη ερευνητική προσπάθεια στους τομείς της επιστήμης και της βιοτεχνολογίας των μανιταριών (Fan et al. 2006).

1.5 Εμπορική καλλιέργεια μανιταριών

Η καλλιέργεια των εδώδιμων μανιταριών αποτελεί μια τεχνητά ελεγχόμενη βιοτεχνολογική διαδικασία με υψηλό βαθμό εξειδίκευσης (σύγχρονος ηλεκτρονικός έλεγχος περιβαλλοντικών συνθηκών, υψηλή τεχνογνωσία παραγωγής, κ.τ.λ.), η οποία αποσκοπεί στην παραγωγή προϊόντος με άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (λευκότητα, υφή, γεύση, κτλ). Το αντικείμενο της καλλιέργειας μανιταριών μπορεί να θεωρηθεί μια σχετικά στοιχειώδη γεωργική δραστηριότητα αλλά και ταυτόχρονα μια υψηλού επίπεδου βιομηχανία τεχνολογίας. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως η υψηλή παραγωγή επιτυχημένης σοδειάς απαιτεί τόσο τεχνογνωσία, όσο και επιστημονική γνώση (Chang & Miles 1989).

Η δυναμική της ανάπτυξης των μανιταριών περιλαμβάνει συγκεκριμένους τεχνικούς χειρισμούς, αντίστοιχους με αυτούς που απαιτούνται και για την παραγωγή κοινών αγροτικών προϊόντων. Για παράδειγμα, κατά την ανάπτυξη των μανιταριών διακρίνεται η *βλαστική φάση* ανάπτυξης (vegetative growth phase), όπου το μυκήλιο αναπτύσσεται με πολύ γρήγορο ρυθμό, και η *αναπαραγωγική φάση* (fruiting growth phase) κατά την οποία αναπτύσσεται το καρπόσωμα. Η μετάβαση από τη βλαστική στην *αναπαραγωγική φάση* ανάπτυξης πραγματοποιείται με τον έλεγχο ορισμένων περιβαλλοντικών παραμέτρων οι οποίοι καλούνται *ενεργοποιητές* (triggers) ή «περιβαλλοντικά σοκ» (π.χ. ο φωτισμός, και οι χαμηλές θερμοκρασίες). Παρόλο που οι βασικές αρχές για την καλλιέργεια όλων των μανιταριών είναι παρόμοιες, οι πρακτικοί χειρισμοί μπορεί να διαφέρουν από είδος σε είδος. Οι τεχνικοί χειρισμοί πρέπει να τροποποιούνται και να ρυθμίζονται σύμφωνα με τις τοπικές κάθε φορά

κλιματικές συνθήκες, τα διαθέσιμα υλικά που χρησιμοποιούνται στα υποστρώματα και βέβαια τις ποικιλίες μανιταριών που καλλιεργούνται (Οει 2005).

Τα βασικά στάδια της τεχνολογίας καλλιέργειας των μανιταριών είναι: α) η επιλογή κατάλληλου είδους, β) η ανάπτυξη υγειούς μυκηλίου, γ) η προετοιμασία επιλεκτικού υποστρώματος/κομπόστας, δ) η παρακολούθηση ανάπτυξης του μυκηλίου, ε) η διαχείριση της ανάπτυξης των καρποφοριών και στ) η συγκομιδή (Chang & Chiu 1992, Chang 1998).

Πιο συγκεκριμένα η παραγωγή σύμφωνα με τους Chang & Miles (2004), ξεκινάει με την παρασκευή του υποστρώματος, την παστερίωση του και την σπορά του με το μυκήλιο του μανιταριού. Στη συνέχεια απαιτείται να γίνει η επώαση του μύκητα για να καταλήξει η όλη διαδικασία στην παραγωγή των καρποσωμάτων. Συνοπτικά, το μυκήλιο διασπείρεται στο αποστειρωμένο στερεό υπόστρωμα, που τις περισσότερες φορές είναι μείγμα από ρινίσματα ξύλου και πριονίδι, και επώαζεται μέχρι να σχηματιστούν οι αποικίες. Ακολουθεί η επαγωγή της αναπαραγωγικής φάσης για το σχηματισμό των καρποσωμάτων. Η καλλιέργεια από την ανάπτυξη του μυκηλίου μέχρι και τη συγκομιδή ολοκληρώνεται σε περίπου 90-120 ημέρες, αν και αυτό εξαρτάται από τη μέθοδο καλλιέργειας που εφαρμόζεται και το είδος μανιταριού που χρησιμοποιείται (Stamets 1993).

Πιο συγκεκριμένα, η προετοιμασία του υποστρώματος, διεργασία γνωστή ως κομποστοποίηση, οφείλει να στοχεύει στην παροχή άριστων συνθηκών για την ανάπτυξη των μανιταριών. Άριστες είναι οι συνθήκες όταν δεν δρουν ανταγωνιστικοί μύκητες στο υπόστρωμα, η τιμή του pH βρίσκεται μεταξύ 6.5 και 7.0, η υγρασία είναι 70-75% και η σχέση άνθρακα προς άζωτο είναι από 50:1 μέχρι 500:1. Τα υποστρώματα για την καλλιέργεια των εδώδιμων μανιταριών οφείλουν να είναι πλούσια σε απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, σε μορφές που να προσλαμβάνονται από το μανιτάρι και να είναι ακόμα απαλλαγμένα από τοξικές ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μυκηλίου. Η υγρασία, η τιμή του pH, και η σωστή ανταλλαγή αερίων μεταξύ του υποστρώματος και του γύρω περιβάλλοντος αποτελούν σημαντικούς παράγοντες επιτυχίας (Chang & Miles 2004). Το υπόστρωμα συνήθως αποτελείται από λιγνινοκυτταρινούχο υλικό (π.χ. λεπτοκομμένα τεμάχια άχυρου χειμερινών σιτηρών, καλαμποκιού, ψυχανθών, χόρτου λειμώνων, πριονίδια και άχυρα ρυζιού σε διάφορες αναλογίες).

Με την παστερίωση που ακολουθεί, επιδιώκεται ο θάνατος όλων των παθογόνων μικροοργανισμών, ακάρεων, νηματώδων και εντόμων. Η παστερίωση γίνεται στους 60-65°C για 1-3 μέρες. Μπορεί να γίνει όμως και αποστείρωση του υποστρώματος για 2 ώρες στους 130°C

ή για 10 ώρες στους 95°C (μερική αποστείρωση). Και οι δυο τεχνικές (παστερίωση και αποστείρωση) γίνονται με ατμό σε ειδικούς θαλάμους (Chang & Miles 2004).

Το επόμενο στάδιο όπως περιγράφεται από τους Chang & Miles (2004), είναι η σπορά δηλαδή η ανάμειξη του μυκηλίου του μανιταριού, που έχει αναπτυχθεί σε ασηπτικές συνθήκες με τα τεμαχίδια του υποστρώματος. Η ποσότητα του σπόρου έχει βρεθεί ότι πρέπει να είναι 2-3% του υποστρώματος. Στη συνέχεια το εμβολιασμένο υπόστρωμα τοποθετείται σε πλαστικούς σάκκους με διάμετρο 40-45cm και όχι μεγαλύτερους γιατί τότε δημιουργούνται υψηλές θερμοκρασίες από την ανάπτυξη του μυκηλίου, που είναι καταστρεπτικές ακόμα και για το ίδιο το μυκήλιο. Ακολουθεί η επώαση, της οποίας σκοπός είναι η διασπορά του μυκηλίου σε όλο το υπόστρωμα, το οποίο και θα το αποσυνθέσει για να προσλάβει τα θρεπτικά εκείνα συστατικά που θα του επιτρέψουν να έχει μια πολύ καλή καρποφορία. Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία του υποστρώματος πρέπει να διατηρείται στους 26-29°C, αφού θερμοκρασίες πάνω από 32°C είναι καταστρεπτικές για το μυκήλιο, άρα και για την παραγωγή. Έχει βρεθεί ότι πετυχαίνονται καλύτερα αποτελέσματα όταν η επώαση γίνεται στο σκοτάδι. Ο χρόνος επώασης μπορεί να κυμαίνεται από 20 μέχρι 35 ημέρες ανάλογα με το είδος του σπόρου και τις συνθήκες επώασης. Το μυκήλιο πρέπει να ωριμάσει καλά πριν ξεκινήσει η φάση της παραγωγής.

Μετά το τέλος της ανάπτυξης του μυκηλίου κατά τους Chang & Miles (2004), πραγματοποιείται η μετάβαση στο στάδιο της παραγωγής των καρποσωμάτων του μύκητα, που αποτελεί και το εδωδιμο τμήμα του. Ενώ στο στάδιο της επώασης απαιτούνταν σκοτάδι και θερμοκρασίες σχετικά υψηλές (26-29°C), στην αναπαραγωγική φάση το υπόστρωμα απαιτεί φως και θερμοκρασίες 12-25°C, ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος. Εκτός από τον έλεγχο της θερμοκρασίας στο χώρο της παραγωγής πρέπει να ελέγχεται επίσης και η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας. Στη βλαστική φάση ανάπτυξης η σχετική υγρασία διατηρείται στους 90-95%. Μετά το σχηματισμό όμως των καρποσωμάτων μειώνεται στο 80%. Για την καλύτερη ποιότητα των καρποφοριών πρέπει να ελέγχεται και η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε CO₂, αφού περιεκτικότητες πάνω από 0.1% ζημιώνουν τα καρποσώματα. Ο έλεγχος αυτός πετυχαίνεται με τον περιοδικό αερισμό του χώρου με ανεμιστήρες. Η παραγωγή εμφανίζεται σε κύματα κάθε 20 ημέρες περίπου, με το πρώτο κύμα να είναι και το μεγαλύτερο. Τα υπόλοιπα κύματα παραγωγής ακολουθούν με συνεχώς φθίνουσα παραγωγή.

Η συλλογή των μανιταριών γίνεται όταν τα χείλη του καρποσώματος είναι στραμμένα προς τα κάτω ή είναι σε επίπεδη θέση, γιατί έτσι διατηρούνται καλύτερα στην αγορά. Το πρώτο κύμα της παραγωγής μπορεί να ξεπερνάει το 10% του βάρους του υποστρώματος και

συνολικά όλα τα κύματα μαζί το 25-30% του βάρους του υποστρώματος. Στην πράξη όμως η παραγωγή κυμαίνεται γύρω στο 15% του υποστρώματος. Το μανιτάρι διατηρείται στο ψυγείο σε θερμοκρασίες 2-4°C για 10-15 ημέρες (Chang & Miles 2004).

1.6 Παγκόσμια και Ελληνική παραγωγή μανιταριών

Σήμερα, η καλλιέργεια των μανιταριών αποτελεί μια σύγχρονη, μεγάλης κλίμακας ελεγχόμενη εφαρμογή μικροβιακής τεχνολογίας για την επικερδή βιομετατροπή λιγνινοκυτταρινούχων αγρο-βιομηχανικών υπολειμμάτων σε αξιοποιήσιμα προϊόντα (τροφή ιδιαίτερης διαιτητικής ή φαρμακολογικής αξίας, λιπάσματα), προσφέροντας παράλληλα περιβαλλοντικά οφέλη. Η βιομετατροπή από τους μακρομύκητες έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως “μη πράσινη επανάσταση” (Chang 1999, 2005). Εκτιμάται ότι λόγω του ολοένα και αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την καλλιέργεια μανιταριών, παραπάνω από 10 εκατομμύρια τόνοι εδώδιμων και με φαρμακολογικό ενδιαφέρον μανιταριών έχουν παραχθεί σε διάφορες χώρες του κόσμου ετησίως (Roysse 2005). Ενδεικτικά, η παγκόσμια αγορά μανιταριών το 2001 ήταν αξίας πάνω από 40 δις δολάρια. Τα 30 δις δολάρια προέρχονταν από εδώδιμα είδη, τα 9-10 δις δολάρια από είδη μανιταριών με φαρμακευτικές ιδιότητες και περίπου 4-5 δις δολάρια από άγρια είδη (Chang & Miles 2004).

Τα παρακάτω στατιστικά στοιχεία (Πίν. 1.1) αποδεικνύουν την θεαματική αύξηση της παραγωγής καλλιεργούμενων μανιταριών για το χρονικό διάστημα 1978 μέχρι 2002 και την ιδιαίτερη συμβολή της Κίνας στη συνολική παγκόσμια παραγωγή (Delcaire 1978, Chang 1999, 2006b).

Πίνακας 1.1 Παγκόσμια παραγωγή καλλιεργούμενων μανιταριών και η συμβολή (%) της Κίνας στην παραγωγή από το 1978 μέχρι το 2002

Έτος	Συνολική παραγωγή (x 1,000 τον.)	Συμβολή της Κίνας (%)
1978	1,060.0	5.6
1983	1,453.0	12.0
1990	3,763.0	28.0
1994	4,909.3	53.8
1997	6,158.4	63.6
2002	12,250.0	70.6

Πηγή: Delcaire (1978) και Chang (1999, 2006b)

Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας εδώδιμων μανιταριών στη Μ. Βρετανία και στις άλλες Δυτικές χώρες είναι στραμμένο κυρίως σε ένα είδος μανιταριού, το *Agaricus bisporus*. Στις ΗΠΑ

το ποσοστό για αυτό το είδος είναι 98.6%, ενώ 0.9% της συνολικής βιομηχανίαςμανιταριών αποδίδεται στο είδος *Lentinula edodes* και 0.5% σε είδη του *Pleurotus*, σύμφωνα με την Εθνική Στατιστική Γεωργική Υπηρεσία των ΗΠΑ (NASS 2005).

Αντίθετα, στις Ασιατικές χώρες η εγχώρια παραγωγήμανιταριών δεν περιορίζεται αποκλειστικά στο *A. bisporus*, αφού το ποσοστό παραγωγής του για το 2003 στην Κίνα αντιστοιχούσε στο 12.8% της συνολικής παραγωγής, στο 11.6% στη Ν. Κορέα και στο 0% στην Ιαπωνία. Επιπλέον, ενώ η παραγωγή των πιο διαδεδομένωνμανιταριών *A. bisporus*, *L. edodes* και *Pleurotus* spp. προσέγγιζε σχεδόν το 100% της βιομηχανίαςμανιταριών στις ΗΠΑ και στις χώρες της Ευρώπης, το αντίστοιχο ποσοστό για την Ν. Κορέα ήταν 72.7%, για την Κίνα 58.2% και για την Ιαπωνία μόλις 12.3% (Chang 2006a, Cui 2004, Ho & Peng 2006).

Η παραγωγήμανιταριών στην Ελλάδα έχει ξεκινήσει ουσιαστικά από το 1966 όταν δημιουργήθηκαν δύο πρότυπες μονάδες παραγωγής (Εύβοια, Καρδίτσα) και εκσυγχρονίστηκαν άλλες δύο (Αλεξανδρούπολη, Κόρινθος), με αποτέλεσμα την ουσιαστική αναβάθμιση του κλάδου και τη δυναμική εισαγωγή του προϊόντος στην εγχώρια αγορά (Philippoussis & Zervakis 2000a). Σήμερα, η καλλιέργεια αυτή αποτελεί την πιο βιομηχανοποιημένη μορφή γεωργικής εκμετάλλευσης με ετήσια παραγωγή πάνω από 2.500 τόνους από τους οποίους το 90% αφορά το λευκόμανιτάρι *A. bisporus* και το 10% το οστρακόμορφαμανιτάρια του γένους *Pleurotus* (Philippoussis & Zervakis 2000a), που αδυναμεί όμως να καλύψει την ζήτηση, δημιουργώντας την ανάγκη νέων τεχνικών καλλιέργειας, προκειμένου το προϊόν να γίνει ανταγωνιστικό και να ανταποκρίνεται στα σύγχρονα πρότυπα ποιότητας.

Η παραγωγή των ελληνικών μονάδων δεν επαρκεί για να ικανοποιήσει την εγχώρια ζήτηση με αποτέλεσμα την εισαγωγή σημαντικών ποσοτήτωνμανιταριών που έφθασαν τους 7500 τόνους το 1999 (στοιχεία Ε.Σ.Υ.Ε). Το σημαντικότερο μερίδιο των εισαγωγών κατέχουν εδώδιμα είδημανιταριών που δεν καλλιεργούνται μέχρι σήμερα στη χώρα μας. Είδη όπως τα *Pleurotus eryngii*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Agrocybe aegerita*, *Stropharia rugoso-annulata* κ.ά. διαθέτουν πολύ καλές οργανοληπτικές ιδιότητες, προσφέρουν αξιόλογο εισόδημα και μπορούν να καλλιεργηθούν σε μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και κλιματικών συνθηκών στη χώρα μας (Φιλιππούσης & Ζερβάκης 1998).

1.7 Διατροφική αξία μακρομυκήτων

Οι σύγχρονες διαιτητικές τάσεις στα πλαίσια της παγκοσμιοποιημένης διατροφικής κουλτούρας οδηγούν στην κατανάλωση προϊόντων υψηλής θρεπτικής αλλά και γαστρονομικής

αξίας. Μεταξύ των τροφίμων αυτών συγκαταλέγονται και οι εδώδιμοι μακρομύκητες (άγρια ή καλλιεργούμενα μανιτάρια), των οποίων η διατροφική αποδοχή την τελευταία δεκαετία αυξάνεται ραγδαία, όχι μόνο για γαστρονομικούς αλλά και για θεραπευτικούς λόγους.

Τα καρποσώματα των μακρομυκήτων εκτιμώνται όχι μόνο για τις οργανοληπτικές τους ιδότητες, αλλά και για τα χημικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά τους (Manzi et al. 2001). Οι μακρομύκητες έχουν υψηλή θρεπτική αξία, αφού έχουν χαμηλό περιεχόμενο σε θερμίδες και λίπος, ενώ παράλληλα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, νάτριο, χιτίνη, διαιτητικές ίνες, και ιχνοστοιχεία (Mendil et al. 2004, Ouzouni & Riganakos 2007, Ouzouni et al. 2009). Γενικά, τα καρποσώματα περιέχουν κατά μέσο όρο (επί ξηρού) 56.8 % υδατάνθρακες, 25% πρωτεΐνες, 5.7 % λίπος και 12.5 % τέφρα (Demirbas 2002, Mendil et al. 2004).

Σύμφωνα με τους Manzi et al. (2001), οι φρέσκοι μακρομύκητες περιέχουν 82-95% νερό, ποσοστό που επηρεάζει άμεσα την συγκέντρωση των υπόλοιπων θρεπτικών συστατικών, άρα και τη διατροφική τους αξία. Οι διαφορές αυτές στο περιεχόμενο νερό οφείλονται πιθανότατα στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία) στις οποίες αναπτύσσονται, στο υπόστρωμα ανάπτυξης, στο είδος του μακρομύκητα, αλλά και στο στάδιο ωριμότητας του.

Η χημική σύσταση επί ξηρού για διάφορα είδη εδώδιμων μακρομυκήτων που έχει προσδιοριστεί από πρόσφατες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, δίνεται στον πίνακα 1.2.

Τα καρποσώματα των μακρομυκήτων θεωρούνται ικανοποιητική πηγή πρωτεϊνών, συγκριτικά με κοινά λαχανοκομικά είδη. Έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν ιδανική τροφή ως προς όλα σχεδόν τα περιεχόμενα βασικά αμινοξέα, ενώ περιέχουν ταυτόχρονα υψηλότερα ποσοστά θρεονίνης, τυροσίνης και αργινίνης σε σχέση με την πατάτα, το καρότο και το κουνουπίδι (Mattila et al. 2002). Η σύσταση των πρωτεϊνών των μακρομυκήτων φαίνεται να είναι υψηλότερης θρεπτικής αξίας σε σχέση με των φυτικών πρωτεϊνών (Belitz & Grosch 1999). Οι Barros et al. (2008a) μάλιστα αναφέρουν ότι οι άγριοι μακρομύκητες περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών από τους καλλιεργούμενους. Η κατανομή των πρωτεϊνών στο καρπόσωμα, και οι μεταβολές του πρωτεϊνικού περιεχομένου κατά την ανάπτυξη των μακρομυκήτων, παραμένουν ακόμα άγνωστες. Γενικότερα, η σύνθεση σε αμινοξέα εξαρτάται από το είδος του μακρομύκητα αλλά και από το θρεπτικό υλικό ανάπτυξής του. Οι ατμοσφαιρικές συνθήκες, η ηλικία αλλά και το δομικό τμήμα του καρποσώματος μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο (Dundar et al. 2008). Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ουσιαστικά δεν μεταβάλλεται κατά τη ξήρανση με θερμό αέρα στους 40°C, ή κατά την ψύξη στους -20 °C,

ενώ κατά το βράσιμο φρέσκων μακρομυκήτων μειώνεται σημαντικά (Barros 2007b). Το περιεχόμενο σε ελεύθερα αμινοξέα στα μανιτάρια είναι χαμηλό, περίπου 1% (επί ξηρού). Έτσι, η θρεπτική συνεισφορά αυτών είναι περιορισμένη, αν και συμμετέχουν σημαντικά στη γεύση των μακρομυκήτων.

Οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό των μακρομυκήτων, η περιεκτικότητα των οποίων, με την παρουσία κυρίως πολυσακχαριτών ή γλυκοπρωτεϊνών κυμαίνεται από 50 έως 90%. Η γλυκόζη, η μαννιτόλη και η α -τρεχαλόζη είναι οι κύριοι εκπρόσωποι των μονοσακχαριτών, των παραγώγων τους και των ολιγοσακχαριτών, αντίστοιχα. Το περιεχόμενο σε μαννιτόλη η οποία συμμετέχει στην ανάπτυξη σε όγκο και στην συμπάγεια των καρποσωμάτων, ποικίλει πολύ από είδος σε είδος (Barros et al. 2007a).

Ο κύριος αποθηκευτικός πολυσαχαρίτης στους μακρομύκητες είναι το γλυκογόνο, η περιεκτικότητά του οποίου υπολογίζεται στο 5-10% της ξηρής βιομάζας (Barros et al. 2007a). Η χιτίνη είναι ένας μη υδατοδιαλυτός δομικός πολυσακχαρίτης που μπορεί να φτάσει μέχρι το 80-90% επί ξηρού στα κυτταρικά τοιχώματα των μακρομυκήτων. Η χιτίνη είναι δύσπεπτη για τους ανθρώπους, ενώ η παρουσία της μειώνει τη διαθεσιμότητα των άλλων συστατικών των μακρομυκήτων (Kalač 2009). Δεδομένα σχετικά με το περιεχόμενό της στους άγριους μακρομύκητες είναι ελάχιστα. Γενικότερα, οι περισσότερο άφθονοι πολυσακχαρίτες στους μακρομύκητες είναι η χιτίνη, οι α - και β -γλουκάνες, και κάποιες άλλες ημικυτταρίνες (π.χ. μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες) (Wasser 2002). Οι μακρομύκητες αποτελούν πλούσια πηγή διαιτητικών ινών λόγω της παρουσίας σε αυτά μη-αμυλούχων πολυσακχαριτών. Οι ολικές διαιτητικές ίνες στους μακρομύκητες είναι το άθροισμα των φυσικών άπεπτων υδατανθράκων, και κυρίως της χιτίνης (Vetter 2007). Μάλιστα, οι γλουκάνες των μακρομυκήτων είναι συστατικά των διαλυτών και αδιάλυτων διαιτητικών ινών (Prosky et al. 1988).

Το περιεχόμενο λίπος των μακρομυκήτων περιλαμβάνει διάφορες ομάδες λιπαρών ενώσεων, όπως των ελεύθερων λιπαρών οξέων, των μόνο-, δι- και τριγλυκεριδίων, των στερολών, των εστέρων των στερολών και των φωσφολιπιδίων (Crisan & Sands 1978). Γενικότερα, στους μακρομύκητες παρατηρείται μειωμένο ποσοστό περιεχόμενου λίπους, κυρίως από 2 έως 6% επί ξηρού, γεγονός που καταδεικνύει ότι μπορούν να καταταχθούν στα τρόφιμα εκείνα που συμβάλλουν στη μείωση του σωματικού βάρους σε μια δίαιτα χαμηλών απαιτήσεων σε λιπαρά (Kalač 2009). Το προφίλ των λιπαρών οξέων στους μακρομύκητες περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών λιπαρών οξέων (Pednault et al. 2006). Έχει μάλιστα αναφερθεί η εξάρτηση της σύστασης των λιπαρών οξέων από την υφιστάμενη

θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη φάση της καρποφορίας των μακρομυκήτων. Θερμοκρασίες ανάπτυξης κάτω από τους 17°C οδήγησαν σε αύξηση της αναλογίας των ακόρεστων λιπαρών οξέων στα καρπόσωματα του *P. ostreatus* σε σχέση με εφαρμοζόμενες θερμοκρασίες άνω των 17°C (Pedneault et al. 2007).

Τη χημική σύσταση των μακρομυκήτων ολοκληρώνουν τα μεταλλικά στοιχεία. Γενικότερα, η περιεκτικότητα σε τέφρα στους μακρομύκητες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με των φυτών. Το περιεχόμενο των μεταλλικών στοιχείων στα διάφορα είδη μακρομυκήτων εξαρτάται από το γένος και το είδος του καρποσώματος, το στάδιο ανάπτυξης του μυκηλίου, την φυσιολογία του είδους, την περιοχή συλλογής και την απόσταση από πιθανές πηγές ρύπανσης (Turkecul et al. 2004). Σύμφωνα με τον Kalač (2009), τα επίπεδα συγκέντρωσης των ανόργανων στοιχείων κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορο, και θείο κυμαίνονται κατά μέσο όρο στα διάφορα είδη μακρομυκήτων (gr kg^{-1} ξηρής ουσίας), 20-40, 0.1-0.4, 0.1-0.5, 0.8-1.8, 5-10 και 1-3, αντίστοιχα. Το κάλιο δεν κατανέμεται ομοιόμορφα στο καρπόσωμα μακρομυκήτων, αφού η συγκέντρωσή του μειώνεται κατά σειρά: πύλος > στύπος > σπόρια.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι οι μακρομύκητες περιέχουν υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης φωσφόρου, καλίου και μαγνησίου. Επίσης, υψηλή συγκέντρωση σεληνίου στους μακρομύκητες του γένους *Boletus*, τα καθιστά υποσχόμενα ως πηγή για αυτό το ανεπαρκές διατροφικά στοιχείο (Kalač 2009). Τέλος, σε δείγματα άγριων εδώδιμων μακρομυκήτων που συλλέχθηκαν από την Δυτική Μακεδονία και Ήπειρο, οι συγκεντρώσεις των μεταλλικών στοιχείων κατά μέσο όρο είχαν την εξής αύξουσα σειρά: $\text{Mg} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Pb}$ (Ouzouni et al. 2009). Η διαθεσιμότητα βέβαια αυτών των στοιχείων παραμένει ακόμα άγνωστη. Σχετικά με τα βαρέα μέταλλα, οι μακρομύκητες σε σχέση με τα φυτά, είναι δυνατό να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις π.χ. μόλυβδου, υδράργυρου, και κάδμιου, και για αυτό το λόγο διεξάγονται μελέτες εκτίμησης των πιθανών κινδύνων στην ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση μακρομυκήτων (Soylak et al. 2005). Έχει μάλιστα αναφερθεί η παρουσία χρώμιου (Figueiredo et al. 2007), αρσενικού, καδμίου, μόλυβδου, υδράργυρου, κασσίτερου και αργύρου στους μακρομύκητες με διαφορές από είδος σε είδος (Wuilloud et al. 2004).

Πίνακας 1.2. Χημική σύσταση (% επί ξηρού) καρποσωμάτων διαφορετικών ειδών εδώδιμων μακρομυκήτων που έχουν πρόσφατα μελετηθεί

Είδος	Πρωτεΐνη	Υδατάνθρακες	Λίπος	Διαιτητικές Ύνες	Τέφρα	Αναφορά
<i>Agaricus arvensis</i>	56.3	37.5	2.7	- ^a	3.5	Barros et al. (2007a)
<i>Agrocybe aegerita</i>	34.1	36.3	3.1	-	14.8	Konuk et al. (2006)
<i>Amanita rubescens</i>	26.0	62.2	7.2	-	4.6	Ouzouni&Riganakos (2007)
<i>Armillariella mellea</i>	21.9	16.4	1.8	-	-	Florczak et al. (2004)
<i>Armillariella tabasceus</i>	22.9	66.9	2.5	-	7.6	Ouzouni et al. (2009)
<i>Boletus aureus</i>	27.2	62.1	4.5	-	6.3	Ouzouni et al. (2009)
<i>Boletus eduis</i>	26.5	65.4	2.8	-	5.3	Barros et al. (2008a)
<i>Calvatia gigantea</i>	27.3	-	1.0	22.0	6.3	Murugkar&Subbulakshmi (2005)
<i>Cantharellus cibarius</i>	53.7	31.9	2.9	-	11.5	Ouzouni&Riganakos (2007)
<i>Flammulina populicola</i>	26.6	53.0	3.06	25.8	-	Stamets (2005)
<i>Ganoderma lucidum</i>	15.1	71.0	3.5	66.8	-	Stamets (2005)
<i>Ganoderma oregonense</i>	13.3	72.8	2.5	72.0	-	Stamets (2005)
<i>Gomphus floccosus</i>	21.2	-	5.3	9.2	8.0	Murugkar&Subbulakshmi (2005)
<i>Grifola frondosa</i>	25.5	60.2	3.8	28.5	-	Stamets (2005)
<i>Hydnum repandum</i>	34.1	55.0	8.8	-	11.4	Colak et al. (2009)
<i>Hygrophorus russula</i>	32.5	53.3	6.0	-	8.2	Ouzouni et al. (2009)
<i>Lactarius deliciosus</i>	29.8	62.9	2.2	-	5.1	Barros et al. (2007a)
<i>Lactarius volemus</i>	25.2	64.4	4.0	-	2.9	Colak et al. (2009)
<i>Lentinus edodes</i>	32.9	47.6	3.7	28.9	-	Stamets (2005)
<i>Lepista nuda</i>	44.2	41.4	9.0	-	5.4	Colak et al. (2007)
<i>Lycoperdon perlatum</i>	17.2	50.4	0.4	-	32.0	Barros et al. (2008a)
<i>Macrolepiota procera</i>	23.9	68.4	2.3	-	5.4	Ouzouni&Riganakos (2007)
<i>Morchella vulgaris</i>	38.1	40.3	2.1	-	12.1	Konuk et al. (2006)
<i>Oudemansiella radicata</i>	20.2	34.4	1.7	18.0	14.6	Sabir et al. (2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	27.3	56.5	2.8	33.4	-	Stamets (2005)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	19.2	63.4	2.7	48.6	-	Stamets (2005)
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	15.0	66.7	0.3	65.5	-	Stamets (2005)
<i>Ramaria botrytis</i>	39.0	50.8	1.4	-	8.8	Barros et al. (2008a)
<i>Ramaria brevispora</i>	24.1	-	1.3	8.8	10.9	Murugkar&Subbulakshmi (2005)
<i>Ramaria flava</i>	35.5	65.0	5.2	-	3.1	Colak et al. (2009)
<i>Ramaria delica</i>	28.8	58.9	5.7	-	6.7	Ouzouni et al. (2009)
<i>Sarcodon imbricatus</i>	25.2	57.5	5.7	-	15.6	Konuk et al. (2006)
<i>Suillus granulatus</i>	16.5	74.3	4.0	-	5.2	Ouzouni&Riganakos (2007)
<i>Trametes versicolor</i>	11.0	78.0	1.5	71.3	-	Stamets (2005)
<i>Tricholoma portentosum</i>	19.6	34.6	5.8	30.1	9.9	Díez & Alvarez (2001)
<i>Volvariella bombycina</i>	30.6	24.8	1.1	10.2	13.1	Sabir et al. (2003)

^a Δεν αναλύθηκε

Τέλος, οι μακρομύκητες αποτελούν πολύ καλη πηγή βιταμινών, αφού είναι πλούσια σε βιταμίνες και ειδικά του συμπλέγματος Β, όπως θειαμίνη (B₁), ριβοβλαβίνη(B₂), νιασίνη (B₃), βιοτίνη(B₇), αλλά και βιταμίνη C (Matilla et al. 2001). Μάλιστα οι Furlani & Godoy (2007) ανέφεραν συγκεντρώσεις της B₁ από 0.004 μέχρι 0.08 mg/100 g και συγκεντρώσεις της B₂ από 0.04 μέχρι 0.3 mg/100 g για τα είδη *A. bisporus*, *L. edodes* και *Pleurotus* spp.

1.8 Λειτουργικά Διατροφικά Συστατικά των Μακρομυκήτων

Ως λειτουργικά διατροφικό συστατικό ή φαρμοκοδιατροφικό ή βιολειτουργικό (=nutraceutical) ορίζεται το τρόφιμο ή τμήμα του τροφίμου που παρέχει ιατρικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, πρόληψη και θεραπεία ασθενειών. Τα φαρμακοδιατροφικά μπορεί να είναι απλά συστατικά και συμπληρώματα διατροφής μέχρι γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, φυτικά σκευάσματα και μεταποιημένα προϊόντα, όπως δημητριακά και ροφήματα. Ορισμένα παραδείγματα φαρμακοδιατροφικών ή λειτουργικών διατροφικών συστατικών είναι οι διαιτητικές ίνες, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, τα αμινοξέα, τα κετονοξέα, οι βιταμίνες και άλλα αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη και το σελήνιο (Andlauer & Furst 2002, Kruger & Mann 2003). Διαφορετικά είδη μακρομυκήτων έχουν μελετηθεί από την επιστημονική κοινότητα με σκοπό την εύρεση νέων ιατροφαρμακευτικών εναλλακτικών, και τα αποτελέσματα αποδεικνύουν τις βιοδραστικές ιδιότητές τους (Lindequist et al. 2005). Τα μανιτάρια είναι πλούσιες πηγές φαρμακοδιατροφικών (Çağlarirmak 2007, Elmastas et al. 2007, Ribeiro et al. 2007) που ευθύνονται για τις αντιοξειδωτικές (Barros et al. 2007e), αντικαρκινικές (Wasser & Weis 1999) και αντιμικροβιακές ιδιότητές τους (Barros et al. 2007d, Turkoglu et al. 2007). Συγκεκριμένα, είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, διαιτητικές ίνες και κυρίως γλουκάνες, φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ και καροτενοειδή, τα οποία θα μπορούσαν να απομονωθούν με σκοπό να αξιοποιηθούν ως λειτουργικά διατροφικά συστατικά (Barros et al. 2008b).

Οι αρχές δημόσιας υγείας αξιολογούν τα φαρμακοδιατροφικά απαραίτητα εργαλεία για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας, τη μακροζωΐα, και την ποιότητα ζωής. Ακόμα, αντιπροσωπεύουν αναμφίβολα έναν αναπτυσσόμενο τομέα στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων. Εξάλλου, η απευθείας κατανάλωση των μανιταριών ως τρόφιμα, προάγει την ανθρώπινη υγεία, επωφελούμενοι των προσθετικών αλλά και συνεργιστικών δράσεων όλων των περιεχόμενων σε αυτά βιοενεργών ουσιών (Lindequist et al. 2005).

1.8.1 Ολικές Διαιτητικές Ίνες

Στις ολικές διαιτητικές ίνες (Total Dietary Fibers, TDF) περιλαμβάνονται όλοι οι μη-αμυλούχοι πολυσακχαρίτες. Συγκεκριμένα, οι διαιτητικές ίνες είναι ένα μείγμα πολυσακχαριτών, λιγνίνης και άλλων συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων που είναι ανθεκτικό στην υδρόλυση από τα ανθρώπινα ένζυμα, και παρουσιάζει ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Ha et al. 2000). Ουσιαστικά, οι διαιτητικές ίνες ασκούν ωφέλιμες δράσεις στην αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου, ενώ ταυτόχρονα μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και γλυκόζης στο αίμα, προστατεύοντας τελικά και από τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Southgate et al. 1990).

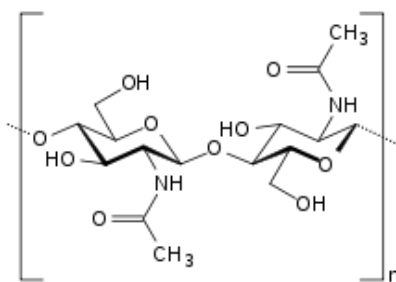
Οι διαιτητικές ίνες έχουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Η αυξημένη πληροφόρηση για τις δυνατές ωφέλιμες επιδράσεις των διαιτητικών ινών στην υγεία, αναμφίβολα ενθαρρύνει τις βιομηχανίες για τη μελέτη νέων εναλλακτικών πηγών διαιτητικών ινών και την ανάπτυξη τροφίμων εμπλουτισμένων σε διαιτητικές ίνες (Sloan 2001). Σήμερα, τα περισσότερα συμπληρώματα διαιτητικών ινών προέρχονται από παραπροϊόντα επεξεργασίας τροφίμων (π.χ. άλεσμα) δημητριακών και φρούτων (McKee & Latner 2000). Λόγω όμως της υψηλής ανταγωνιστικής αγοράς για ανάπτυξη τροφίμων και προϊόντων εμπλουτισμένα σε διαιτητικές ίνες, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για έρευνα νέων εναλλακτικών πηγών. Οι μακρομόκητες λοιπόν αποτελούν μια σημαντική πηγή διαιτητικών ινών λόγω της παρουσίας σε αυτά υψηλού περιεχομένου μη αμυλούχων πολυσακχαριτών, κυρίως χιτίνης και ομο- ή ετερο-γλουκανών με β-1,3, β-1,4 και β-1,6 γλυκοζιδικούς δεσμούς (Jun et al. 2006).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα είδη μακρομυκήτων, εδώδιμα ή/ και με φαρμακολογικό ενδιαφέρον, περιέχουν ένα σημαντικό ποσοστό διαιτητικών ινών στους διαφορετικούς σχηματισμούς τους, στους οποίους περιλαμβάνονται τα μυκήλια, τα καρποσώματα και τα σκληρώτια (Cheung 1997). Μάλιστα, μεταξύ αυτών, το ποσοστό διαιτητικών ινών στα σκληρώτια μπορεί να ξεπεράσει και το 70% του ξηρού βάρους (Cheung & Lee 2000). Βέβαια, για να μελετηθούν τα σκληρώτια προκειμένου να αναπτυχθούν ως νέα εναλλακτική πηγή διαιτητικών ινών, απαιτούνται περισσότερες γνώσεις πάνω στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Γενικά, σήμερα λίγες είναι οι διαθέσιμες διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με το περιεχόμενο διαιτητικών ινών στους εδώδιμους μακρομόκητες (Cheung 1996a, Cheung 1997, Jun et al. 2006, Synytsya et al. 2008a).

Ο βαθμός στον οποίο οι διαιτητικές ίνες εξασκούν τις επιδράσεις τους στην ανθρώπινη φυσιολογία εξαρτάται από το σύνολο των δομικών, χημικών και φυσικών ιδιοτήτων (Blackwood et al. 2000). Γενικά, οι διαιτητικές ίνες διαίρονται σε διαλυτά (Soluble Dietary Fibers, SDF) και αδιάλυτα (Insoluble Dietary Fibers, IDF) κλάσματα, ανάλογα με τη διαλυτότητά τους σε υδατικό μέσο. Το ιξώδες των διαλυτών διαιτητικών ινών ευθύνεται για τη βραδύτερη πέψη και απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών, η οποία συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και γλυκόζης στο αίμα. Εν αντιθέσει, οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες δρουν περισσότερο μηχανικά καθώς μπορούν και αυξάνουν την κοπρώδη μάζα και έτσι μειώνουν το χρόνο διέλευσης από το έντερο, αντιμετωπίζοντας τη δυσκοιλιότητα (Wong et al. 2003). Οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες συνιστούν συνήθως τα 2/3 των ολικών διαιτητικών ινών στα περισσότερα τρόφιμα, στις οποίες περιλαμβάνονται κυρίως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, το ανθεκτικό άμυλο, η χιτίνη και η λιγνίνη. Στις διαλυτές διαιτητικές ίνες περιλαμβάνονται κυρίως οι πεκτίνες, οι γλουκάνες και τα κόμμεα γαλακτομαννάνης. Στις διαιτητικές ίνες των μακρομυκήτων επικρατούν κυρίως η χιτίνη και οι γλουκάνες (Vetter 2007).

1.8.1.1 Χιτίνη

Η χιτίνη είναι ένα μακράς αλυσίδας βιοπολυμερές μονάδων *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης που συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς (Εικ. 1.1). Είναι άπεπτη από τον ανθρώπινο οργανισμό και αποικοδομείται μόνο από μερικά βακτήρια και ακτινομύκητες. Η χιτίνη αποτελεί το βασικό πολυσακχαρίτη σκελετού για τους μύκητες, που προσδίδει ανθεκτικότητα στο κυτταρικό τοίχωμα. Η χιτίνη είναι ένα χαρακτηριστικό συστατικό για όλες τις ταξινομικές ομάδες των μυκήτων, δηλαδή για τους Ζυγομύκητες, Ασκομύκητες, Βασιδιομύκητες και Δευτερομύκητες, εκτός από τους Ωομύκητες (Vetter 2007).



Εικ.1.1 Μοριακή δομή χιτίνης

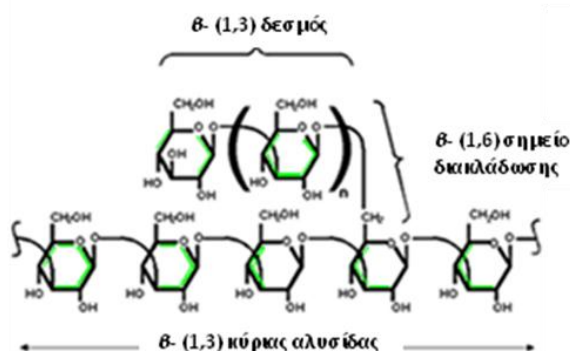
Τα μόρια της χιτίνης μειώνουν την ευπεπτότητα των μακρομυκήτων αλλά προβάλλουν σημαντικό βιολογικό ρόλο ως συστατικό των διαιτητικών ινών (Bauer-Petrovska et al. 2001, Cheung 1996a). Ο Vetter (2007) που προσδιόρισε το περιεχόμενο χιτίνης σε ποικιλίες τριών διαφορετικών ειδών καλλιεργούμενων μακρομυκήτων (*Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* και *Lentinus edodes*), αναφέρει ότι η περιεκτικότητα χιτίνης στους καλλιεργούμενους μακρομύκητες αποτελεί χαρακτηριστικό του είδους και φαίνεται να μην επηρεάζεται από τις ποικιλίες. Ακόμα, συμπέρανε ότι το ποσοστό χιτίνης είναι μεγαλύτερο στον πύλο των καρποσωμάτων σε σχέση με το στύπο. Τέλος, αναφέρει ότι το επίπεδο χιτίνης στους μακρομύκητες ρυθμίζεται και από τις διατροφικές συνθήκές τους, με τα σαπροτροφικά είδη να περιέχουν υψηλότερη περιεκτικότητα χιτίνης στο καρπόσωμά τους.

1.8.1.2. Γλουκάνες

Οι μακρομύκητες αποτελούν μια σημαντική πηγή πολυσακχαριτών με αντικαρκινικές και ανοσοποιητικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες στους μακρομύκητες είναι συνήθως παρόντες ως γλουκάνες ευθείας και διακλαδισμένης αλυσίδας με διαφορετικούς τύπους γλυκοζιδικών δεσμών, όπως είναι οι β-(1,3), (1,6) γλουκάνες (Εικ. 1.2) και οι α-(1,3) γλουκάνες (Wasser 2002). Το μέσο μοριακό βάρος τους ποικίλει ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους και κυμαίνεται από 5 μέχρι 2000 kDa (Bohn & BeMiller 1995). Οι διακλαδισμένες β-γλουκάνες είναι βιολογικά δραστικές και έχουν εφαρμογές στην ιατρική και βιοτεχνολογία καθώς και ως πρόσθετα στα τρόφιμα και καλλυντικά (Manzoni & Rollini 2001).

Οι γλουκάνες των μακρομυκήτων είναι συστατικά των διαλυτών ή των αδιάλυτων διαιτητικών ινών (Prosky et al. 1988). Η διαλυτότητα τους στο νερό εξαρτάται από τη μοριακή δομή και τη διαμόρφωση. Οι γλουκάνες που συνδέονται με πρωτεΐνες ή με τη χιτίνη είναι συνήθως αδιάλυτες στο νερό. Οι β-γλουκάνες είναι τα πλέον ενδιαφέροντα λειτουργικά συστατικά αφού έχουν πολλές βιολογικές δράσεις, όπως ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, μείωση των επιπέδων γλυκόζης και χοληστερόλης στο αίμα, καθώς και πολλές αντικαρκινικές ιδιότητες (Reshetnikov et al. 2001). Εκτός από τις γνωστές με αντικαρκινικές ιδιότητες β-(1,3),(1,6) γλουκάνες, έχουν περιγραφεί ένας μεγάλος αριθμός βιολογικά ενεργών γλουκανών με άλλες δομές. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες περιέχουν μονάδες α- ή β-γλυκόζης σε ευθεία ή διακλαδισμένη αλυσίδα ως βασική δομή και ακόμα πλευρικές αλυσίδες που συνδέονται με διαφορετικούς τρόπους. Οι πλευρικές αλυσίδες των ετερογλουκανών περιέχουν

γλουκουρονικό οξύ, ξυλόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη ή ριβόζη ως κύριο συστατικό ή σε διάφορους συνδυασμούς (Wasser 2002). Ακόμα, τα μόρια των β-γλουκανών είναι δυνατό να είναι προσδεμένα με πρωτεϊνικά μόρια. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο πολυσακχαρίτης-Κ (PSK), ή αλλιώς κρεστίνη, που έχει απομονωθεί από το μακρομύκητα *Trametes versicolor* (Kobayashi et al. 1995).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των β-(1,3), (1,6) γλουκανών

Γενικότερα, οι πολυσακχαρίτες με αντικαρκινική δράση διαφέρουν σημαντικά στη χημική σύνθεσή τους, στη μοριακή διαμόρφωσή τους, όπως και στις φυσικές ιδιότητές τους. Η αντικαρκινική δραστηριότητα μπορεί να εμφανίζεται τόσο σε ομοπολυμερή όσο και σε μεγάλης πολυπλοκότητας ετεροπολυμερή. Οι διαφορές στην δραστηριότητα συνδέονται με τη διαλυτότητα στο νερό, το μέγεθος των μορίων, το βαθμό και τρόπο διακλάδωσης (Novak & Vetrnicka 2008). Είναι φανερό ότι τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως οι β-(1,3) δεσμοί στην κύρια αλυσίδα των γλουκανών και ακόμα οι β-(1,6) στα σημεία διακλάδωσης καθίστανται απαραίτητα για να επιδείξουν οι πολυσακχαρίτες αντικαρκινική δράση. Ακόμα, μεγάλου μοριακού βάρους γλουκάνες φαίνεται να είναι περισσότερο δραστικές σε σχέση με μικρομοριακές (Mizuno 1999).

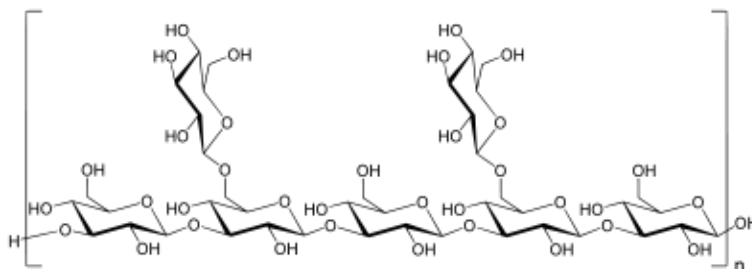
Έχει ευρέως αναφερθεί ότι η αντικαρκινική δράση των πολυσακχαριτών προκύπτει μέσω της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή διεγείροντάς τον να παράγει αντικαρκινικούς παράγοντες, παρά από κυτταροτοξικές δράσεις (Gao et al. 2000). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αντικαρκινική δράση παραμένουν ακόμα ασαφείς και μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει αναφορές στις οποίες μελετάται ο τρόπος δράσης τους (Cao & Lin 2003, Gao et al. 2002, Zhang & Lin 2004). Συγκεκριμένα, οι κυριότερες αντικαρκινικές και ανοσοποιητικές δράσεις των πολυσακχαριτών που προέρχονται από τους

ανώτερους Βασιδιομύκητες είναι η πρόληψη της ογκογένεσης με τη δια καταπόσεως κατανάλωση μανιταριών ή των σκευασμάτων τους, η απευθείας αντικαρκινική δράση ενάντια σε διάφορους αλλογενικούς και συγγενικούς όγκους, η ανοσο-ενδυναμωτική δράση ενάντια σε όγκους σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, και η πρόληψη στη μετάσταση όγκων (Ikekawa 2001). Αυτός είναι και ο λόγος που οι πολυσακχαρίτες εντάσσονται στους παράγοντες ανοσοθεραπείας (τροποποιητές της βιολογικής απόκρισης) γνωστοί και ως BRMs (Biological Response Modifiers) (Rout et al. 2005).

Στη βιομηχανία τροφίμων, οι β-γλουκάνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά υδροκολλοειδή, λόγω της ικανότητάς τους να αυξάνουν το ιξώδες υδατικών διαλυμάτων και της δυνατότητάς τους να σχηματίζουν σταθερές υδροπηκτές κάτω από ορισμένες συνθήκες (Lazaridou et al. 2007). Έτσι μπορούν αρκετά αποτελεσματικά να τροποποιήσουν την υφή και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σύνθετων προϊόντων και γενικότερα πάσης φύσεως εδώδιμων γαλακτωμάτων ή ακόμα να χρησιμοποιηθούν ως υποκάστατα λίπους για την ανάπτυξη τροφίμων χαμηλής θερμικής αξίας.

Οι βιοενεργές γλουκάνες εντοπίζονται σε όλα τα μέρη του μακρομύκητα, περιλαμβανομένου του μυκηλίου, ή μπορεί να εκκριθούν στο μέσο ανάπτυξης και να γίνουν εξωκυτταρικές (Roberts 2004). Οι βιοενεργοί πολυσακχαρίτες υφίστανται αλλαγές στη δομή τους κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του μανιταριού (Chen & Miles 1996). Είναι επίσης γνωστό ότι διαφορετικοί πολυσακχαρίτες μπορούν να εκκριθούν από τα καρποσώματα και τα μυκήλια (Mizuno 1991).

Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες με βιολογική δράση που προέρχονται από τα μυκήλια των μακρομυκήτων είναι εσωπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS) (Song et al. 1998, Kim et al. 2005) ή εξωπολυσακχαρίτες (Exopolysaccharides, EPS) (Cheung 1996b). Καθώς η παραγωγή πολυσακχαριτών από το μυκήλιο καθίσταται πιο αποδοτική από ότι από τα καρποσώματα, η μελέτη της επίδρασης των συνθηκών καλλιέργειας κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων κρίνεται αναγκαία (Lee et al. 1999, Wu et al. 2004). Πρόσφατα κάποιες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η σύσταση του μέσου ανάπτυξης που χρησιμοποιείται είναι δυνατό να επηρεάσει τον ειδικό ρυθμό σύνθεσης των εξωπολυσακχαριτών (Hwang et al. 2003, Lee W.Y. et al. 2007, Zhou et al. 2009). Έχει ακόμα αναφερθεί ότι το μοριακό μέγεθος, ο βαθμός διακλάδωσης καθώς και η σύσταση σακχάρων των εξωπολυσακχαριτών επηρεάζονται από το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται (Rouhier et al. 1995, Wu et al. 2008).



Εικόνα 1.3. Μοριακή δομή της λεντινάνης (β -(1,3),(1,6) γλουκάνης)

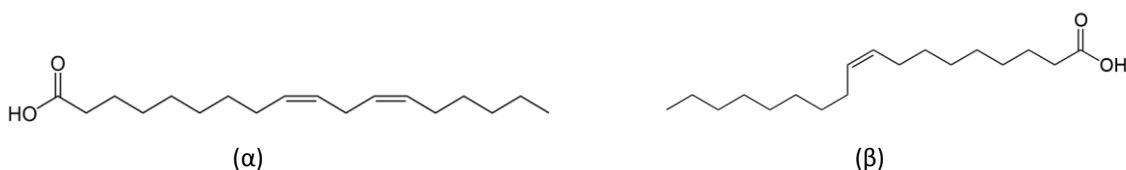
Οι πιο διαδεδομένες β -D-γλουκάνες που προέρχονται από μύκητες είναι η σκληρογλουκάνη από το *Sclerotium rolfii* (Survase et al. 2007), η σχιζοφυλλάνη από το *Schizophyllum commune* (Rau 1999) και η λεντινάνη (Εικ. 1.3) από το *Lentinus edodes* (Du et al. 2004, Chen & Seviour 2007). Ορισμένοι πολυσακχαρίτες που έχουν απομονωθεί από τα καρποσώματα ή από τα διηθήματα καλλιέργειας των μακρομυκήτων, όπως του *Ganoderma applanatum* (Usui et al. 1981), *Cordyceps* sp. (Kiho et al. 1996, Yang B.K. et al. 2000), *Lentinus edodes* (Chihara et al. 1970) και *Grifola frondosa* (Adachi et al. 1990) έχουν αναφερθεί με εφαρμογές φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Μάλιστα ορισμένοι πολυσακχαρίτες όπως η λεντινάνη, η κρεστίνη και η σχιζοφυλλάνη διατίθενται εμπορικά (Kidd 2000).

1.8.2 Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα

Οι μακρομύκητες φαίνεται να έχουν ευεργετική επίδραση ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Στο συγκεκριμένο τομέα, η ιδιότητά τους αυτή αποδίδεται κυρίως στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Poly-Unsaturated Fatty Acids, PFA) που περιέχουν, αν και το περιεχόμενό τους διαφέρει πολύ από είδος σε είδος.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (Unsaturated Fatty Acids, UFA) επικρατούν των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Saturated Fatty Acids, SFA) σε πολλά είδη ανώτερων Βασιδιομυκήτων που ανήκουν ταξινομικά στις οικογένειες Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, Ganodermataceae και Tricholomataceae (Barros et al. 2007b, Díez & Alvarez 2001, Kavishree et al. 2008, Pedneault et al. 2007, Ribeiro et al. 2009). Έτσι, η κατανάλωσή των εδώδιμων μακρομυκήτων συνεισφέρει στην αύξηση της HDL και μείωση της LDL και των τριγλυκεριδίων (Kanu et al. 2007). Όπως έχει αναφερθεί τα UFA συνεισφέρουν στην προσαρμογή των Βασιδιομυκήτων στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης (Dart & Stretton 1976). Ακόμα, αυτά τα λιπαρά οξέα προβάλλουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της λιγνίνης (Gutiérrez et al. 2002).

Το λινελαϊκό (18:2 ω -6) (Εικ. 1.4α), το ελαϊκό (18:1 ω -9) (Εικ. 1.4β), το παλμιτικό (16:0) και το στεαρικό οξύ (14:0) είναι γενικότερα τα κύρια λιπαρά οξέα που συναντώνται στους Βασιδιομύκητες (Pednault et al. 2006, Ribeiro et al. 2009). Σύμφωνα με έρευνα, τα άγρια είδη μακρομυκήτων περιέχουν περισσότερα PUFA και λιγότερα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Μονο-Unsaturated Fatty Acids, MUFA) από τα καλλιεργούμενα (Barros et al. 2008b).



Εικόνα 1.4. Δομή (α) λινελαϊκού οξέος (18:2 ω -6) και (β) ελαϊκού οξέος (18:1 ω -9), των επικρατέστερων λιπαρών οξέων που συναντώνται στους μακρομύκητες

Το λινελαϊκό οξύ μάλιστα είναι πρόδρομη ουσία της 1-οκτεν-3-όλης, που αποτελεί την αλκόολη των μυκήτων και το κύριο αρωματικό συστατικό που συνεισφέρει στο ιδιαίτερο άρωμα των μανιταριών (Maga 1981). Σε κάποια είδη εδώδιμων μανιταριών έχουν ανιχνευτεί ακόμα από την ομάδα των ω -3 λιπαρών οξέων το εικοσα-πεντα-ενοϊκό οξύ (20:5 ω -3, EPA) καθώς και το εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ (22:6 ω -3, DHA) (Barros 2008a, Ribeiro 2009). Το EPA θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, ενώ το DHA είναι το απαραίτητο συστατικό για την κατάλληλη ανάπτυξη του εγκεφάλου και των νεύρων.

Από διατροφική άποψη, τα μακράς αλυσίδας PUFA και κυρίως τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στις ομάδες των ω -3 και ω -6 λιπαρών οξέων, προβάλλουν προστατευτική δράση ενάντια των καρδιαγγειακών και φλεγμονοδών νοσημάτων, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και γενικότερα είναι βιοδραστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Gibney et al. 2002, Parikh et al. 2005). Τα PUFA αποτελούν βιοσυνθετικούς πρόδρομους των εικοσανοειδών (π.χ. προσταγλανδίνες), τα οποία παίζουν πολύπλοκο ρυθμιστικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, επηρεάζοντας τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και την αρτηριακή πίεση (Voet & Voet 2004). Το λινελαϊκό και το α -λινολενικό (18:3 ω -3, ALA) οξύ αποτελούν δύο μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα, απαραίτητα στην ανθρώπινη διατροφή (Essential Fatty Acids, EFA).

Επειδή λοιπόν οι μακρομύκητες είναι πλούσιοι σε PUFA, και ειδικά στο απαραίτητο λινελαϊκό οξύ, όπως και στο μονοακόρεστο διατροφικά ωφέλιμο ελαϊκό οξύ (Εικ. 4β),

προτείνεται η ενσωμάτωσή τους στην ανθρώπινη διατροφή και ιδιαίτερα όταν υπάρχουν προβλήματα υγείας λόγω υψηλού επιπέδου χοληστερόλης (Ribeiro et al. 2009).

1.8.3 Αντιοξειδωτικά

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί με την παθογένεση πολλών σοβαρών ασθενειών, στις οποίες περιλαμβάνονται καρδιακά και εγκεφαλικά ισχαιμικά επεισόδια, αρτηριοσκλήρυνση, διαβήτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονές, καρκίνοι, αλλά και γήρανση των κυττάρων (Margaill et al. 2005). Τα αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν την εξέλιξη των παραπάνω νοσηρών καταστάσεων καθώς καταστέλλουν τη δράση των ελεύθερων ριζών (Diolock et al. 1998). Παρόλο που κάποια συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως για παράδειγμα το βουτυλ-υδροξυτολουόλιο (BHT) και η βουτυλο-υδροξυανισόλη (BHA) επάγουν αντιοξειδωτική δράση, έχει αποδειχτεί ότι ταυτόχρονα παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις σε σχέση με τα φυσικά αντιοξειδωτικά (Stefanidou et al. 2003). Αυτός είναι και ο λόγος που οι ερευνητικές ομάδες στρέφονται στην ανάπτυξη εναλλακτικών και ασφαλών για την υγεία αντιοξειδωτικών φυσικής προέλευσης.

Οι μακρομύκητες είναι γνωστό ότι περιέχουν αντιοξειδωτικές ενώσεις και συγκεκριμένα ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες, φαινολικά συστατικά (φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή) και καροτενοειδή (Ferreira et al. 2009). Παραδείγματα ειδών μακρομυκητων με αντιοξειδωτική δράση είναι το *Grifola frondosa* (Zhang Y. et al. 2002), το *Agrocybe aegerita* (Kim et al. 1997), το *Ganoderma lucidum* (Kim et al. 2008, Wu & Wang 2009), το *Agaricus blazei* (Ker et al. 2005), το *P. ostreatus* (Bobek & Galbavy 2001), το *Agaricus bisporus* (Shi et al. 2002) και το *Inonotus obliquus* (Lee I.K. et al. 2007). Επιπλέον το σελήνιο που αποτελεί ένα ιχνοστοιχείο με αντιοξειδωτική δράση έχει ανιχνευτεί σε σημαντικά επίπεδα σε μακρομύκητες του γένους *Boletus* (Kalač 2009). Χημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η εργοθειονίνη (θειουρία, παράγωγο της ιστιδίνης), έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και έχει ανιχνευτεί στα είδη *Flammulina velutipes* (Bao et al. 2008) και *Agaricus bisporus* (Ey et al. 2007).

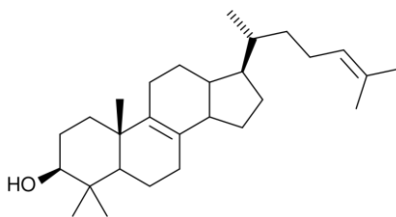
Οι Barros et al. (2008b) που μελέτησαν τα φαρμακοδιατροφικά συστατικά σε εμπορικά καλλιεργούμενα και σε άγρια είδη μακρομυκητων ανίχνευσαν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και συγκεκριμένα φαινόλες, φλαβονοειδή, ασκορβικό οξύ και καροτένιο. Ανέφεραν ότι γενικότερα οι φαινόλες και τα φλαβονοειδή επικρατούν έναντι των άλλων αντιοξειδωτικών. Μάλιστα, το καροτένιο και το λυκοπένιο περιέχονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα αντιοξειδωτικά. Η α -τοκοφερόλη βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στα άγρια

είδη, ενώ η γ -τοκοφερόλη δεν ανιχνεύτηκε σε αυτά. Η β -τοκοφερόλη ανιχνεύτηκε και στα άγρια και στα καλλιεργούμενα σε σχεδόν παραπλήσιες συγκεντρώσεις. Τα άγρια είδη μακρομυκήτων περιέχουν μεγαλύτερα επίπεδα φαινολικών, αλλά χαμηλότερα ασκορβικού οξέος σε σχέση με τα καλλιεργούμενα. Παρόλα αυτά, διαφορές στην αντιμικροβιακή δράση των άγριων και καλλιεργούμενων μακρομυκήτων δεν έχουν σημειωθεί. Τέλος, εδώδιμα είδη μακρομυκήτων που μελετήθηκαν από τους Heleno et al. (2010), βρέθηκε να περιέχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά, όπως φαινόλες (0.51-7.90 $\mu\text{g/g}$) και τοκοφερόλες (0.02-8.04 $\mu\text{g/g}$). Η β -τοκοφερόλη ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα σε υψηλά επίπεδα, ενώ δ -τοκοφερόλη δεν βρέθηκε. Συμπερασματικά, τα εδώδιμα μανιτάρια αποτελούν μία εύκολα διαθέσιμη πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών που μπορούν ακόμα να αξιοποιηθούν και ως φυσικά συμπληρώματα διατροφής (Ferreira et al. 2009).

1.8.4 Τερπενοειδή

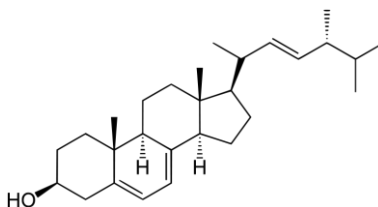
Τα τερπένια αποτελούν ομάδα υδρογονανθράκων που απαντούν στη φύση, με εξαιρετική ποικιλότητα μορφής που προέρχονται από τη συνένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο, C5). Τα περισσότερα τερπένια έχουν πολυκυκλικές δομές και αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομάδες φυσικών προϊόντων. Τα τερπενοειδή μπορούν να θεωρηθούν τροποποιημένα τερπένια, στα οποία μεθυλομάδες έχουν μετακινηθεί ή έχουν προστεθεί άτομα οξυγόνου. Τα στεροειδή και οι στερόλες βιολογικά παράγονται από πρόδρομα μόρια τερπενοειδών. Τα τερπενοειδή περιλαμβάνουν τέσσερις ομάδες: (α) τα πτητικά μονο-και σεσκιτερπένια (αιθέρια έλαια) (C10 και C15), (β) τα λιγότερο πτητικά διτερπένια (C20), (γ) τα μη πτητικά τριτερπενοειδή και τις στερόλες (C30) και (δ) τα καρτενοειδή (C40) (Harbourne 1973). Οι περισσότερες αναφορές σχετικά με τερπενοειδείς ενώσεις που έχουν απομονωθεί από Βασιδιομύκητες σχετίζονται με ενώσεις στερολικού τύπου και πτητικά μονο-και σεσκιτερπένια (Rösecke et al. 2000, Rasser et al. 2002, Zhang A.L. et al. 2009). Τα τριτερπενοειδή και τα γανοδερικά οξέα είναι τα πιο κοινά τερπένια που συναντώνται στις τάξεις *Agaricales* (π.χ. *Pleurotus* sp.) και *Aphyllophorales* (π.χ. *Ganoderma* sp.) με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες (Novaes et al. 2007). Μάλιστα, μέσα στο βασίλειο των μυκήτων, τα περισσότερα τριτερπενοειδή και στεροειδή που έχουν απομονωθεί είναι από το *G. lucidum* με εξαιρετικές βιολογικές δράσεις (Boh et al. 2007). Όλα τα τριτερπενοειδή έχουν κοινή βιοσυνθετική προέλευση. Το πρόδρομο μόριο από το οποίο προέρχονται είναι το μεβαλονικό οξύ (περιέχει τρία μόρια οξικού οξέος). Η χημική δομή των τριτερπενοειδών βασίζεται στη

θεμελιώδη δομή της λανοστερόλης (Εικ. 1.5) που αποτελεί ένα βασικό ενδιάμεσο μόριο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των στεροειδών και των τριτερπενίων στους μικροοργανισμούς και στους ζωικούς οργανισμούς (Chang & Bushwell 1999). Τα τριτερπένια μπορούν να θεωρηθούν αποτελεσματικά αντικαρκινικά μέσα, εξαιτίας της δραστικότητάς τους σε αναπτυσσόμενους όγκους, και μάλιστα σε αντίθεση με τους πολυσακχαρίτες, η δράση τους είναι αποτέλεσμα κυτοτοξικότητας έναντι των κυτταρικών κυττάρων, παρά ενίσχυσης του ανοσοποιητικού (Gonzalez et al. 2002).



Εικόνα 1.5 Μοριακή δομή της λανοστερόλης

Η εργοστερόλη (εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη) είναι μια στερόλη (Εικ. 1.6), βιολογικός πρόδρομος (προβιταμίνη) της βιταμίνης D₂ (εργοκαλσιφερόλη) και στους μύκητες αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των υφών (Harvey et al. 2006). Μέσω της UV ακτινοβολίας η εργοστερόλη μετατρέπεται στην βιταμίνη D₂, που μαζί με τη βιταμίνη D₃ ανήκουν στο σύμπλεγμα της βιταμίνης D που είναι γνωστό για την παρεμποδιστική δράση τους στην ανάπτυξη ραχίτιδας και της οστεοπόρωσης (Rajakumar et al. 2007). Ακόμα, πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η εργοστερόλη και τα υπεροξειδιά της προβάλλουν πολλές φαρμακευτικές δράσεις, όπως ότι μειώνουν τον πόνο σε φλεγμονές, μειώνουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων (Zaidman et al. 2005), είτε αναστέλλοντας άμεσα την αγγειογένεση, είτε δρώντας ως αντιοξειδωτικά ή ως αντιφλεγμονώδη (Zhang Y. et al. 2002).



Εικόνα 1.6 Μοριακή δομή της εργοστερόλης

Ελάχιστα τρόφιμα περιέχουν σημαντικά επίπεδα βιταμίνης D. Τα μανιτάρια είναι τα μοναδικά μη ζωϊκής προέλευσης προϊόντα που περιέχουν σε υψηλή συγκέντρωση την

αντιραχιτική βιταμίνη και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διατροφικά συμπληρώματα της βιταμίνης D. Η βιταμίνη D σε λειοφιλώμενα μανιτάρια έχει αποδειχτεί αφομοιώσιμη από τον άνθρωπο, γεγονός που ενισχύει τη σημασία τους ως φυσική πηγή της βιταμίνης D (Outila et al. 1999). Τα επίπεδα της βιταμίνης D₂ είναι σημαντικά σε διάφορα άγρια είδη μακρομυκήτων. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Matilla et al. (1995) το *Chantarellus tubaeformis* περιέχει 29.8 mg/ 100 g (νωπού βάρους) βιταμίνης D₂. Αν λάβουμε υπόψη τη συνιστώμενη ημερήσια δόση (5mg/ημέρα) (National Research Council 1989) καταναλώνοντας 100g από αυτό το είδος, καλύπτονται οι ανάγκες σε βιταμίνη D μιας εβδομάδας. Ακόμα, υψηλά επίπεδα βιταμίνης D₂ περιέχει το *Lentinus edodes* (22-110 mg/100g ξηρού βάρους) (Takamura et al. 1991). Οι Jasinghe & Perera (2005) έχουν αναφέρει επί ξηρού για το *P. ostreatus*, το *L. edodes*, το *Agaricus bisporus* και το *Flammulina velutipes* 4.40, 6.05, 7.90 και 0.68 mg/g εργοστερόλη, αντίστοιχα.

Οι μακρομύκητες που καλλιεργούνται σε εσωτερικούς χώρους περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα της βιταμίνης D₂ σε σχέση με τα άγρια είδη ή αυτά που καλλιεργούνται στο περιβάλλον, αφού το μεταβολικό μονοπάτι μετατροπής της εργοστερόλης σε εργοκαλσιφερόλη απαιτεί ηλιακή ακτινοβολία ή τεχνητή πηγή ακτινοβολίας UV. Οι Matilla et al. (2002) δεν ανίχνευσαν την βιταμίνη D₂ στα καλλιεργούμενα είδη μακρομυκήτων, σε αντίθεση με τα άγρια είδη που την περιείχαν σε υψηλά επίπεδα (4.7-194 mg/100g ξηρού βάρους). Η εργοστερόλη ήταν γενικά η επικρατέστερη στερόλη σε όλα τα είδη και το περιεχόμενο της επί ξηρού βρέθηκε υψηλότερο (602.1-678.6 mg/100g) στα καλλιεργούμενα, σε σχέση με τα άγρια είδη (296-489 mg/100g). Το περιεχόμενο της βιταμίνης D₂ και της εργοστερόλης διέφερε σημαντικά και λιγότερο σημαντικά, αντίστοιχα, μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων των μακρομυκήτων, με τα χαμηλότερα επίπεδα και για τα δύο συστατικά στο στύπο. Τέλος, ανάλυση του περιεχομένου της εργοστερόλης στους διαφορετικούς ιστούς του *L. edodes*, έδειξε σημαντικές διαφορές στην κατανομή του. Έτσι, η μετατροπή της εργοστερόλης σε βιταμίνη D₂ στους μακρομύκητες με την έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία, επηρεάζεται σημαντικά από τον προσανατολισμό των ιστών των στην ακτινοβολία (Jasinghe & Perera 2005).

1.8.5 Αρωματικές Ενώσεις

Οι Βασιδιομύκητες που ζουν πάνω σε νεκρό ή ζωντανό ξυλώδη ιστό, προκαλώντας λευκή σήψη, μπορούν και αποδομούν πλήρως τη λιγνίνη, ένα πολυμερές υποκατεστημένων *p*-υδροξυ-κινναμυλ- αλκοολών, μεταβολίζοντας τα προκύπτοντα φαινολικά μονομερή σε ενώσεις

με αρωματικό χαρακτήρα που μπορούν να αξιοποιηθούν από τις βιομηχανίες τροφίμων για την ανάπτυξη φυσικών αρωματικών ενώσεων και αρωματικών παραγόντων (Lomascolo et al. 1999). Από αυτές οι επικρατέστερες είναι η 1-οκτεν-3-όλη, η 1-οκτεν-3-όνη, η βανιλίνη, η βενζαλδεΐδη, η φαινυλακεταλδεΐδη, το μεθυλοβενζοϊκό οξύ, το βουτανοϊκό οξύ, τα αρωματικά 5'-νουκλεοτίδια, και τερπενοειδή όπως η σιτρονελλόλη και η λιναλοόλη (Abraham & Berger 1994, Çağlarımak 2007, Cho et al. 2008, Tsai et al. 2009). Ύστερα από ανάλυση των φαινολικών συστατικών άγριων ειδών μακρομυκήτων της Πορτογαλίας, διαπιστώθηκε η παρουσία πρωτοκατεχικού, π-υδροξυβενζοϊκού, π-κουμαρικού, κινναμικού και βανιλικού οξέος (Barros et al. 2009, Vaz et al. 2010).

1.9 Φαρμακευτική αξία των Μακρομυκήτων

Οι μακρομύκητες αποτελούν μία πολύ σημαντική αλλά και ανεξάντλητη πηγή νέων προϊόντων με φαρμακευτική δράση. Από τα 15.000 γνωστά είδη μανιταριών, τα 2.000 είναι ασφαλή για κατανάλωση και περίπου 300 διαφορετικά είδη από αυτά έχουν βιοιατρικές και θεραπευτικές ιδιότητες (Rai et al. 2005). Τα περισσότερα βέβαια στοιχεία σχετικά με τη φαρμακευτική αξιοποίηση των μακρομυκήτων προέρχονται από τις Ανατολικές χώρες, όπου είδη με βιολογικά δραστικές ενώσεις και φαρμακευτικά οφέλη, όπως το *Lentinus edodes* και το *Ganoderma lucidum* καλλιεργούνται πολλές χιλιετίες πριν (Lindequist et al. 2005).

Η αξιοποίηση των μακρομυκήτων στην φαρμακευτική και ιατρική που έχει προκαλέσει το ολοένα και αυξανόμενο παγκόσμιο ενδιαφέρον τόσο των επιστημονικών, όσο και των κλινικών ομάδων, οφείλεται σε δύο βασικούς λόγους. Καταρχήν, οι μακρομύκητες επιδεικνύουν αποτελεσματική βιολογική δράση για την αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων και μεταβολικών διαταραχών υψηλής σοβαρότητας (π.χ. καρκίνος ή εκφυλιστικές ασθένειες). Η θεραπευτική αποτελεσματικότητά τους βασίζεται στις πολλαπλές και σύνθετες βιολογικές δράσεις τους σε διαφορετικούς κυτταρικούς και μοριακούς στόχους. Οι βιοδραστικές ουσίες των μακρομυκήτων μπορούν να δράσουν συνδυαστικά για να επιδράσουν στους κυτταρικούς υποδοχείς, αλλά και να διεγείρουν κατευθυνόμενα σήματα που οδηγούν σε υψηλή φαρμακολογική αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση (Borchers et al. 2004). Ο δεύτερος λόγος της αυξανόμενα αποδοχής των μακρομυκήτων από τους βιοϊατρικούς και φαρμακευτικούς κλάδους, είναι το γεγονός ότι οι δευτερογενείς βιοδραστικοί μεταβολίτες μπορούν να ανακτηθούν τόσο από τα καλλιεργούμενα ή άγρια καρποσώματά τους, όσο και από την μυκηλιακή βιομάζα και το υγρό από την ανάπτυξή τους σε βυθισμένες καλλιέργειες σε

βιοαντιδραστήρες (Cui & Chisti 2003). Η απομόνωση των φυσικών δραστικών προϊόντων τους (π.χ. πολυφαινόλες, πολυσακχαρίτες, τερπενοειδή) απαιτούν συνηθισμένες αναλυτικές τεχνικές (Abraham 2001). Τελικά, οι μακρομύκητες προβάλλουν μια σημαντική δυνατότητα για παραγωγή βιολογικά ενεργών μεταβολιτών αλλά και μία εξαιρετικά πλούσια φυσική πηγή για ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

1.9.1 Αντικαρκινική δράση

Η αντικαρκινική δράση αποτελεί την πλέον σημαντική βιολογική δράση που επιδεικνύουν οι μακρομύκητες. Περισσότερα από 50 είδη μακρομυκήτων εμφανίζουν αποτελεσματική δράση έναντι όγκων και καρκινικών κυττάρων (Tomasi et al. 2004). Οι πολυσακχαρίτες και ειδικά οι τύπου β-(1,3), (1,6) γλυκάνες, μεγάλου μοριακού βάρους έχουν αποδείξει σημαντική αντι-νεοπλασματική δράση (Tao et al. 2006). Για παράδειγμα η κρεστίνη από τον *Trametes versicolor* παρουσιάζει αντικαρκινική δράση και χρησιμοποιείται εμπορικά στις χημειοθεραπείες και ραδιοθεραπείες (Wasser 2002), η λεντινάνη από τον *Lentinus edodes* έχει επιδείξει προληπτική αλλά και θεραπευτική δράση (καρκινοστατική) κατά του καρκίνου του στομάχου (Matilla et al. 2000), η γκριφολίνη από το *Albatrellus confluens* παρουσιάζει αντινεοπλασματική δράση έναντι των καρκίνων του ήπατος, του πνεύμονα, και του στήθους (Ye et al. 2005) και η κλιτοσυπίνη από τον *Clitocybe nebularis* παρεμποδίζει την καρκινική ανάπτυξη (Brzin et al. 2000). Ακόμα, το *Ganoderma lucidum* έχει αντικαρκινική δράση που οφείλεται στους πολυσακχαρίτες τύπου β-D-γλυκάνες, στα τριτερπένια (π.χ. γανοδερικό οξύ Z, Y, X, W, V, T, λουκριαλδεΐδες A, B, C) και στις πρωτεΐνες LZ-8 (Gao J.J. 2002).

1.9.2 Αντιαθηρογενετική δράση

Πολλά είδη μακρομυκήτων έχουν δείξει δράση κατά της αθηρογένεσης, παρεμποδίζοντας κυρίως τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης (Lindequist et al. 2005). Για παράδειγμα, το *Agaricus blazei* (Liu et al. 2008) έχει αντιαθηρογενετική δράση. Για το *Ganoderma lucidum* έχει βρεθεί ότι τα γανοδερικά οξέα C, F και S, παρεμποδίζουν την αθηροσκλήρωση (Hajaji et al. 2005). Το *Lentinus edodes* περιέχει ένα αντιχοληστεροναϊμικό συστατικό, γνωστό ως εριταντενίνη που πρόκειται για ένα παράγωγο νουκλεοτιδίου (Enman et al. 2007). Ακόμα η λοβασατίνη (παρεμοδιστής της HMGCoA αναγωγάσης) που έχει απομονωθεί από το *P. ostreatus* παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση χοληστερόλης και

χρησιμοποιείται ευρέως κλινικά για την αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας (Alarcón et al. 2003, Hossain et al. 2003, Khatun et al. 2007).

1.9.3 Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση στην οποία περιλαμβάνεται η δράση κατά μυκήτων, βακτηρίων, ιών και παρασίτων αποτελεί την τρίτη κατά σειρά πιο διαδεδομένη βιολογική δράση των μακρομυκήτων (Kettering et al. 2003). Παραδείγματα ειδών που χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών δράσεων είναι τα *Agaricus xanthodermus*, *Armillaria mellea*, *Clitocybe nebularis*, *G. lucidum*, *Grandiflora frondosa*, *Lentinus edodes*, *Omphalotus illudens*, *Piptoporus betulinus*, *P. ostreatus* και *Rozites caperatus* (Poucheret et al. 2006). Η αντιμικροβιακή δράση προέρχεται τόσο από τις ουσίες που έχουν απομονωθεί, όσο και από ολόκληρα εκχυλίσματα των μακρομυκήτων (Brandt & Piraino 2000). Παραδείγματα ουσιών με αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι η κρεστίνη από τον *Trametes versicolor*, η λεντινάνη και το οξαλικό οξύ από τον *L. edodes*, τα τριτερπένια (γανοντεριόλη *F*, γανοντερμανοτριόλη και γανοδερικό οξύ *B*) από το *G. lucidum* αλλά και το υπεροξείδιο της εργοστερόλης που παράγουν πολλά είδη (Lindequist et al. 2005).

1.9.4 Υπογλυκαιμική δράση

Έρευνες έχουν δείξει ότι πολλά είδη μακρομυκήτων μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιας βιολογικής δράσης είναι το *G. lucidum* (Zhang 2004) το *Ganoderma applanatum* (Yang 2007), το *Agaricus brasiliensis* (Liu et al., 2008), το *Agaricus sylvaticus* (Fortes et al. 2009a) και είδη του γένους *Cordyceps* (Li S.P. et al. 2006, Lo et al. 2004). Η υπογλυκαιμική δράση μάλιστα του *Grandiflora frondosa* (Hong et al. 2007, Lo et al. 2008) έχει αποδοθεί σε έναν παρεμποδιστή της α -γλυκοσιδάσης (Matsur et al. 2002). Επίσης το δεϋδροτραμετενολικό οξύ από τα είδη *Wolfiporia cocos*, *Laricifomes officinalis*, *Fomitopsis officinalis* και *Laetiporus sulphureus* αποδεδειγμένα μειώνει την υπεργλυκαιμία (Sato et al. 2002).

1.9.5 Αντιφλεγμονώδη δράση

Μία πρωτεογλουκάνη από το *Pleurotus linteus* (Kim et al. 2003b) καθώς και τα γανοδερικά οξέα *A*, *B*, *G* και *H* που έχουν απομονωθεί από το *G. lucidum* έχουν επιδείξει αντιφλεγμονώδη δράση (Koyama et al. 1997). Ακόμα, η εργοστερόλη, η εργοστα-4,6,8(14),22-

τετραεν-3-όνη, και η 1-ολεϋολ-2-λινολεϋολ-3-παλμιτοϋλ-γλυκερόλη από το *Grandiflora frondosa* παρεμποδίζουν τη δράση των κυκλό-οξυγενασών 1 και 2 (Zhang Y. et al. 2002).

1.10 Παραγωγή Φαρμακευτικών Προϊόντων από Μακρομύκητες

Ολοένα και αναπτύσσεται έντονα το ενδιαφέρον για τη φαρμακοβιομηχανική αξιοποίηση μιας νέας τάξης ενώσεων που έχουν ως πηγή προέλευσης μακρομύκητες με φαρμακευτικές ιδιότητες. Ολόκληρο το μέρος του μακρομύκητα (κυρίως τα καρποσώματα), τα εκχυλίσματα (καρποσωμάτων ή μυκηλίου) και οι ουσίες που έχουν απομονωθεί είναι κατάλληλα για την αξιοποίησή τους στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων με τη μορφή φαρμάκων ή διατροφικών συμπληρωμάτων. Το υλικό μπορεί να προέλθει από τη συλλογή του στη φύση, από την καλλιέργεια των μακρομυκήτων σε μονάδες παραγωγής, ή από την καλλιέργεια του μυκηλίου σε βιοαντιδραστήρες με υγρό ή στερεό υπόστρωμα. Τα εκχυλίσματα παρασκευάζονται με την εκχύλιση των μακρομυκήτων (ξηρών ή φρέσκων) με τους κατάλληλους διαλύτες. Οι καθαρές ενώσεις ανακτώνται με την απομόνωσή τους από το φυσικό ή τεχνητά καλλιεργούμενο υλικό ή μέσω χημικής σύνθεσης. Πολύ συχνά, το φυσικό προϊόν λειτουργεί ως σημείο έναρξης για την ανάπτυξη ποικίλων παραγώγων μορίων (Lindequist et al. 2005, Wasser et al. 2000).

Σήμερα, το 80-85% των βιοενεργών προϊόντων από είδη μακρομυκήτων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον (π.χ. η λεντινάνη) προέρχονται από τα καρποσώματα. Μόνο το 15% αυτών προέρχονται από εκχύλίσματα των μυκηλίων (π.χ. η PSK από το *Trametes versicolor*). Ένα πολύ μικρό ποσοστό φαρμακευτικών προϊόντων προέρχεται από το υγρό καλλιέργειας (π.χ. η σχιζοφυλλάνη από το *Schizophyllum commune*). Μετά την παραγωγή, οι κατάλληλες μορφές γαληνικών σκευασμάτων, όπως κάψουλες, ταμπλέτες ή αφεψήματα αναπτύσσονται ανάλογα του υλικού. Μείγματα από πολλά είδη μακρομυκήτων ή συνδυασμός μακρομύκητα και υποστρώματος αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερο (Wasser et al. 2000). Συμπληρώματα διατροφής που έχουν ως βάση μακρομύκητες πλούσιοι σε βιολειτουργικά συστατικά, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα τα τελευταία χρόνια και στη χώρα μας, όπως για παράδειγμα το διατροφικό συμπλήρωμα του *G. lucidum* που κυκλοφορεί στην ελληνική αγορά με την εμπορική ονομασία Omanitus, σε μορφή διάφανης κάψουλας (Superfoods astra medical Hellas).

1.11 Ανάπτυξη Μακρομυκήτων σε Βυθισμένη Καλλιέργεια

1.11.1 Στερεά και Υγρή Βυθισμένη Καλλιέργεια

Σήμερα, οι μακρομύκητες και τα προϊόντα αυτών που διατίθενται εμπορικά προέρχονται αποκλειστικά σχεδόν από την ανάπτυξή τους σε αγρούς, που αποτελεί όμως μια διεργασία χρονοβόρα αλλά και απαιτητική από πλευράς εργατικού δυναμικού. Η βυθισμένη όμως καλλιέργεια των εδώδιμων και με φαρμακολογικό ενδιαφέρον μακρομυκήτων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον παγκόσμια, αφού προβάλλει μια σημαντικά υποσχόμενη βιοτεχνολογικά δυνατότητα για την ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας και πολύτιμων βιοενεργών μεταβολιτών ή για εφαρμογές π.χ. βιοαποκατάστασης και αποτοξικοποίησης (Wasser 2002).

Χαρακτηριστικό της καλλιέργειας στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF) ή ζύμωσης στερεάς κατάστασης (ΖΣΚ) είναι η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε στερεό υπόστρωμα με τη σχεδόν απουσία ελεύθερου νερού (ενεργότητα νερού, $a_w \approx 0$), αλλά με την επαρκή ποσότητα που απαιτείται για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό (Mitchell & Lonsane 1992). Με τη ΖΣΚ αξιοποιούνται τα αγροβιομηχανικά απορρίμματα, ενώ οι μικροοργανισμοί παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα που διασπούν απρόσβλητα βιοπολυμερή, όπως κυτταρίνη, και με τις περαιτέρω μικροβιακές διεργασίες παράγονται πολύτιμα προϊόντα. Η παραγωγή κομπόστ, η ανάπτυξη μακρομυκήτων, η βιοαποκατάσταση και η βιαποδόμηση τοξικών ενώσεων, η βιολογική αποτοξικοποίηση αγροτικών και βιομηχανικών υπολειμμάτων, η βιοπολυτοποίηση, η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, βιοφαρμακευτικών και ενζύμων από μικροοργανισμούς αποτελούν κάποιες από τις κοινές εφαρμογές που έχει η ΖΣΚ (Carlisle et al. 2001, Gonzalez et al. 2003, Mukherjee & Nandi 2004, Nwe et al. 2001, Ngai & Ng 2003). Περισσότερες θεμελιώδεις προσεγγίσεις της ΖΣΚ δίνονται από τον Pandey (2003).

Η ΖΣΚ τυπικά χρησιμοποιεί ακατέργαστα υλικά χαμηλού οικονομικού κόστους, στα οποία δεν προαπαιτείται αποστείρωση και χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή εισροή ενέργειας. Παρόλα αυτά, η ΖΣΚ αποτελεί μια αργή διεργασία, και περιορίζεται στην επιλογή μικροοργανισμών ανθεκτικούς σε χαμηλά επίπεδα a_w . Επιπλέον, η ΖΣΚ καθίσταται δυσχερής στον έλεγχο, στο χειρισμό αλλά και στην ανάγκη για κλιμάκωση του μεγέθους (Hölker et al. 2004). Οι διεργασίες ΖΣΚ έχουν πλέον παραμεληθεί για την ανάκτηση υψηλής αξίας προϊόντων στο δυτικό κόσμο. Παρόλα αυτά, τις τελευταίες δεκαετίες, πραγματοποιήθηκαν σημαντικοί πρόοδοι στη μηχανική βιοχημικών διεργασιών σχετικά με τη ΖΣΚ (Pandey 2003), με τις οποίες

επιτεύχθηκε η επίλυση κοινών προβλημάτων της, όπως είναι οι χαμηλοί ρυθμοί μεταφοράς του O_2 , η μεταφορά θερμότητας και CO_2 και οι βακτηριακές μολύνσεις. Επιπλέον, η βελτίωση που επήλθε στον έλεγχο της διεργασίας, μέσω της κινητικής ανάλυσης και της μαθηματικής μοντελοποίησης, μαζί με την εισαγωγή σύγχρονων τύπων βιοαντιδραστήρων, ενίσχυσε τη εφαρμογή της ΖΣΚ στην τεχνολογία παραγωγής (Suryanarayana 2003).

Λόγω των μειονεκτημάτων που παρουσιάζει η ΖΣΚ, η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια (Submerged Liquid Fermentation, SLF) ή ζύμωση υγρής κατάστασης (ΖΥΚ) προτιμάται ως εμπορική μέθοδος ζύμωσης, ειδικά μάλιστα για την παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών (Fazenda et al. 2008). Σε αυτό πιθανό να συντέλεσε και η μεγάλης κλίμακας παραγωγή της πενικιλίνης κατά τον 2ο Παγκόσμιο Πόλεμο, καθιστώντας τη ΖΥΚ τεχνολογικό μοντέλο για κάθε διεργασία ζύμωσης. Στη διεργασία ΖΥΚ, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε υγρό μέσο, το οποίο αερίζεται έντονα και ανακινείται σε μεγάλες δεξαμενές, τους ζυμωτήρες ή βιοαντιδραστήρες (Schuler & Kargi 2005). Γενικότερα, η ΖΥΚ προτιμάται στις ζυμωτικές διεργασίες για εμπορικές εφαρμογές γιατί είναι ουσιαστικά λιγότερο προβληματική (η μεταφορά θερμότητας και οξυγόνου είναι πολύ καλύτερη, ενώ η ομοιογένεια των καλλιεργειών είναι σαφώς ανώτερη), καθιστώντας την περισσότερο αξιόπιστη και παραγωγική, ευκολότερη στο χειρισμό και έλεγχο των βασικών λειτουργικών παραμέτρων, όπως και πιο ευέλικτη (Gibbs et al. 2000).

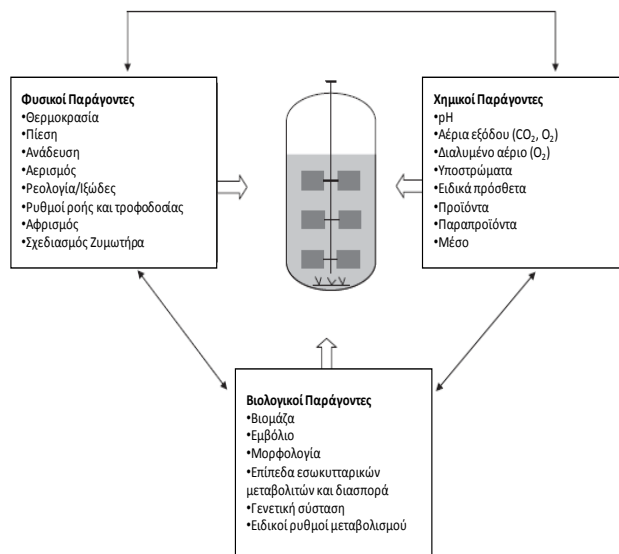
Η ΖΥΚ για τους μακρομύκητες άρχισε προοδευτικά να εφαρμόζεται τη δεκαετία του 50, (Eyal 1991). Ο λόγος για αυτήν την προοδευτική εφαρμογή της ΖΥΚ στον τομέα της τεχνολογίας των μακρομυκήτων είναι σαφέστατη. Οι μακρομύκητες παραδοσιακά αναπτύσσονταν σε κομπόστ, κορμούς δέντρων και πριονίδια, διεργασία που απαιτούσε από έναν μέχρι αρκετούς μήνες μέχρι την εμφάνιση των καρποσωμάτων. Επιπλέον, η σύσταση των καρποφοριών ήταν ιδιαίτερα μεταβλητή, ειδικά στο περιεχόμενο σε βιολογικά ενεργές ουσίες, ενώ η εκχύλιση π.χ. των πολυσακχαριτών από τα καρποσώματα που παράγονταν αποτελούσε μια απαιτητική διαδικασία (Lo et al. 2006). Αντιθέτως, η ΖΥΚ προσφέρει τη δυνατότητα για παραγωγή αυτών των ουσιών γρηγορότερα, πιο αποδοτικά και επιπλέον πιο υπεύθυνα, χωρίς να επηρεάζεται από εποχικές διακυμάνσεις. Από την πρώτη αναφορά για μυκηλιακή ανάπτυξη του *Agaricus campestris* σε συνθετικό μέσο ανάπτυξης σε ΖΥΚ (Humfeld, 1948), έχει ακολουθήσει σημαντική πρόοδος για την καθιέρωση των διεργασιών βυθισμένης καλλιέργειας αυτών των μυκήτων σε βιομηχανική κλίμακα. Οι μακρομύκητες στους βιοαντιδραστήρες αναπτύσσονται πιο αργά σε σχέση με άλλους μυκηλιακούς μύκητες και τα βακτήρια, καθιστώντας την αριστοποίηση

παραμέτρων ανάπτυξης και τον έλεγχο σε επίπεδο υγρής καλλιέργειας πολύ ενδιαφέρον θέμα (Fazenda et al. 2008).

Πάντως, πολλοί διαφορετικοί παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται οικονομικοί παράμετροι, η επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος, αλλά και οι τοπικές κυβερνητικές νομοθεσίες για τη διάθεση των απορριμμάτων (στερεών ή υγρών), προσδιορίζουν τελικά την επιλογή της διεργασίας που επιθυμείται κάθε φορά να εφαρμοστεί.

1.11.2 Ανάπτυξη και Σύνθεση προϊόντων των Μακρομυκήτων σε Συνθήκες ΖΥΚ

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση μιας βιοδιεργασίας κατηγοριοποιούνται σε φυσικούς, χημικούς ή βιολογικούς (Σχ. 1.2). Οι φυσικοί και χημικοί καθορίζουν το περιβάλλον του μικροοργανισμού, ενώ οι βιολογικοί διαμορφώνουν την συμπεριφορά του. Οι άριστες συνθήκες ζύμωσης εξαρτώνται από τη φύση του τελικού προϊόντος, που μπορεί να είναι η βιομάζα ή κάποιος μεταβολίτης (πολυσακχαρίτης, ένζυμο κ.τ.λ.), αλλά και από το είδος του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται. Επιπροσθέτως, ο ρυθμός μυκηλιακής ανάπτυξης αλλά και η μορφολογία του μύκητα κατά τη βιοδιεργασία που ακολουθείται εξαρτώνται από τις συνθήκες καλλιέργειας και τη σύσταση του μέσου καλλιέργειας που χρησιμοποιείται (Vaidyanathan et al. 1999).



Σχήμα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση μιας βιοδιεργασίας και η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (Vaidyanathan et al. 1999).

1.11.2.1 Φυσικοί Παράγοντες

Γενικά, οι φυσικοί παράμετροι, όπως η θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάδευσης και η ρεολογία του υγρού σε μια βιοδιεργασία επιδρούν στο μακροπεριβάλλον του μικροοργανισμού, επηρεάζοντας τη μορφολογική και φυσιολογική συμπεριφορά του, επηρεάζοντας τελικά την όλη απόδοση αυτής της διεργασίας. Οι βασικοί φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις ζυμώσεις των μακρομυκήτων αναλύονται παρακάτω.

α) Θερμοκρασία

Στις υγρές βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων, η θερμοκρασία αποτελεί μια εύκολη παράμετρο ελέγχου. Η θερμοκρασία επηρεάζει διάφορες μεταβλητές της καλλιέργειας, όπως το ρυθμό ανάπτυξης, την τάση διαλυμένου οξυγόνου (Dissolved Oxygen Tension, DOT), το ρυθμό εξάτμισης του μέσου, το σχηματισμό μυκηλιακών συσσωματωμάτων (pellets), αλλά και την παραγωγή μεταβολιτών (Paragianni 2004). Η ανάπτυξη του μυκηλίου των μακρομυκήτων σε συνθήκες υγρής βυθισμένης καλλιέργειας έχει εξεταστεί σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 25°C μέχρι 36°C (Eyal 1991).

Η αύξηση της θερμοκρασίας γενικά προκαλεί υψηλότερους ρυθμούς μεταβολισμού, αλλά επιφέρει ελάττωση της διαλυτότητας του οξυγόνου μέσα στο μέσο ανάπτυξης. Μικρές διακυμάνσεις στη θερμοκρασία είναι δυνατό να μειώσουν σημαντικά την παραγωγικότητα. Για παράδειγμα, η παραγωγή λιπάσης από το *Antrodia cinnamomea* (Lin & Yang 2006) επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, κάτι που δεν ισχύει όμως για τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Οι Lee W.Y. et al. (2007) ανέφεραν διαφορετική τιμή άριστης θερμοκρασίας για την παραγωγή βιομάζας, εσωπολυσακχαριτών (10°C) και εξωπολυσακχαριτών (25°C) από το Βασιδιομύκητα *Ganoderma applanatum* σε συνθήκες ΖΥΚ. Η παραγωγή κυτταρικής βιομάζας αλλά και εσωπολυσακχαριτών ελαττώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στην καλλιέργεια, που σημαίνει ότι το μυκήλιο εσωκυτταρικά συσσωρεύει πολυσακχαρίτες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Παρόμοια αποτελέσματα για την παραγωγή πολυσακχαριτών έχουν αναφερθεί και για άλλους μακρομύκητες, όπως για το *Agrocybe cylindracea* (Kim et al. 2005) και το *Grifola frondosa* (Lee et al. 2004).

β) Ανάδευση

Ο ρυθμός ανάδευσης και η ταχύτητα κίνησης του περιστροφέα επιδρούν σημαντικά στον καθορισμό του ρυθμού ανάπτυξης των μακρομυκήτων, επηρεάζοντας την ανάμιξη και τη μεταφορά μάζας και θερμότητας (Fazenda et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την ανάπτυξη νηματοειδών μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρες με συνεχή ανάδευση (continuously stirred-tank reactor, CSTR), η ανάμιξη και η μεταφορά του οξυγόνου είναι επαρκής μόνο τοπικά γύρω από τον περιστροφέα, θέτοντας έτσι τον όγκο του συνολικού υγρού ζύμωσης σε συνθήκες περιορισμένης ανάμειξης και τροφοδοσίας με οξυγόνο (Fazenda et al. 2008). Η ανάδευση ακόμα διατηρεί μια διαβαθμισμένη συγκέντρωση μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού των κυττάρων, η οποία μέσω των αυξανόμενων ρυθμών διάχυσης, συμβάλλει στην ικανοποιητική παροχή των θρεπτικών στοιχείων στα κύτταρα, ενώ έτσι διευκολύνεται η απομάκρυνση των απόβλητων αερίων και των άλλων παραπροϊόντων του καταβολισμού από το μικροπεριβάλλον των κυττάρων (Oh et al. 2007).

Παρόλ' αυτά, οι δυνάμεις διάτμησης που προκαλούνται από την ανάδευση μπορούν να βλάψουν τη δομή των κυττάρων, να οδηγήσουν σε μορφολογικές αλλαγές του μυκηλίου, αλλά και να προκαλέσουν διακυμάνσεις στο ρυθμό ανάπτυξης και στο σχηματισμό του τελικού προϊόντος (Paragianni 2004, Emelyanova 2005). Συνεπώς, ένας άριστος ρυθμός ανάδευσης προσδιορίζει μια σχέση ισορροπίας μεταξύ της ικανοποιητικής μεταφοράς οξυγόνου στο μέσο και των δυνάμεων διάτμησης, και οι δύο εκ των οποίων αυξάνονται με την αύξηση του ρυθμού ανάδευσης (Wagner et al. 2003). Επιπλέον, οι ρεολογικές ιδιότητες του υγρού ζύμωσης εξαρτώνται τόσο από τις συγκεντρώσεις της μυκηλιακής βιομάζας, όσο και από τη μορφολογία των κυττάρων της καλλιέργειας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες ανάδευσης (McNeil et al. 1986). Παρόλο που η επίδραση του ρυθμού ανάδευσης στην ανάπτυξη των μικρομυκήτων έχει ιδιαίτερα ερευνηθεί (Gibbs et al. 2000, Paragianni 2004), ελάχιστες μελέτες πραγματοποιούνται την σημαντικότητα της ανάδευσης στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων (Emelyanova et al. 2005, Yang et al. 2009).

Η άριστη μυκηλιακή ανάπτυξη ενός μύκητα πετυχαίνεται με τη μεγιστοποίηση του αριθμού των απολήξεων των υφών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, τουλάχιστον θεωρητικά, διασπώντας τα μυκηλιακά συσσωματώματα, κάτι που απαιτεί υψηλές ταχύτητες του περιστροφέα, ενώ ταυτόχρονα έτσι αυξάνεται και ο ρυθμός μεταφοράς του οξυγόνου (Paragianni 2004). Η έντονη ανάδευση έχει αποδειχθεί για τους μικρομύκητες (π.χ. *Aspergillus*)

ότι παρεμποδίζει, περιορίζει ή τουλάχιστον προκαλεί το σχηματισμό μικρού μεγέθους και περισσότερο συμπαγών μυκηλιακών συσσωματωμάτων και ακόμα ότι αυξάνει την πυκνότητα και το βαθμό διακλάδωσης των νηματοειδών υφών (Gibbs et al. 2000). Οι μηχανικές δυνάμεις δρουν αποκόπτοντας υφές, και έτσι περιορίζουν την επέκταση της επιφάνειας των μυκηλιακών συσσωματωμάτων. Αντιθέτως, όταν οι ρυθμοί ανάδευσης διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα, οι ρυθμοί μεταφοράς μάζας και οξυγόνου μειώνονται, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, και συχνά, όπως στην περίπτωση των μακρομυκήτων, στο σχηματισμό μεγάλου μεγέθους μυκηλιακών συσσωματωμάτων που έχει ως αποτέλεσμα όμως την περιορισμένη διάχυση του υποστρώματος (Fazenda et al. 2008). Το εύρος των τιμών των ρυθμών ανάδευσης που χρησιμοποιούνται σε διεργασίες μικρομυκήτων, όπως ειδών του γένους *Aspergillus* και *Penicillium*, είναι πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό που χρησιμοποιείται για τους μακρομύκητες (συνήθως μεταξύ 100 και 400 rpm).

Συμπερασματικά, οι ανώτεροι μύκητες μάλλον είναι περισσότερο επιρρεπείς στις διατμητικές τάσεις που προκαλούνται από την ανάδευση σε σχέση με άλλους νηματοειδείς μύκητες (Guga & Rau 1993). Οποσδήποτε, η χαμηλή ανάδευση επιφέρει μικρούς ρυθμούς μεταφοράς του οξυγόνου, αλλά αυτό δεν στέκεται πρόβλημα στις ζυμώσεις των μακρομυκήτων στις οποίες οι απαιτήσεις τους σε οξυγόνο είναι λιγότερες (για π.χ. ρυθμός έκλυσης αερίου 1 ννμ θεωρείται επαρκής σε καλλιέργειες μακρομυκήτων) σε σχέση με αυτές των μικρομυκήτων (Fazenda et al. 2008).

γ) Αερισμός

Ο αερισμός είναι μια κρίσιμη παράμετρος από τη στιγμή που αποτελεί μια από τις πρωταρχικές ενεργειακές εισροές στη διεργασία της ζύμωσης, και μαζί με την ανάδευση, ικανοποιεί τις απαιτήσεις των κυττάρων σε οξυγόνο. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου αλλάζει δέκα φορές ταχύτερα από την κυτταρική μάζα και τις άλλες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, καθιστώντας την, την πλέον σημαντική φυσική μεταβλητή για τον έλεγχο και την αριστοποίηση των αερόβιων ζυμώσεων (Gomes & Menawat 2000).

Οι απαιτήσεις οξυγόνου για την ανάπτυξη των κυττάρων του μικροοργανισμού ή την παραγωγή προϊόντων εξαρτάται από τη βιοενεργητική των αντίστοιχων μεταβολικών μονοπατιών. Το οξυγόνο ρυθμίζει ένζυμα βιοσύνθεσης-κλειδιά, και έτσι είναι δυνατόν άμεσα να καθορίσει τις αποδόσεις των τελικών προϊόντων. Η παροχή οξυγόνου επηρεάζει την

κυτταρική ανάπτυξη, τη μορφολογία, τους ρυθμούς απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών αλλά και τους ρυθμούς βιοσύνθεσης των μεταβολιτών (Tang & Zhong 2003).

Σε μελέτες που αφορούν την επίδραση των συνθηκών αερισμού στη μυκηλιακή ανάπτυξη και παραγωγή μεταβολιτών από μακρομύκητες σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες, οι Kim et. al. (2002) αναφέρουν ότι υψηλοί ρυθμοί αερισμού (2 vvm) αποδείχτηκαν ευνοϊκοί τόσο για την ανάπτυξη όσο και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σε υγρές καλλιέργειες του *Paecilomyces sinclairii*. Οι Tang & Zhong (2003) μελέτησαν την επίδραση του οξυγόνου στην παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας αλλά και μεταβολιτών (εξω-/εσωπολυσακχαριτών και του γανοδερικού οξέος) από το *Ganoderma lucidum*. Η αρχική τιμή του ογκομετρικού συντελεστή μεταφοράς του οξυγόνου (K_{La}) επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική ανάπτυξη, τη μορφολογία και την παραγωγή μεταβολιτών. Ο συντελεστής K_{La} χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δυναμικότητας ενός συστήματος ζύμωσης να μετατρέπει το οξυγόνο από την αέρια στην υγρή φυσική κατάσταση (Stanbury et al. 1995). Οι Oh et al. (2007) ανέφεραν σημαντική μεταβολή της μυκηλιακής μορφολογίας κάτω από διαφορετικές συνθήκες αερισμού της καλλιέργειας του *Cordyceps sphecocephala* σε βιοαντιδραστήρα. Καθώς ο ρυθμός αερισμού αυξανόταν από 0.5 σε 2.0 vvm, αναπτύσσονταν όλο και περισσότερα μυκηλιακά συσσωματώματα μειωμένης συνεκτικότητας, γεγονός που οδήγησε σε υψηλότερη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Τα υψηλότερα επίπεδα τάσης διαλυμένου οξυγόνου έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερους ρυθμούς μεταφοράς οξυγόνου και απορρόφησης από τα κύτταρα. Επιπλέον, η παροχή οξυγόνου στο εσωτερικό του μυκηλιακού συσσωματώματος μειώνεται σε συνάρτηση της διαμέτρου του και αποτελεί κιόλας έναν από τους περιοριστικούς παράγοντες ανάπτυξης των μακρομυκήτων (Tang & Zhong 2003).

Κάποιες μελέτες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους, στην επίδραση της παροχής εμπλουτισμένου οξυγόνου στην παραγωγή της μυκηλιακής βιομάζας και εξωπολυσακχαριτών από το *Grifola frondosa* και *Antrodia cinnamomea* σε βιοαντιδραστήρες (Hsieh et al. 2006, Shih et al. 2006). Οι καλλιέργειες και των δύο εξεταζόμενων μακρομυκήτων είχαν ρυθμό αερισμού 1 vvm, με εισαγόμενο αέρα που περιείχε διαφορετικά ποσοστά οξυγόνου. Στην καλλιέργεια του *A. cinnamomea*, υψηλή παροχή οξυγόνου (30% κορεσμός) ευνόησε την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή πολυσακχαριτών, αλλά περιορίσε την παραγωγή τερπενοειδών. Οι Shu & Wen (2003) ανέφεραν ότι ανεξαρτήτως της ταχύτητας του περιστροφέα, υψηλοί ρυθμοί παροχής οξυγόνου ευνόησαν την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ χαμηλοί ρυθμοί ευνόησαν τη βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών. Σχετικά με το *G. frondosa*, η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου (40%) που

εφαρμόστηκε παρεμπόδισε τόσο την κυτταρική ανάπτυξη, όσο και την παραγωγή πολυσακχαριτών.

Ο έλεγχος του ρυθμού αερισμού συνεισφέρει θετικά στην αύξηση της συνολικής παραγωγικότητας στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων. Επίσης, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη στρατηγικών ακριβούς ελέγχου των επιπέδων του διαλυμένου οξυγόνου, ειδικά σε υψηλής κλίμακας, ζυμώσεις με μεγάλο ιξώδες. Σε εσωκυτταρικό επίπεδο, ο έλεγχος του ρυθμού αναπνοής (επίπεδα NADH/NAD) σε σχέση με την ηλικία των κυττάρων, και η σύγκριση αυτών με τη δραστηριότητα ενζύμων-κλειδιά στο μεταβολισμό υδατανθράκων, κρίνεται σημαντικός (Fazenda et al. 2008).

Η παραγωγή CO₂ αποτελεί αναπόφευκτο επακόλουθο της κυτταρικής αναπνοής στις αερόβιες ζυμώσεις. Η άμεση μέτρηση του ρυθμού εξέλιξης του CO₂ (CER, Carbon dioxide Evolution Rate) είναι χρήσιμη, αφού άμεσα συσχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη, και μπορεί να δώσει απευθείας πληροφορίες για τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων στο ζυμωτήρα. Η παραγωγή CO₂ στο ζυμό της καλλιέργειας είναι δυνατόν να επηρεάσει την μορφολογία των μυκήτων, αλλά και να αποτελέσει αναγκαία προϋπόθεση τόσο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όσο και για τη σύνθεση προϊόντων. Παρόλα αυτά, η παραγωγή CO₂, μπορεί να παρεμποδίσει την κυτταρική ανάπτυξη, τουλάχιστον στους μικρομύκητες. Για παράδειγμα, στον μικρομύκητα *Penicillium chrysogenum*, τα υψηλά επίπεδα CO₂ προκάλεσαν μειωμένο ιξώδες στο ζυμό της καλλιέργειας, και έτσι αποδοτικότερη μεταφορά του οξυγόνου, ενεργοποιώντας τη σύνθεση χιτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά μειωμένη παραγωγή πενικιλίνης (Znidaršič & Panko 2001). Τέτοιες επιδράσεις του CO₂ μπορεί να παρουσιαστούν και στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων, και έτσι η παρακολούθηση των CERs κατά την περίοδο καλλιέργειας κρίνεται απαραίτητη.

δ) Σχεδιασμός ζυμωτήρα

Στις περισσότερες ζυμώσεις μακρομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ανάδευσης (CSTR), οι καθιερωμένοι περιστροφείς ακτινωτής ροής Rushton χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως σύστημα ανάμιξης. Γενικότερα, οι περιστροφείς Rushton προσφέρουν ευελιξία για πολλούς διαφορετικούς τύπους μικροβιακών κυττάρων (ακόμα και ζωικά κύτταρα). Παρόλα αυτά, μεταδίδουν μεγάλες διατμητικές τάσεις στο μέσο ανάπτυξης, και η χρήση τους, ειδικά σε υψηλές ταχύτητες, μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην απόδοση των τελικών προϊόντων. Ωστόσο, καμία ως τώρα μελέτη δεν έχει διεξαχθεί σχετικά με το κατά πόσο τέτοιες επιδράσεις

παρατηρούνται και στους μακρομύκητες. Οι περισσότερες μελέτες περιορίζονται σε συστήματα αναδεδυμένων καλλιεργειών σε κωνικές φιάλες με χαμηλές ταχύτητες ανάδευσης από 50-250 rpm (Fazenda et al. 2008).

Κάποια εναλλακτικά συστήματα ή διατάξεις περιστροφών έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την περισσότερο οργανωμένη ανάμιξη σε ζυμώσεις νηματοειδών μυκήτων. Έτσι, καθίσταται χρήσιμη η εξέταση τέτοιων εναλλακτικών συστημάτων ανάμιξης και στις υγρές βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων (π.χ. οι περιστροφείς αξονικής ροής). Μόνο μία μελέτη έχει αναφερθεί κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση των διαφορετικών χρησιμοποιούμενων συστημάτων ανάμιξης του αντιδραστήρα (αξονικής ροής, ελικοειδούς ταινίας και Rushton περιστροφείς) στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *Schizophyllum commune* (Rau et al. 1992), στην οποία αποδείχτηκε ότι το σύστημα ανάδευσης επηρεάζει σημαντικά τις αποδόσεις.

Η χρήση ζυμωτήρων ανερχόμενου ρεύματος αέρα είναι δυνατό να ενθαρρύνει την αύξηση των αποδόσεων της μυκηλιακής βιομάζας αλλά και της παραγωγής πολυσακχαριτών από τους μακρομύκητες. Οι αντιδραστήρες ανερχόμενου ρεύματος αέρα, προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των αντιδραστήρων συνεχούς ανάδευσης. Δεν απαιτούν μηχανική ανάδευση, και έτσι, οι διατμητικές τάσεις που αναπτύσσονται είναι σημαντικά λιγότερες. Ακολούθως, το κόστος ενέργειας είναι μειωμένο και οι πιθανότητες μόλυνσης μικρότερες, αφού πολύπλοκα μηχανικά πτερύγια δεν απαιτούνται στον άξονα του περιστροφέα (Gibbs et al. 2000). Από την άλλη πλευρά όμως, αυτοί οι τύποι αντιδραστήρων δεν είναι τόσο αποδοτικοί όσο οι αντιδραστήρες ανερχόμενου ρεύματος αέρα σχετικά με τη μεταφορά μάζας του O₂. Οι αποδόσεις βιομάζας όσο και εξωπολυσακχαριτών ήταν χαμηλότερες σε αντιδραστήρα ανερχόμενου ρεύματος αέρα σε σχέση με αντιδραστήρα συνεχούς ανάδευσης, όπως αναφέρθηκε σε μελέτη στον μακρομύκητα *Grifola frondosa* (Lee et al., 2004). Παρόμοια μελέτη (Cho et al., 2006) με το *Tremella fuciformis* έδωσε ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα, αφού οι αποδόσεις σε βιομάζα και εξωπολυσακχαρίτες αποδείχτηκαν υψηλότερες σε αντιδραστήρα ανερχόμενου ρεύματος αέρα.

ε) Αφρισμός

Ο αφρισμός αποτελεί ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο, αφού παρεμβαίνει στις συνθήκες ζύμωσης και έτσι περιπλέκει την ανάκτηση των επιθυμούμενων προϊόντων. Πολλές φορές προστίθονται συμβατικά χημικά αντι-αφριστικά μέσα, ειδικά σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες

των μακρομυκήτων. Πρέπει όμως να χρησιμοποιούνται προσεκτικά, αφού είναι δυνατόν να μειώσουν σημαντικά τους ρυθμούς μεταφοράς του οξυγόνου, με αρνητικά επακόλουθα στην κυτταρική ανάπτυξη (Wagner et al. 2003).

στ) Διάρκεια καλλιέργειας

Η διάρκεια της ζύμωσης στις βυθισμένες καλλιέργειες συχνά επηρεάζει την τελική ποιότητα του προϊόντος. Για παράδειγμα, κατά την παραγωγή πολυσακχαριτών, η παραγωγή ενζύμων αποδόμησης, όπως των β-γλουκανασών, συνδέεται με την ηλικία της καλλιέργειας (μέσω της εξάντλησης άνθρακα), και έτσι η δράση τους μπορεί να καθορίσει την ποιότητα και την απόδοση των πολυσακχαριτών (Shu & Wen 2003), η αξία των οποίων εκτιμάται με βάση το μοριακό τους βάρος, με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (>1000kDa) να προσφέρει καλύτερες βιολογικές δράσεις. Σε βυθισμένες καλλιέργειες του *Ganoderma applanatum* (Lee et al. 2007), όσο μεγαλύτερος ο χρόνος της καλλιέργειας που εφαρμοζόταν, τόσο μεγαλύτερου μοριακού βάρους οι εξωπολυσακχαρίτες που ανακτούνταν, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κολλώδους υφής στο υγρό καλλιέργειας, με τα κύτταρα να σχηματίζουν μεγάλες πυκνές συμπαγείς μάζες. Επίσης, αναφέρονται υψηλότερα επίπεδα εξωπολυσακχαριτών κατά τη φάση στασιμότητας, ενώ περισσότεροι ενδοπολυσακχαρίτες συσσωρεύονται στα κύτταρα κατά τη φθίνουσα φάση. Ομοίως, η εξωκυτταρική λιπάση από τον *Antrodia cinnamomea* παρουσιάζει τη μέγιστη δραστηριότητα σε δείγματα που συλλέχθηκαν στο τέλος της λογαριθμικής φάσης (Lin & Ko 2005). Συνεπώς, η ηλικία της καλλιέργειας, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στο τελικό προϊόν, και έτσι, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως παράμετρος αριστοποίησης.

1.11.2.2 Χημικοί Παράγοντες

α) Η τιμή του pH

Στις βυθισμένες καλλιέργειες όλων των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των μακρομυκήτων, η αρχική τιμή του pH ανάπτυξης είναι δυνατόν να επηρεάσει τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, την κυτταρική μορφολογία και δομή, τη διαλυτότητα των αλάτων, την ιοντική κατάσταση των υποστρωμάτων, τους ρυθμούς απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών, καθώς και τη παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών (Fang & Zhong 2002). Η αρχική τιμή του pH καθορίζεται από τη σύσταση του μέσου. Έτσι, σε ζυμώσεις όπου η τιμή του pH δεν ελέγχεται αυτόματα, είναι δυνατόν να παρουσιαστούν μεταβολές της τιμής του κατά την

ανάπτυξη του μύκητα, λόγω της αφομοίωσης των θρεπτικών στοιχείων ή της απέκκρισης άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού, επηρεάζοντας τελικά τόσο την κυτταρική ανάπτυξη, όσο και την παραγωγή μεταβολιτών (Paragianni 2004).

Γενικά, οι μακρομύκητες φαίνεται να αναπτύσσονται μέσα σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH (Worgan 1968), και είναι γενικά προτιμότερο η εφαρμογή τιμών γύρω στο 5.0 ή και λιγότερο, γιατί έτσι μειώνονται περισσότερο οι πιθανότητες βακτηριακών επιμολύνσεων, ειδικά όταν οι μύκητες αναπτύσσονται σε υπολείμματα, κάτω από μη ασηπτικές συνθήκες. Πολλοί μακρομύκητες έχουν χαμηλή άριστη τιμή pH ανάπτυξης (pH 4.0), αλλά υψηλότερες άριστες τιμές (pH 6.0) έχουν αναφερθεί για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (Kim et al. 2005, Jonathan & Fasidi 2003). Ωστόσο, οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν ισχύουν για όλες τις περιπτώσεις (Fang & Zhong 2002, Kim et al. 2003, Xu & Yun 2003). Η άριστη τιμή του pH εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα από το είδος του οργανισμού που μελετάται (Xu & Yun 2003).

Οι αλλαγές στην τιμή του pH οφείλονται τις περισσότερες φορές σε άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού που εκκρίνονται στο μέσο, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα οργανικά οξέα (Xiao et al. 2006). Όταν χρησιμοποιούνται σύνθετα μέσα (π.χ. εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνη), η τιμή του pH αυξάνεται λόγω της παραγωγής πρωτεασών για την αποδόμηση των σύνθετων πηγών αζώτου (Delgado-Jarana et al. 2002). Η αύξηση στην τιμή του pH μπορεί να οφείλεται και στην αυτόλυση της καλλιέργειας. Γενικά, όταν χρησιμοποιούνται αμμωνιακά άλατα ως πηγές αζώτου στο μέσο ανάπτυξης, η τιμή του pH μειώνεται ως αποτέλεσμα της αφομοίωσης των αμμωνιακών ιόντων, της έκχυσης πρωτονίων, και των επιδράσεων των όξινων ανιόντων στο μέσο, όπως των χλωριούχων, των θειικών ή των φωσφορικών (Yang & Liao 1998a). Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης επηρεάζεται σημαντικά από την τιμή του pH του μέσου. Για παράδειγμα, σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του μακρομύκητα *Sparassis crispa*, ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν μεγαλύτερος σε τιμή pH 5.0, ενώ σε τιμή pH 9.0 δεν καταναλώθηκε γλυκόζη, αλλά ούτε και σημειώθηκε ανάπτυξη (Kurosumi et al. 2006). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για άλλους μακρομύκητες, όπως στο *Antrodia cinnamomea* (Lin et al. 2006) και στο *G. lucidum* (Fang & Zhong 2002).

Οι Kim et al. (2003), μελέτησαν την επίδραση της μη ελεγχόμενης τιμής του pH στην ανάπτυξη, στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, στη μορφολογία του μυκηλίου, τη ρεολογία και τους ρυθμούς κατανάλωσης των υποστρωμάτων από το μακρομύκητα *Cordyceps militaris* C738 σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ανάδευσης όγκου 5L. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις

καλλιέργειες που η τιμή του pH ελεγχόταν στο 6.0, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών αυξήθηκε (7.3 g/L) σε σχέση με μη ελεγχόμενες συνθήκες (2.3 g/L). Από την άλλη πλευρά, υψηλή παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε όταν η τιμή του pH δεν ρυθμιζόταν. Βέβαια, ο χρόνος καλλιέργειας για κάθε μία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ήταν διαφορετική, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να γίνουν σοβαρές συγκρίσεις. Για τις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα (Yang & Liao 1998b), η διατήρηση της τιμής του pH (4.0) επηρέασε αρνητικά την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, και μάλιστα μειώθηκε κατά 30% μετά από 7 ημέρες. Παρόμοια αποτελέσματα ανέφεραν και οι Kim et al. (2002) που μάλιστα προσθέτουν ότι η άριστη τιμή του pH εξαρτάται από τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης. Σχετικά με το *G. lucidum*, οι Yang & Liao (1998a) σημείωσαν ότι η άριστη τιμή pH είναι χαμηλότερη (4.0) σε καθορισμένης χημικής σύστασης μέσο σε σχέση από την αντίστοιχη τιμή (5.0) σε σύνθετο μέσο (π.χ. μέσο με γλυκόζη και εκχύλισμα βύνης).

Οι Lee et al. (1999) επίσης έχουν αναφέρει ότι η διαφορετική μορφολογία των κυττάρων που παρατηρείται με τις διαφορετικές τιμές του pH είναι κρίσιμη για την παραγωγή βιομάζας. Σε μη ελεγχόμενες συνθήκες του pH (αρχική τιμή pH 6.0) η μορφολογία των κυττάρων αλλάζει (τα μυκηλιακά συσσωματώματα μετατρέπονται σε περισσότερο νηματοειδείς σχηματισμούς). Αντιθέτως, οι Fang & Zhong (2002), έχουν αναφέρει ότι η μορφολογία των κυττάρων (μυκηλιακά συσσωματώματα) του *G. lucidum* παραμένει η ίδια ανεξάρτητα από την τιμή του pH. Οι ίδιοι επίσης αναφέρουν ότι μειώνοντας την αρχική τιμή του pH από 6.5 σε 3.5, προοδευτικά παράγονται περισσότεροι εξω- και εσωπολυσακχαρίτες, ενώ στην τιμή pH 6.5 παρατηρείται η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και γανοδερικού οξέος.

β) Σύσταση του μέσου ανάπτυξης

Η αριστοποίηση της σύστασης του μέσου αποτελεί συχνά απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχημένη ανάπτυξη του μυκηλίου των μακρομυκήτων. Κάθε συστατικό στο σύστημα καλλιέργειας που χρησιμοποιείται έχει πολλαπλές και αλληλοσυνδεόμενες επιδράσεις και έτσι δεν θα πρέπει να γενικεύεται ο χαρακτηρισμός ενός «ιδανικού» μέσου ανάπτυξης για όλες τις περιπτώσεις. Επίσης, ορισμένα μέσα υποστηρίζουν την ανάπτυξη κάποιων ειδών καλύτερα σε σχέση με άλλα, που σημαίνει ότι καθένα πρέπει να μελετάται ξεχωριστά. Το μέσο ανάπτυξης που θα επιλεγεί οφείλει να προάγει τόσο την μυκηλιακή ανάπτυξη, όσο και την παραγωγή προϊόντων (Paragianni 2004).

Από έρευνες, έχουν προκύψει κάποιες γενικές αρχές σχετικά με την ανάπτυξη των μακρομυκήτων σε βυθισμένες καλλιέργειες (Eyal 1991) που παραθέτονται παρακάτω:

1. Υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων είναι τις περισσότερες φορές απαραίτητες για την επίτευξη υψηλής παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας (Fang & Zhong 2002, Kim et al. 2006, Tang & Zhong 2002).
2. Η αναλογία άνθρακα προς άζωτο (C:N) είναι σημαντική, από τη στιγμή που επηρεάζει την απόδοση σε μυκηλιακή βιομάζα, αλλά και την ικανότητα για παραγωγή μεταβολιτών, όπως και περιεχόμενο του μυκηλίου σε πρωτεΐνες και λίπος (Lee W.Y. et al. 2007, Rogalski et al. 2006).
3. Όταν χρησιμοποιούνται αγροτικά υπολείμματα ως υποστρώματα, απαιτούνται επιπλέον συμπληρώματα αζώτου και ανόργανων αλάτων (Hsieh & Yang 2004, Lee et al. 2003).
4. Η παραγωγή βιομάζας είναι γενικά χαμηλότερη όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά μέσα καθορισμένης χημικής σύστασης σε σχέση με τα σύνθετα μέσα θρεπτικών συστατικών (Fan et al. 2007, Lin & Yang 2006, Xiao et al. 2006).
5. Η σύσταση του μέσου επηρεάζει την παραγωγή μεταβολιτών, εξωκυτταρικών ενζύμων (Lin & Yang 2006, Revankar & Lele, 2007, Songulashvilli et al. 2007) και πολυσακχαριτών (Kim et al. 2005, 2006).
6. Το περιεχόμενο και η σύσταση σακχάρων οποιουδήποτε παραγόμενου πολυσακχαρίτη εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα (Kim et al. 2006, Lee W.Y. et al. 2007).
7. Η ικανότητα παραγωγής πρωτεΐνης και σύνθεσης αρωματικών ενώσεων εξαρτάται από τις χρησιμοποιούμενες πηγές άνθρακα και αζώτου, καθώς και από τη χρονική στιγμή συλλογής της μυκηλιακής βιομάζας (Humfeld & Sugihara 1949).
8. Το πρωτεϊνούχο περιεχόμενο του μυκηλίου μπορεί να ελεγχθεί από την συγκέντρωση και το είδος της πηγής αζώτου που χρησιμοποιείται στο μέσο ανάπτυξης (Cheung 1997, Eyal 1991).
9. Η επιπλέον προσθήκη μεταλλικών και ανόργανων αλάτων είναι δυνατόν ακόμα να επηρεάσει τη σύσταση των αμινοξέων (Mukhopadhyay et al. 2005) αλλά και να ενισχύσει την μυκηλιακή ανάπτυξη (Kim et al. 2006, Lin et al. 2006).
10. Η προσθήκη μη ιοντικών τασιενεργών, λιπαρών οξέων (Chang M.Y. et al. 2006, Park et al. 2002) και λιπιδίων, όπως εστέρων του ελαϊκού και λινελαϊκού οξέος, ενεργοποιεί τον ρυθμό μυκηλιακής ανάπτυξης.

γ) Πηγή Άνθρακα

Οι υδατάνθρακες αποτελούν κύρια συστατικά του κυτταρικού σκελετού και σημαντικά θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξη των μακρομυκήτων. Το προφίλ αφομοίωσης των πηγών άνθρακα είναι συγκεκριμένο για κάθε είδος (Hwang et al. 2004). Τα απλά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη αποτελούν τις πλέον χρησιμοποιούμενες πηγές άνθρακα. Στις σύνθετες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούνται στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων, περιλαμβάνονται το εκχύλισμα βύνης, η μελάσα, το άμυλο και το υπόλειμμα εκχύλισης ζαχαροκάλαμου. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση διαφορετικών πηγών άνθρακα, αλλά και των αρχικών συγκεντρώσεών τους στην παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών από τους μακρομύκητες (Wymelenberg et al. 2006, Parinutti et al. 2010).

Για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, οι δισακχαρίτες (σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη κ.τ.λ) έχουν αποδειχθεί καλύτερες πηγές σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες (Shih et al. 2006), γεγονός που πιθανόν να αποδίδεται στην ευκολία τους για πολυμερισμό (Fan et al. 2007). Μεταξύ των πηγών άνθρακα που εξετάστηκαν για το *Antrodia cinnamomea*, οι Lin et al. (2006), βρήκαν ότι η χρήση της σουκρόζης οδήγησε σε υψηλότερη παραγωγή βιομάζας. Συνήθως, υψηλότερες συγκεντρώσεις της χρησιμοποιούμενης πηγής άνθρακα (>35 g/L) οδηγούν σε υψηλότερη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, που σημαίνει ότι η αναλογία C:N είναι καθοριστική. Βέβαια, καλή μυκηλιακή ανάπτυξη δεν εξασφαλίζει πάντα υψηλή απόδοση σε μεταβολίτες (Shih et al. 2006). Οι Fang & Zhong (2002) παρατήρησαν μείωση στο μέσο ρυθμό ανάπτυξης του *Ganoderma lucidum*, όσο η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης αυξανόταν πάνω από 35 g/L, γεγονός που το απέδωσαν στην αυξανόμενη ωσμωτική πίεση του μέσου που δημιουργούταν. Οι Lee et al. (2007), βέβαια ανέφεραν ότι τόσο η μυκηλιακή παραγωγή, όσο και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *G. applanatum* αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, σε αντίθεση με το περιεχόμενο σε εσωπολυσακχαρίτες. Παρόλ' αυτά, με διαφορετικές αναλογίες C:N (όπου μόνο η συγκέντρωση της πηγής αζώτου άλλαξε), δεν επηρεαζόταν η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, σε αντίθεση με το περιεχόμενο σε εσωπολυσακχαρίτες που μειωνόταν σε αναλογία C:N πάνω από 43. Έτσι, φαίνεται ότι η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών επηρεάζεται περισσότερο από τις συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα σε σχέση με την παραγωγή των εσωπολυσακχαριτών που επηρεάζεται από τις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις της πηγής αζώτου στο μέσο. Οι Kim et al. (2006) ανέφεραν

ότι η άριστη συγκέντρωση για παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τους μακρομύκητες βρίσκεται μεταξύ 35 και 70 g/L.

Το μυκήλιο των μακρομυκήτων μπορούν να αναπτυχθούν σε διαφορετικό βαθμό, σε διάφορες αναλογίες C:N. Αυτές οι αναλογίες κυμαίνονται από 5:1 μέχρι 25:1. Συνήθως μικρές αναλογίες C:N (π.χ. 10:1 ή και μικρότερες) εξασφαλίζουν υψηλό περιεχόμενο σε μυκηλιακή πρωτεΐνη, ενώ αναλογίες μεγαλύτερες (π.χ. 50:1) ευνοούν τη συσσώρευση αλκοόλης, δευτερογενών μεταβολιτών- παράγωγα του οξικού, λιπιδίων ή εξωπολυσακχαριτών (Carlisle et al. 2001, Eyal 1991). Τέλος, πολλοί μακρομύκητες, κάτω από συνθήκες όπου η πηγή άνθρακα είναι περιορισμένη στο μέσο ανάπτυξης, απελευθερώνουν β-γλουκανάσες, που μπορεί να αποδομήσουν τις ήδη παραγόμενες β-γλουκάνες, με μια ταυτόχρονα φανερή μείωση του ιξώδους του μέσου (Rau 2004). Αυτές οι αλλαγές, υπό φυσιολογικές συνθήκες συμβαίνουν προς το τέλος της καλλιέργειας. Αν ο σκοπός είναι η μεγιστοποίηση της απόδοσης και η βελτιστοποίηση της ποιότητας των εξωπολυσακχαριτών, αυτά τα φαινόμενα πρέπει να αποφεύγονται, είτε εφαρμόζοντας κατάλληλες στρατηγικές για την εξασφάλιση των αναγκών στο μέσο ανάπτυξης, είτε προσδιορίζοντας τον κατάλληλο χρόνο για τη συλλογή της παραγόμενης βιομάζας.

δ) Πηγή Αζώτου

Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιούνται στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων περιλαμβάνουν τις ανόργανες (νιτρικά, νιτρώδη, αμμωνιακά άλατα) και τις οργανικές (καζεΐνη, πεπτόνη, αμινοξέα). Οι μολάσσειες από τεύτλα ή ζαχαρόκαλαμα, η σκόνη ορού γάλακτος, το αλεύρι σόγιας, το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, το εκχύλισμα ζύμης είναι δυνατόν επίσης να χρησιμοποιηθούν γιατί είναι πλούσια σε άζωτο. Το άζωτο παίζει καθοριστικό ρόλο για την παραγωγή μεταβολιτών και επίσης επηρεάζει τη μορφολογία των κυττάρων των μακρομυκήτων (Fazenda et al. 2008).

Οι Wasser et al. (2003) απέδειξαν ότι τόσο το είδος της πηγής αζώτου όσο και η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση, επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη αλλά και την παραγωγή πολυσακχαριτών από τον μακρομύκητα *Tremella mesenterica*. Οι οργανικές πηγές αζώτου οδηγούν σε υψηλή παραγωγή βιομάζας σε βυθισμένες καλλιέργειες του *Ganoderma lucidum* (Fang & Zhong 2002), αποδεικνύοντας ότι συγκεκριμένα αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από τις ανόργανες πηγές. Ομοίως, οι Elisashvilli et al. (2009) έκριναν τις οργανικές πηγές αζώτου καταλληλότερες για την παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών από τους

Βασιδιομύκητες, μεταξύ των οποίων τα είδη *Pleurotus dryinus*, *G. lucidum* και *Trametes versicolor*. Οι Zhou et al. (2009) απέδειξαν ότι η αλεσμένη σόγια από τις οργανικές πηγές αζώτου που δοκίμασαν σε βυθισμένη καλλιέργεια του μακρομύκητα *Grifola umbellata*, οδήγησε σε υψηλότερη μυκηλιακή παραγωγή και απόδοση πολυσακχαριτών.

Επίσης, πολλοί μακρομύκητες, και ειδικά οι μύκητες λευκής σήψης (π.χ. είδη του γένους *Ganoderma*) αποτελούν άριστους λιγνινολυτικούς οργανισμούς, γιατί συνθέτουν εξωκυτταρικά ενζυμικά συστήματα (Revankar & Lele 2007), που επιτρέπουν την αποδόμηση σύνθετων υποστρωμάτων (άμυλο, κυτταρίνη). Η παραγωγή λιγνινολυτικών ενζύμων φαίνεται να εξαρτάται από το υπόστρωμα, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστός ο λόγος που κάποια σύνθετα υποστρώματα επάγουν την παραγωγή τους, ενώ άλλα όχι (Songulashvilli et al. 2007). Αυτοί οι οργανισμοί γενικά ζουν σε υποστρώματα που είναι φτωχά στα περισσότερα θρεπτικά στοιχεία εκτός από τον άνθρακα (Carlisle et al. 2001). Το περιεχόμενο σε άζωτο είναι χαμηλό στο ξύλο. Επιπλέον, ένα μέρος του αζώτου εντοπίζεται στη λιγνίνη και σε κάποιες αρωματικές ενώσεις, και έτσι είναι διαθέσιμο μόνο στους οργανισμούς που μπορούν να μεταβολίσουν αυτά τα μόρια. Συνεπώς, η ανάπτυξη των περισσότερων μυκήτων στη φύση πραγματοποιείται σε σχεδόν έλλειψη αζώτου. Έτσι, κατανοώντας τους μηχανισμούς με τους οποίους αυτοί οι οργανισμοί ανταπεξέρχονται στις περιορισμένες συνθήκες αζώτου, είναι δυνατόν να αναπτυχθούν κατάλληλες στρατηγικές για τις βυθισμένες καλλιέργειες. Για παράδειγμα, σχετικά με το Βασιδιομύκητα *Schizophyllum commune*, ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο ανταπεξέρχεται στις συνθήκες έλλειψης αζώτου είναι η αυτόλυση γηραιότερων κυττάρων από πρωτεάσες και την επακόλουθη μεταφορά των μορίων που περιέχουν άζωτο (κυρίως αμινοξέα) στα αναπτυσσόμενα άκρα των κυττάρων (Guettler et al. 2003). Γενικώς, η συγκέντρωση αζώτου στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει την μυκηλιακή απόδοση αλλά και την παραγωγή μεταβολιτών με διαφορετικούς μηχανισμούς.

ε) Σύνθετα μέσα

Πολύπλοκες πηγές θρεπτικών στοιχείων (π.χ. γεωργικά απόβλητα) χρησιμοποιούνται ευρέως στις υψηλής κλίμακας βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων, αφού κοστίζουν λιγότερο σε σχέση με τα συνθετικά μέσα. Επιπροσθέτως, πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στα σύνθετα μέσα, είτε γιατί είναι παρόντες κάποιοι άγνωστοι παράμετροι ανάπτυξης και ορισμένα ιχνοστοιχεία είτε γιατί οι πηγές άνθρακα και αζώτου διασπώνται αργά, και έτσι οι συγκεντρώσεις των μεταβολιζόμενων προϊόντων τους παραμένουν πάντα χαμηλές. Τα υλικά

αποβλήτων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες των Βασιδιομυκήτων περιλαμβάνουν βοθρολύματα ελαιο-αλεσμάτων (Crognale et al. 2003), εκχυλίσματα πορτοκαλόφλουδων, απόβλητα χυμού αχλαδιών και μολάσες (Singh 1998), κελύφη ρυζιού, υπολείμματα βάμβακος και μίσχοι καλαμποκιού (Akinyele & Adetuyi 2005). Στις σύνθετες πηγές αζώτου που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνονται το εκχύλισμα ζύμης, το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, καθώς και λαχανοκομικά απόβλητα, όπως φύλλα κουνουπιδιού και απόβλητα ζυθοποιίας. Ακόμα, το τυρόγαλα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως υπόστρωμα ανάπτυξης του μυκηλίου του *G. lucidum* (Lee et al. 2004).

στ) Μέταλλα και ιόντα

Για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι απαραίτητα μέταλλα και ιόντα, τα οποία συνήθως διατίθενται ως άλατα (π.χ. θειικό μαγνήσιο και φωσφορικό κάλιο) σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($10^{-3}M$). Τα ιχνοστοιχεία (σίδηρο, χαλκός, μαγγάνιο, ψευδάργυρος και μολυβδένιο) ενεργούν ως συμπράγοντες των ενζύμων (Fazenda et al. 2008).

Οι Lin et al. (2006) ανέφεραν ότι τα μέταλλα έχουν μικρή ή μηδαμινή επίδραση στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *Antrodia cinnamomea*, αλλά η προσθήκη $CaCl_2$ οδήγησε στην αύξηση της μυκηλιακής ανάπτυξης. Το νάτριο είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει πολλές διεργασίες των μακρομυκήτων, μέσα στις οποίες περιλαμβάνεται η αναπνοή. Από την άλλη πλευρά, το μαγνήσιο και το κάλιο καθίστανται απαραίτητα για όλους τους μύκητες, από τη στιγμή που τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{+2}) αποτελούν συμπράγοντα σε πολλά ενζυμικά συστήματα, ενώ σταθεροποιούν και την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα ιόντα καλίου (K^{+1}) ελέγχουν το ωσμωτικό δυναμικό καθώς και την πίεση σπαργής των κυττάρων που είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση των υφών. Ορισμένα μεταλλικά ιόντα έχουν αποδειχτεί τοξικά σε συγκεκριμένα είδη μακρομυκήτων όπως για παράδειγμα το κοβάλτιο και μαγγάνιο για το *Psathyrella atroumbanata*, (Jonathan & Fasidi, 2001a). Αξιοσημείωτο είναι ότι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος κρίθηκαν απαραίτητα για την άριστη ανάπτυξή του. Και τα δύο αυτά μεταλλικά στοιχεία εμπλέκονται σε ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά ο ψευδάργυρος παίζει επιπλέον ουσιαστικό ρόλο στον ενδιάμεσο μεταβολισμό και στη σύνθεση του DNA και RNA (Griffin 1994).

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές, ότι οι απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία εξαρτώνται από το είδος του μακρομύκητα και το μέσο που χρησιμοποιείται. Μάλιστα, συχνά δεν κρίνεται

απαραίτητη η προσθήκη τέτοιων μικροθρεπτικών στοιχείων στο μέσο, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται στη διεργασία σύνθετα μέσα ανάπτυξης (Fazenda et al. 2008).

ζ) Βιταμίνες και Φυτομόνες

Παρόλο που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία εργασίες σχετικά με τη επίδραση της προσθήκης βιταμινών στις καλλιέργειες των μακρομυκήτων, οι περισσότερες είναι απλά περιγραφικές, χωρίς να δικαιολογούνται τα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι Jonathan & Fasidi (2001b, 2003) παρατήρησαν ότι οι βιταμίνες προάγουν την ανάπτυξη των *Psathyrella atroumbonata*, *Lentinus subnudus* και *Schizophyllum commune*. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι κάποιες βιταμίνες (ειδικά η βιοτίνη και η θειαμίνη) ενεργούν ως συμπαραγόντες των ενζύμων του ενδιάμεσου μεταβολισμού, όπως του μεταβολισμού των λιπαρών. Η πυριδοξίνη είχε την μεγαλύτερη επίδραση, αφού συνδέεται με τη σύνθεση της τρυπτοφάνης σε κάποια είδη μυκήτων. Σύμφωνα με τον Ayodele (2008), η θειαμίνη αποδείχτηκε καταλληλότερη βιταμίνη για την ανάπτυξη του εδώδιμου μακρομύκητα *P. atroumbonata* σε βυθισμένη καλλιέργεια, με το νικοτινικό οξύ και τη ριφοβλαβίνη να ακολουθεί. Στο *Antrodia cinnamomea* (Lin et al. 2006), μόνο η ριφοβλαβίνη από τις πέντε βιταμίνες που εξετάστηκαν (θειαμίνη, ριφοβλαβίνη, βιοτίνη, ασκορβικό και νικοτινικό οξύ) οδήγησε σε αύξηση της μυκηλιακής ανάπτυξης, αλλά καμία δεν έδειξε σημαντική διαφορά στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Οι Lin et al. (2006) θεώρησαν ότι η προσθήκη βιταμινών δεν ήταν απαραίτητη για το *A. cinnamomea*, επειδή ο ίδιος μακρομύκητας πιθανόν να τις συνθέτει.

Από τη στιγμή που πολλοί μακρομύκητες αναπτύσσουν πολύ στενές σχέσεις με τους φυτικούς οργανισμούς στη φύση, έχει εξεταστεί η επίδραση των φυτικών ορμονών σε ορισμένα είδη μακρομυκήτων σε βυθισμένες καλλιέργειες. Έχουν αναφερθεί τόσο θετικές όσο και ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη. Οι Mukhopadhyay et al. (2005) βρήκαν ότι συγκέντρωση 10 ppm γιββερελικού, ναφθαλενικού και 2, 4-διχλωροφαινοξυ-οξικού οξέος ενίσχυσαν τη μυκηλιακή ανάπτυξη του *L. edodes* και του *S. commune* σε σύνθετο μέσο. Ακόμα έχει αναφερθεί από τους ίδιους ερευνητές ότι οι φυτικές ορμόνες οδήγησαν σε καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο *Pleurotus sajor-caju*. Μεγαλύτερη αύξηση στην απόδοση βιομάζας (28%) έχει σημειωθεί με τη προσθήκη ινδολοξικού οξέος (IAA), το οποίο συχνά χρησιμοποιείται για την έναρξη της ριζικής ανάπτυξης στα φυτά. Ακόμα, οι Guo X. et al. (2009) παρατήρησαν ότι η μυκηλιακή βιομάζα και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών σε βυθισμένη καλλιέργεια του μακρομύκητα *Phellinus linteus*, με την προσθήκη ναφθαλινοξικού

οξέος (NAA) αυξήθηκε κατά 16% και 57% αντίστοιχα σε σχέση με δοκιμές χωρίς την προσθήκη της συγκεκριμένης φυτορμόνης. Μάλιστα, η μοριακή δομή των παραγόμενων εξωπολυσακχαριτών δεν άλλαξε με το NAA. Οι Tomita et al. (1984) έχουν αναφέρει ότι αυτή η οικογένεια φυτικών ορμονών μπορεί ακόμα να επηρεάσει την αύξηση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων των μυκήτων.

η) Ειδικά πρόσθετα

Τα λιπαρά οξέα, τα φυτικά έλαια και επιφανειοδραστικές ουσίες συχνά χρησιμοποιούνται ως αντιαφριστικά μέσα, αλλά είναι δυνατόν ακόμα να διεγείρουν την ανάπτυξη των μακρομυκήτων όπως και την παραγωγή μεταβολιτών σε βυθισμένες καλλιέργειες (Fukushima et al. 1991, Certic et al. 1997, Park et al. 2002). Η προσθήκη καρθαμελαίου, οδήγησε σε θεαματική αύξηση της μυκηλιακής απόδοσης από το *G. lucidum*, ενώ το ελαιόλαδο οδήγησε σε αυξημένες αποδόσεις πολυσακχαριτών (Chang et al. 2006). Οι Yang et al. (2000) και οι Park et al. (2002) πρότειναν μάλιστα, ότι αυτές οι θετικές επιδράσεις των ελαίων προκύπτουν από την ενσωμάτωση των λιπαρών οξέων τους στην κυτταρική μεμβράνη, καθιστώντας την περισσότερο διαπερατή και έτσι διευκολύνουν τόσο την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, όσο και την έκκριση μεταβολιτών. Επιπλέον οι Park et al. (2002), ανέφεραν, ότι 2 % (v/v) ελαϊκού και παλμιτικού οξέος διέγειραν σημαντικά την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *Cordyceps militaris*, ενώ το λινελαϊκό οξύ παρεμπόδιζε τόσο την μυκηλιακή ανάπτυξη όσο και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών. Τέλος, οι Hao et al. (2010) παρατήρησαν ότι το ελαϊκό οξύ, η βιταμίνη B1 και το Tween 80 επιδρούν θετικά στη μυκηλιακή παραγωγή και στην απόδοση σε εξωπολυσακχαρίτες από το μακρομύκητα *Schizophyllum commune* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες. Μάλιστα οι ίδιοι ερευνητές προσδιόρισαν τις άριστες συγκεντρώσεις για βέλτιστες αποδόσεις: ελαϊκό οξύ 0.1% (v/v), βιταμίνη B1 0.5mg/L και Tween 80 6mg/L.

θ) Παραπροϊόντα

Ο σχηματισμός παραπροϊόντων, είναι δυνατόν να επηρεάσει τη συνολική παραγωγικότητα μιας ζυμωτικής διεργασίας, όπως για παράδειγμα με το *Schizophyllum commune* που δεν παράγει μόνο εξωπολυσακχαρίτες αλλά και αιθανόλη (Rau 2004). Ενώ οι υψηλές τιμές του pH φαίνεται να ευνοούν την παραγωγή οξαλικού οξέος και γλουκανών, η απουσία οξυγόνου καταστέλλει τη δράση του ένζυμου για τη σύνθεση του οξαλικού οξέος.

Έτσι, κρίνεται απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράμετροι που εμπλέκονται στην παραγωγή τυχόν μη επιθυμητών παραπροϊόντων κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια, για να αποφεύγεται η σπατάλη της παρεχόμενης πηγής άνθρακα.

1.11.2.3 Βιολογικοί Παράγοντες

α) Εμβόλιο

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η συγκέντρωση και η μορφή του εμβολίου ασκεί σημαντική επίδραση στο προφίλ της ζύμωσης των μυκήτων. Η συγκέντρωση, ο τύπος (σπόρια, μυκήλιο), η ηλικία, και η ζωτικότητα του εμβολίου επηρεάζουν τη μορφολογία των κυττάρων, και ειδικά την παραγωγή και τον τύπο των μυκηλιακών συσσωματωμάτων (Gibbs et al. 2000). Σήμερα, είναι διαθέσιμες πολύ λίγες αναφορές σχετικά με την επίδραση του εμβολίου στις βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων (Fang et al. 2002, Tang et al. 2008).

Ενώ σε άλλους νηματοειδείς μύκητες, εύκολα παράγονται σπόρια σε καλλιέργεια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια, στους μακρομύκητες αυτό δεν είναι εφικτό, αφού στην καλλιέργεια αναπτύσσεται μόνο το μυκήλιο (Wagner et al. 2003). Έτσι, χρησιμοποιούνται εμβόλια μυκηλιακής μορφής, που βέβαια καθιστούν την τυποποίησή τους δύσκολη. Μια κοινή τεχνική που εφαρμόζεται στις καλλιέργειες των μακρομυκήτων (ειδικά στις αναδεδυόμενες καλλιέργειες σε φιάλες) είναι ο εμβολιασμός μικρών τεμαχιδίων μυκηλίου προσκολλημένου στο άγαρ ανάπτυξης τους, απευθείας μέσα στο υγρό της καλλιέργειας. Σε αυτήν την περίπτωση, το μυκήλιο πρέπει να προσαρμοστεί από το στερεό στο υγρό περιβάλλον, έχοντας έτσι στην καλλιέργεια μακρά φάση υστέρησης και χαμηλή πυκνότητα εμβολίου. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα, συνήθως το εμβόλιο προέρχεται από προηγούμενη υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του μακρομυκήτα. Βέβαια, θα πρέπει τόσο οι θρεπτικές όσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια και χρησιμοποιείται ως εμβόλιο για την ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα, να είναι κοινές με αυτές του βιοαντιδραστήρα για να αποφεύγονται μεγάλες φάσεις υστέρησης (Fazenda et al. 2008).

Ακόμα, προκειμένου η επίδραση του εμβολίου να είναι σταθερή, το μέγεθος των τεμαχιδίων μυκηλίου προσαρτημένων στο άγαρ πρέπει να είναι πάντα ορισμένο, και επίσης να αφαιρούνται από την ίδια ακτινωτή απόσταση από το κέντρο της αποικίας για να εξασφαλίζεται ότι όλα περιέχουν την ίδια ποσότητα μυκηλίου και βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. Επίσης, όταν χρησιμοποιείται εμβόλιο από υγρή καλλιέργεια, το μυκήλιο μπορεί

ασηπτικά να ομογενοποιείται, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των σημείων αύξησης (Stanbury et al. 1995). Ο κύριος στόχος χρησιμοποίησης τυποποιημένου εμβολίου είναι η επίτευξη αυξημένης ικανότητας αναπαραγωγής. Ένα ενεργό εμβόλιο μειώνει τη διάρκεια της φάσης υστέρησης στην επακόλουθη καλλιέργεια. Τέλος, είναι απαραίτητο ο εμβολιασμός να γίνει την σωστή χρονική στιγμή (όταν η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων είναι κατάλληλη).

Η συγκέντρωση εμβολίου είναι δυνατό να επηρεάσει την απόδοση σε μυκηλιακή βιομάζα καθώς και τη μορφολογία του μυκηλίου της καλλιέργειας. Η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου στη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. lucidum* έχει μελετηθεί από τους Yang & Liau (1998a). Όταν χρησιμοποίησαν ως εμβόλιο 7 ημερών υγρή καλλιέργεια σε αναδεδυόμενη κωνική φιάλη, προέκυψαν μικρότερα και περισσότερο ομοιόμορφα μυκηλιακά συσσωματώματα σε σχέση με την περίπτωση εμβολίου από σωλήνα με στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης. Η αύξηση της συγκέντρωσης του εμβολίου οδήγησε σε αυξημένες αποδόσεις σε μυκηλιακή βιομάζα αλλά και του αριθμού των σχηματιζόμενων μυκηλιακών συσσωματωμάτων, αν και μικρότερα σε μέγεθος. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν για τον ίδιο μακρομύκητα και από τους Fang & Zhong (2002). Οι Xiao et al. (2006) ανέφεραν σχετικά με μακρομύκητα *Cordyceps jiangxiensis*, ότι τόσο η απόδοση σε μυκηλιακή βιομάζα, όσο και η παραγωγή πολυσακχαριτών αποδείχτηκε υψηλότερη σε συγκέντρωση εμβολίου 4-6% (v/v). Οι Lin & Yang (2006) χρησιμοποίησαν ομογενοποιημένα μυκηλιακά αιωρήματα του *Agaricus blazei* ως εμβόλιο σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες σε φιάλες, και η υψηλότερη απόδοση σε μυκηλιακή βιομάζα επιτεύχθηκε για συγκέντρωση εμβολίου 11.4 mg/L. Στη μελέτη τους ακόμα τονίστηκε η εξαιρετική δυσκολία για τον ακριβή έλεγχο της πυκνότητας του εμβολίου στις διαφορετικές παρτίδες καλλιέργειας. Οι Gbolagade et al. (2006b) μελέτησαν την επίδραση της συγκέντρωσης του εμβολίου στην παραγωγή βιομάζας από το *Pleurotus florida* και μεταξύ των συγκεντρώσεων που εξέτασαν από 0.5-10% (v/v), υψηλότερη παραγωγή βιομάζας είχαν για συγκέντρωση εμβολίου 7% (v/v) και χαμηλότερη για 0.5% (v/v). Τέλος, οι Tang et al. (2008) μελέτησαν την επίδραση της συγκέντρωσης του εμβολίου στην παραγωγή βιομάζας και εξωπολυσακχαριτών από την τρούφα *Tuber sinense*, κινεζικής προέλευσης. Η συγκέντρωση εμβολίου που εξέτασαν κυμαινόταν από 160 έως 653 mg/L (επί ξηρού). Η μέγιστη απόδοση βιομάζας (15 g/L) ανακτήθηκε στην χαμηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση εμβολίου (160 mg/L), ενώ η μέγιστη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών επιτεύχθηκε στην υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (653 mg/L).

Αν και τα σχετικά δεδομένα που είναι σήμερα διαθέσιμα δεν είναι πάντα συγκρίσιμα, γενικά φαίνεται ότι υψηλότερα επίπεδα βιομάζας μάλλον ανακτώνται με εμβόλια από μυκηλιακά συσσωματώματα μικρού μεγέθους και μεγάλης ομοιομορφίας, που προστίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Fazenda et al. 2008). Καθίσταται δε σαφής η δυσκολία προετοιμασίας τυποποιημένων εμβολίων για τους μακρομύκητες σε σχέση με άλλους νηματοειδείς μύκητες (π.χ. *Penicillium* spp. και *Aspergillus* spp.).

β) Μορφολογία Μυκηλίου και Ρεολογία

Η μορφολογία του μυκηλίου και η ρεολογία του υγρού της καλλιέργειας επηρεάζουν το μεταβολισμό των μακρομυκήτων κατά τη διάρκεια της βυθισμένης τους καλλιέργειας (Pazouki & Panda 2000). Οι μεταβολές της μυκηλιακής μορφολογίας και οι επακόλουθες αλλαγές στην ρεολογία του υγρού της καλλιέργειας, επηρεάζουν πολλά φαινόμενα, όπως τη μεταφορά μάζας και θερμότητας, την κατανάλωση οξυγόνου και την ένταση των δυνάμεων διάτμησης. Δυστυχώς, η σχέση μεταξύ της μορφολογίας κατά την ανάπτυξη, και της παραγωγής μεταβολιτών από τους μακρομύκητες δεν είναι κατανοητή (Wagner et al. 2004). Η πολυκύτταρη δομή του μυκηλίου που επιτρέπει την μορφολογική και φυσιολογική ετερογένεια κατά μήκος των υφών στη διάρκεια της καλλιέργειας, καθιστά αδύνατο τον σχεδιασμό μαθηματικών μοντέλων για την πρόβλεψη της απόδοσης της καλλιέργειας και την υιοθέτηση στρατηγικών ελέγχου (Paragianni 2004).

Κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων είναι δυνατόν το αναπτυσσόμενο μυκήλιο να είναι νηματοειδές ή να σχηματίζει μυκηλιακά συσσωματώματα διαμέτρου 1-20mm (Sinha et al. 2001, Grimm et al. 2005). Συχνά, η μορφολογία του νηματοειδούς μυκηλίου χαρακτηρίζεται από το συνολικό μήκος της υφής και τον αριθμό των ενεργά αυξανόμενων απολήξεων. Η μορφολογία των μυκηλιακών συσσωματωμάτων χαρακτηρίζεται από το σχήμα (βαθμός κυκλικότητας), τη διάμετρο, την έκταση επιφάνειας, την τραχύτητα και την εμφάνιση τριχοειδών σχηματισμών. Η μορφή των μυκηλιακών συσσωματωμάτων πλεονεκτεί ως προς το ότι οδηγεί στη μείωση της θολερότητας του υγρού της καλλιέργειας, αλλά επίσης περιορίζει τη μεταφορά μάζας, με αποτέλεσμα την πρόκληση αυτόλυσης στο εσωτερικό των μεγάλων σε μέγεθος συσσωματωμάτων (El-Enhasy et al. 2006). Τις περισσότερες φορές πάντως, και ειδικά για την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, αποδεικνύεται καλύτερη η μορφή των μυκηλιακών συσσωματωμάτων (Hwang et al. 2004, Kim et al. 2003).

Οι Fang et al. (2002) εξέτασαν την επίδραση του μεγέθους των μυκηλιακών συσσωματωμάτων στη βιοσύνθεση των εσωπολυσακχαριτών και του γανοδερικού οξέος από το *G. lucidum*. Η περιεκτικότητα σε εσωπολυσακχαρίτες στα συσσωματώματα μειώθηκε με την αύξηση της διαμέτρου των συσσωματωμάτων. Αντιθέτως το περιεχόμενο σε γανοδερικό οξύ αυξήθηκε με το μέγεθος των μυκηλιακών συσσωματωμάτων. Έτσι, φαίνεται ότι το μέγεθος των συσσωματωμάτων έχει διαφορετικές επιδράσεις στο σχηματισμό πολυσακχαριτών και γανοδερικού οξέος στις καλλιέργειες του *G. lucidum*.

Μεταβολές στην κυτταρική μορφολογία και τη ρεολογία του υγρού κατά τη ζύμωση των μακρομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα, είναι δυνατό να συμβούν με τη διαφορετική επίδραση των μεταβλητών της καλλιέργειας (π.χ. η πυκνότητα του εμβολίου, η τιμή του pH της καλλιέργειας, η θερμοκρασία, και η σύσταση του μέσου ανάπτυξης) (Birhanli & Yesilada 2006, El-Enhasy et al. 2006, Park et al. 2007), οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τελικά και το μεταβολισμό των μακρομυκήτων (Hwang et al. 2008).

Στην περίπτωση του *G. lucidum*, σύμφωνα με τη μελέτη των Fang et al. (2002), αναφέρθηκε μείωση του μεγέθους των μυκηλιακών συσσωματωμάτων με την αύξηση της πυκνότητας του εμβολίου. Επίσης, κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια του ίδιου μακρομύκητα σε βιοαντιδραστήρα ανερχόμενου ρεύματος αέρα, χωρίς να γίνεται έλεγχος της τιμής του pH, οι Lee et al. (1999), ανέφεραν αλλαγή στην μυκηλιακή μορφολογία. Συγκεκριμένα, τα μυκηλιακά συσσωματώματα που είχαν αρχικά παρατηρηθεί μετατράπηκαν σε νηματοειδείς σχηματισμούς. Αντιθέτως, όταν η τιμή του pH διατηρήθηκε στο 6.0, καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, παρατηρήθηκαν μυκηλιακά συσσωματώματα.

Σύμφωνα με τους Kim & Song (2009) σε βυθισμένες καλλιέργειες του *P. ostreatus*, το μέγεθος των μυκηλιακών συσσωματωμάτων επηρεάστηκε από την πυκνότητα του εμβολίου, τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης, ωστόσο η ταχύτητα ανάδευσης αποδείχτηκε ο πιο σημαντικός παράγοντας ελέγχου. Σε χαμηλές ταχύτητες ανάδευσης (100 rpm) σχηματίζονταν μεγαλύτερου μεγέθους μυκηλιακά συσσωματώματα, σε αντίθεση με υψηλότερες ταχύτητες, όπου σχηματίζονταν πιο μικρά συσσωματώματα.

Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του υγρού καλλιέργειας των μακρομυκήτων επηρεάζονται σημαντικά από την απόδοση και τη μορφολογία της μυκηλιακής βιομάζας και την παραγωγή των εξωκυτταρικών βιοπολυμερών (Hwang et al. 2004). Υψηλή παραγωγή βιομάζας και εξωκυτταρικών πολυμερών οδηγούν σε αυξημένη θολερότητα του υγρού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Έτσι, καθίσταται δύσκολη η μεταφορά του οξυγόνου και των θρεπτικών

συστατικών έξω από τη ζώνη σάρωσης του αναδευτήρα. Σε σχέση με τη μορφολογία των κυττάρων, οι καλλιέργειες στις οποίες ο μακρομύκητας αναπτύσσεται με τη μορφή μυκηλιακών συσσωματωμάτων, τείνουν να χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο ιξώδες σε σχέση με αυτές που η ανάπτυξη γίνεται με τη μορφή διασκορπισμένων υφών στο υγρό της καλλιέργειας (Tang et al. 2007).

1.11.3 Αριστοποίηση των Παραμέτρων Καλλιέργειας των Μακρομυκήτων

Η αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας των μακρομυκήτων όταν επιχειρείται κατά παράγοντα κάθε φορά, αποτελεί μια δύσκολη, χρονοβόρα, και οικονομικά ασύμφορη προσέγγιση, ενώ ταυτόχρονα δεν δίνει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών. Για αυτό τον λόγο, σε θέματα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, εφαρμόζονται πειραματικοί σχεδιασμοί για την αριστοποίηση των διεργασιών, παρέχοντας αποτελεσματικές γνώσεις για συγκεκριμένους στόχους (π.χ. παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών), ενώ ταυτόχρονα γίνεται εφικτή η μελέτη διαφόρων παραγόντων (π.χ. πυκνότητα εμβολίου, τιμή pH, ρυθμοί αερισμού και ανάδευσης, σύσταση μέσου ανάπτυξης). Τα περισσότερα λογισμικά πακέτα που είναι σήμερα διαθέσιμα δίνουν επίσης εκ των προτέρων τον ακριβή αριθμό των πειραμάτων που απαιτούνται, και ακόμα εξετάζουν την επίδραση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων παραγόντων. Από τη στιγμή που τα δεδομένα αναλύονται με κάποιο διατυπωμένο μαθηματικό μοντέλο, είναι δυνατόν να προβλεφθεί με βεβαιότητα πώς μια αλλαγή στις μεταβλητές της διεργασίας μέσα σε ένα δεδομένο εύρος τιμών επηρεάζει τον πειραματικό σχεδιασμό (Esbensen 2002).

Πολλές αναφορές σχετικά με τις καλλιέργειες των μακρομυκήτων έχουν χρησιμοποιήσει τέτοιες προσεγγίσεις πειραματικών σχεδίων (Das et al. 2010, Feng et al. 2010, Pan et al. 2010, Zhao et al. 2009). Αυτά αποτελούν πολύτιμα και σχεδόν απαραίτητα εργαλεία για τη διαχείριση τέτοιων πολύπλοκων, εκτενών και με πολλές μεταβλητές διεργασιών.

1.12 Περιγραφή των Μελετούμενων Ειδών Μακρομυκήτων

1.12.1 *Pleurotus ostreatus*

Ο Βασιδιομύκητας *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm., γνωστός κοινά και ως το οστρακοειδές μανιτάρι (=oyster mushroom), είναι ένα παγκόσμια ιδιαίτερα διαδεδομένο εδώδιμο είδος, λόγω των οργανοληπτικών και με φαρμακολογικών ιδιοτήτων του, της ταχείας

ανάπτυξής του και των απλών συνθηκών καλλιέργειας που απαιτεί (Gregori et al. 2007). Η βιομηχανική παραγωγή των ειδών του γένους *Pleurotus* στοχεύει κυρίως στην αξιοποίησή τους στην ανθρώπινη διατροφή. Χρησιμοποιούνται ακόμα για τη βιομετατροπή γεωργικών, βιομηχανικών και λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων (Kuforiji et al. 2009, Mandeel et al. 2005, Sánchez et al. 2002), ως πηγή ενζύμων και άλλων χημικών ενώσεων για βιομηχανικές (Bettin et al. 2009, Hirano et al. 2000, Mansur et al. 2003, Maura et al. 2009, Membrillo et al. 2008, Liu, L. et al. 2009, Kurt et al. 2010) και φαρμακευτικές εφαρμογές (Hearst et al. 2009, Jayakumar et al. 2009, Synytsya et al. 2008b), αλλά και ως μέσα σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης, όπως απολύμανση του εδάφους, αποδόμηση βιομηχανικών χρωστικών και φαινολών, καθώς και στην επεξεργασία λυμάτων (Eichlerová et al., 2006, Olivieri et al., 2006). Στα ένζυμα με λιγνινολυτική δράση που παράγονται από είδη του γένους *Pleurotus* περιλαμβάνονται η υπεροξειδάση μαγγανίου (*MnP*), η υπεροξειδάση λιγνίνης (*LiP*) και λακκάσες (*Lac*), τα οποία εκκρίνονται στο μέσο ανάπτυξης κυρίως όταν οι πηγές άνθρακα και αζώτου βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα (Cohen et al. 2002).

1.12.1.1 Ταξινομικά και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Το είδος *P. ostreatus* ανήκει στο βασίλειο των Μυκήτων (Fungi), στο φύλο των Basidiomycota, στην κλάση Agaricomycetes, στην τάξη Agaricales, και στην οικογένεια *Pleurotaceae* (Kirk et al. 2008). Άλλα γνωστά είδη που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* είναι: *P. acerosus*, *P. australis* (Brown Oyster Mushroom), *P. citrinipileatus* (Golden Oyster Mushroom), *P. cornucopiae* (Branched Oyster Mushroom), *P. cystidiosus* (Abalone Mushroom), *P. djamor* (Pink Oyster Mushroom), *P. eryngii* (King Oyster Mushroom), *P. euosmus* (Tarragon Oyster Mushroom) *P. pulmonarius* (Phoenix Oyster Mushroom) και *P. tuber-regium* (King Tuber Mushroom).

Η λατινική ονομασία *P. ostreatus* αναφέρεται στο σχήμα του καρποσώματος του συγκεκριμένου είδους μακρομύκητα. Η λέξη *pleurotus* είναι ελληνικής ετοιμολογίας, προερχόμενη από το πλεύρο-(=πλάγιο) και ους-ωτός (=αυτί) και αναφέρεται στον πλάγιο τρόπο σύνδεσης του πύλου με το υπόστρωμα θυμίζοντας αυτί, ενώ η λέξη *ostreatus* (=όστρακο) αναφέρεται στο οστρακοειδές σχήμα του πύλου. Τα καρπόσωματά του, αναπτύσσονται προσκολλημένα στους νεκρούς κορμούς φυλλοβόλων κυρίως δέντρων αλλά και σε ζωντανά δέντρα, σε αλληπάλληλες στρώσεις. Ο πύλος έχει διάμετρο 3-20cm, είναι λείας επιφάνειας, και το χρώμα του μπορεί να είναι άσπρο, γκρι ή καστανό. Η σάρκα είναι λευκή, χυμώδης. Ο στύπος

συνήθως ελλείπει ή σπανιότερα είναι έκκεντρος ή πλάγιος, μικρού μήκους 1-4cm, με πάχος 0.5-2cm, και έχει χρώμα λευκό έως καστανό, με πυκνό χνούδι. Τα ελάσματα κατεβαίνουν ως τη βάση του στύπου και είναι πυκνά, λευκωπά. Τα βασιδιοσπόρια είναι λευκά, ελλειψοειδή και διαστάσεων 7-12 x3-4µm. Το μυκήλιο είναι λευκού χρώματος και γρήγορης ανάπτυξης (Roger 2006).

Το *P. ostreatus* είναι ένα σαπροτροφικό είδος που ευδοκμεί σε υποτροπικές και εύκρατες περιοχές (Hilber 1997). Συναντάται στην Ευρώπη, στη Ν. Αφρική και Ν. Αμερική. Αναπτύσσεται σε όλη την Ελλάδα, ορεινή και πεδινή και ειδικότερα σε κορμούς πλατύφυλλων δένδρων και ελάτων μεγάλης ηλικίας. Είναι από τα ελάχιστα γνωστά νηματωδοκτόνα είδη, αφού είναι γνωστό ότι το μυκήλιό του μπορεί να παγιδεύσει και να καταναλώσει νηματώδεις του εδάφους.

1.12.1.2 Ανάπτυξη σε Βυθισμένη Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια των ειδών του γένους *Pleurotus* σε κορμούς δέντρων αποτελεί μια πολύ εύκολη διαδικασία παραγωγής καρποσωμάτων, αν και δεν εφαρμόζεται στην πράξη γιατί δίνει χαμηλές αποδόσεις, απαιτεί μεγάλα χρονικά διαστήματα ανάπτυξης και ακόμα εξαρτάται από πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Pavlik 2005). Πριονίδι ξύλου πλατύφυλλων και υποστρώματα με βάση το άχυρο, ζιζάνια (π.χ. *Leonotis* sp., *Cassia sophera*, *Lantana camara* κ.α.), κατάλοιπα ζυθοποιίας, καθώς και διάφορα συμπληρώματα χρησιμοποιούνται πιο συχνά για εμπορική παραγωγή (Bonmati et al. 2004, Das & Mukherjee 2007, Gregori et al. 2008, Mandeel et al. 2005). Η καλλιέργεια λαμβάνει χώρο σε ράφια, μπουκάλια, σακιά ή δίσκους (Choi 2003).

Οι περισσότερες περιπτώσεις ΖΣΚ από είδη του γένους *Pleurotus* για παραγωγή βιομάζας είναι μικρής κλίμακας. Οι Nasim et al. (2001) παρατήρησαν ότι το θρεπτικό υπόστρωμα με εκχυλίσμα ζύμης έφερε ως αποτέλεσμα υψηλότερους ρυθμούς μυκηλιακής ανάπτυξης του *P. ostreatus* από ότι εκείνο με εκχύλισμα πατάτας και δεξτρώζης (PDA). Πρόσφατες έρευνες έχουν εστιάσει στην αξιοποίηση λιγνινοκυτταρινούχων οργανικών υλικών αποβλήτων από μακρομύκητες του γένους *Pleurotus*, είτε για την αποδόμηση λιγνίνης με σκοπό τη χρήση τους στη διατροφή ζώων, είτε για την παραγωγή ενζύμων (Gregori et al. 2007). Η φύση του υποστρώματος, όπως και η τεχνική καλλιέργειας επηρεάζουν την έκφραση των λιγνινοκυτταρινολυτικών ενζύμων των ειδών *Pleurotus*. Για παράδειγμα, οι Elisashvili et al.

(2008) βρήκαν ότι η ΖΣΚ του *P. ostreatus* σε υπόστρωμα από φύλλα δέντρων ευνόησε την παραγωγή λακκάσης (*Lac*) και της υπεροξειδάσης μαγγανίου (*MnP*).

Η ΖΥΚ του *Pleurotus* spp. χρησιμοποιείται σήμερα σε μεγάλη κλίμακα ειδικά για την παραγωγή βιομάζας με σκοπό την ανάκτηση βιοενεργών ενώσεων (Gregori et al. 2007). Οι Márquez-Rocha et al. (1999) μελέτησαν την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε βιοανιδραστήρα υγρής καλλιέργειας και αποκάλυψαν ότι η μεταβολή της γεωμετρίας του αναδευτήρα, της ταχύτητας ανάδευσης και του αερισμού άλλαξε τον ρυθμό ανάπτυξης και το μέγεθος των μυκηλιακών συσσωματωμάτων. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι μικρότερα μυκηλιακά συσσωματώματα οδηγούν σε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Ακόμα, σύμφωνα με τους Wu et al. (2003), η φάση υστέρησης για την ανάπτυξη του *P. tuber-regium* σε συνθήκες ΖΥΚ ήταν μικρότερη όταν χρησιμοποιήθηκε στο μέσο γλυκόζη και φρουκτόζη σε σχέση με άμυλο καλαμποκιού, και εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου σε σχέση με πεπτόνη. Η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας και βιοενεργών πολυσακχαριτών από τα είδη του γένους *Pleurotus* εξαρτάται από τις παράμετρους ανάπτυξης, το χρόνο καλλιέργειας και τη σύσταση του υλικού ανάπτυξης που χρησιμοποιείται (Rosado et al. 2003). Η υψηλότερη απόδοση πολυσακχαριτών από το *P. citrinopileatus* παρατηρήθηκε για την τιμή της αναλογίας C/N 40:1, αρχική τιμή pH=5.5 και θερμοκρασία ανάπτυξης 25°C (Wang et al. 2005). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη και την παραγωγή πολυσακχαριτών από το *P. ostreatus* σε συνθήκες ΖΥΚ είναι ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου ($K_L\alpha$). Έχουν παρατηρηθεί καλύτερες αποδόσεις πολυσακχαριτών με χαμηλό $K_L\alpha$ (Gern et al. 2008). Η ΖΥΚ είναι επίσης κατάλληλη και για την παραγωγή ενζύμων από μακρομύκητες του γένους *Pleurotus*. Οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στην αριστοποίηση του μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή υδρολυτικών και οξειδωτικών, λιγνινολυτικών, εξωκυτταρικών ενζύμων (Liu et al. 2009, Mikiashvilli et al. 2006, Stajić et al. 2006).

1.12.1.3 Διατροφική και Φαρμακευτική αξία

Τα είδη του γένους *Pleurotus* είναι παγκόσμια διαδεδομένα για τη διατροφική αξία τους, τις φαρμακευτικές ιδιότητές τους καθώς και για πολλές ωφέλιμες επιδράσεις που έχουν στον άνθρωπο (Gregori et al. 2007). Τα καρποσώματά τους είναι πλούσια σε διαιτητικές ίνες και ιδιαίτερα στις βιολογικά ενεργές β-D-γλουκάνες (Dundar et al. 2008, Regula & Siwulski 2007, Synhytsya et al. 2008a, 2008b). Ακόμα, έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, και απαραίτητα αμινοξέα όπως βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλανίνη,

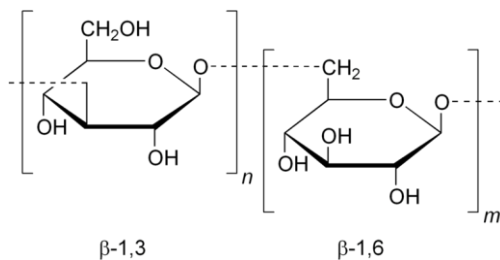
λυσίνη και τυροσίνη (del Toro et al. 2006, Dundar et al. 2008, Regula & Siwulski 2007). Επίσης, είναι πλούσια σε ακόρεστα (μονοακόρεστα και πολυακόρεστα) λιπαρά οξέα με το απαραίτητο διατροφικά λιπελαϊκό οξύ να επικρατεί, ενώ έχουν ακόμα ανιχνευθεί ελαϊκό, και αραχιδονικό οξύ, υψηλής διατροφικής αξίας (Yilmaz et al. 2005, Pednault et al. 2007). Σχετικά με το περιεχόμενο τους σε μέταλλα, έχει διαπιστωθεί ότι περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις K, Mg, Zn, Fe και Cu και χαμηλές σε Na και Ca (Çağlarirmak 2007, Matilla et al. 2001, Regula & Siwulski 2007). Τέλος, είναι πλούσια σε βιταμίνες και ειδικά σε νιασίνη, φολλικό οξύ, ασκορβικό, B₁, B₂ και ακόμα έχουν ανιχνευτεί και ίχνη D₂ και B₁₂ (Çağlarirmak 2007, Matilla et al. 2001).

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα είδη του γένους *Pleurotus* έχουν πολλές βιολογικές και θεραπευτικές δράσεις και συγκεκριμένα αντικαρκινική (Gern et al. 2008, Gu & Sivam 2006, Li et al. 2008, Sarangi et al. 2006, Tao et al. 2009, Tong et al. 2009, Wong et al. 2007, Zhang et al. 2006) ανοσοδιεγερτική (Maiti et al., 2008, Sarangi et al., 2006), αντιοξειδωτική (Dubost et al. 2007, Elmastas et al. 2007, Hu et al. 2006, Jayakumar et al. 2007, 2009, Lee Y.L. et al. 2007, Li L. et al. 2007, Liu X. et al. 2010, Tsai et al., 2009, Wong & Chye, 2009), αντιφλεγμονώδη (Jose et al. 2004, Sano et al. 2002, Smiderle et al. 2008a), υποχοληστεροναϊκή (Gunde-Cimerman & Plamenitas 2001, Hagiwara et al. 2005, Hossain et al. 2003), αντιυπεργλυκαιμική (Hu et al. 2006), αντιμικροβιακή (Ngai & Ng 2006, Periasamy 2005) και αντική δράση (Lv et al. 2009, Zhang et al. 2004). Αυτές οι δράσεις προέρχονται ή οφείλονται από τα εκχυλίσματα ή από ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το υγρό της καλλιέργειας, τα μυκήλια ή τα καρποσώματα, όπως για παράδειγμα πολυσακχαρίτες, σύμπλοκα πολυσακχαριτών με πρωτεΐνες, πρωτεογλουκάνες, πρωτεΐνες και DNA (Gregori et al. 2007). Βέβαια, οι βιοχημικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για τις ποικίλες βιολογικές δράσεις στα είδη του γένους *Pleurotus* παραμένουν ως επί τον πλείστον άγνωστοι.

1.12.1.4 Βιοενεργές Ενώσεις ειδών του γένους *Pleurotus*

1.12.1.4.1 Πολυσακχαρίτες

Η *πλευράνη*, μια αδιάλυτη στα αλκαλικά διαλύματα β-(1-3),(1-6)-D-γλουκάνη έχει απομονωθεί από τα καρποσώματα του *P. ostreatus* (Karáscongi & Kuniak 1994), της οποίας η δομή παρουσιάζεται στην Εικ. 1.7.



Εικόνα 1.7 Μοριακή δομή της πλευράνης

Η πλευράνη αποτελεί παράγοντα ανοσοθεραπείας, και οι ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες που εμφανίζει, προστατεύουν από την ανάπτυξη όγκων (Kogan 2000). Ακόμα, έχει αναφερθεί ανοσοκατασταλτική (Rovenský et al. 2009), αντιοξειδωτική (Bobek & Galbavy 2001), αντιφλεγμονώδης (Nosàl'ona et al. 2001) αλλά και προβιοτική δράση (Synytsya et al. 2008b). Μάλιστα, το καρβοξυμεθυλιωμένο παράγωγο της πλευράνης, έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί φαγοκυτταρική δράση (Paulik et al. 1996).

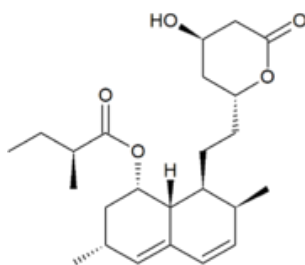
Ακόμα, από το είδος *P. pulmonarius* έχει απομονωθεί μια 3-Ο-μεθυλιωμένη μαννογαλακτάνη με αναλγητικές ιδιότητες (Smiderle et al. 2008b). Επίσης, υδατοδιαλυτές πρωτεογλουκάνες έχουν απομονωθεί από το μυκήλιο του *P. ostreatus* με αντικαρκινική δράση (Sarangi et al. 2006). Τέλος, από τα *P. eryngii* και *P. ostreatoroseus* έχουν πρόσφατα απομονωθεί 3-Ο-μεθυλιωμένες γαλακτάνες (Carbonero et al., 2008).

1.12.1.4.2 Τερπενοειδή και Στεροειδή

Η λοβαστατίνη που αποτελεί δραστικό μέσο θεραπείας της υπερχοληστεροναϊμίας, της αθηροσκλήρωσης και της ισχαιμίας έχει απομονωθεί από καρποσώματα του *P. ostreatus* (Gunde-Cimerman & Cimerman 1995, Gunde-Cimerman et al. 1993, Alarcon et al. 2003). Γενικά, οι στατίνες αποτελούν τάξη μορίων με δομή πολυκετιδίων, που παράγονται μέσω του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων. Η δραστηριότητά τους οφείλεται στην ανταγωνιστική παρεμπόδιση της αναγωγής του 3-υδροξυ-μεθυλ-γλουταρυλικού συνένζυμου Α (*HMG-CoA* αναγωγής), που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού του μεβαλονικού οξέος, το οποίο αποτελεί και την πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης (Manzoni et al. 1999).

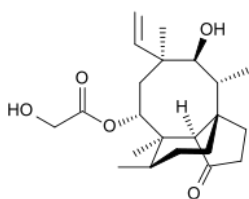
Οι φυσικές στατίνες περιέχουν έναν κοινό τμήμα πολυκετιδίου, ένα υδροξυ-εξαϋδρο δακτύλιο ναφθαλενίου, στο οποίο διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες συνδέονται στους C_8 και

C₆. Η λοβαστατίνη έχει ως πλευρικές αλυσίδες μια μεθυλ-βουτυρική ομάδα (C₈) και μια μεθυλομάδα (C₆) (Εικ.8).



Εικόνα 1.8 Χημική δομή της λοβαστατίνης

Η πλευρομουτιλίνη (Εικ. 1.9), μια ένωση με ισχυρή αντιβιοτική δράση εναντίον των Gram- θετικών βακτηρίων, έχει απομονωθεί σε κρυσταλλική μορφή από τις αρχές της δεκαετίας του '50 από τα είδη *P. mutilis* και *P. passeckerianus* σε υγρές καλλιέργειες (Kavanagh et al. 1951). Η πλευρομουτιλίνη ανήκει χημικά στα διτερπένια. Η πλευρομουτιλίνη και τα παράγωγά της αποτελούν αντιβακτηριακά φάρμακα που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση στα βακτήρια, δεσμεύοντας την πεπτιδυλ-τρανσφεράση της 50S υπομονάδας των ριβοσωμάτων (Lolk et al. 2008, Long 2006). Σήμερα, υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα για τη σύνθεση και ανάπτυξη νέων παραγώγων αυτού του βιοενεργού μεταβολίτη (Fu et al. 2010, Hirokawa et al. 2009, Zhang Y.Y. et al. 2009).



Εικόνα 1.9 Μοριακή δομή της πλευρομουτιλίνης

Από είδη του γένους *Pleurotus* έχουν ακόμα απομονωθεί πολλά στεροειδή μόρια. Για παράδειγμα από το *P. ostreatus* έχει απομονωθεί εργοστερόλη, και εργοστα-4,6,8,22-τετραεν-3-όνη (Chobot et al. 1997). Οι Zhan et al. (2003) απομόνωσαν από το ίδιο είδος ακόμα άλλα εννιά γνωστά στεροειδή μόρια: 1) 22E, 24R-εργοστα-7,22-διεν-3β,5α, 6β, 9α-τετραόλη, 2) 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσυλ-22E, 24R- εργοστα-7,22-διεν-5α, 6β-διόλη, 3) 22E, 24R-εργοστα-7, 22-διεν-3β, 5α,6β-τριόλη, 4) 22E, 24R-εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-ολ 3-O-β-D-γλυκοκυρανοζιτης, 5) 22E, 24R-εργοστα-7,22-διεν-3β-ολ 3-O-β-D-γλυκοκυρανοζιτης, 6) 22E, 24R-εργοστα-7,22-διεν-3β-όλη, 7)

22E, 24R-εργοστα-7, 22-διεν-3β,5α,6α-τριόλη, 8) υπεροξείδιο εργοστερόλης και 9) 22E, 24R-εργοστα-7, 22-διεν-3β,5α-διολ-6-όνη. Η ίδια ερευνητική ομάδα απομόνωσε και ένα νέο στεροειδές μόριο, την 3-O-β-D-γλυκοκυρανοζυλ-22E, 24R-εργοστα-7,22-διεν-5α,6β,9α-τριόλη. Οι Yaoita et al. (2002) απομόνωσαν δύο νέα στεροειδή μόρια από το *P. eryngii*: 1) 5α,9α-επιδιοξυ-8α,14α-εποξυ-(22E)-εργοστα-6,22-διεν-3β-όλη και 2) 3β,5α-διυδροξυεργοστ-7-εν-6-όνη, και ακόμα έξι άλλα γνωστά στεροειδή μόρια: 1) 6β-ακετοξυ-(22E)-εργοστα-7,22-διεν-3β,5α-διόλη, 2) 3β,5α-διυδροξυ-(22E)-εργοστα-7,22-διεν-6-όνη, 3) υπεροξείδιο εργοστερόλης, 4) 5α,9α-επιδιοξυ-(22E)-εργοστα-7,22-διεν-3β,6β-διόλη, 5) 5α,9α-επιδιοξυ-3β-υδροξυ-(22E)-εργοστα-7,22-διεν-6-όνη και 6) 5α,9α-τριυδροξυ-(22E)-εργοστα-7,22-διεν-6-όνη.

Οι Nieto και Chegwin (2008) απομόνωσαν από τα καρποσώματα του *P. sajor-cajé* δέκα στεροειδή μόρια και συγκεκριμένα εργοστα-2,5,7,9(11),22-πενταένιο, εργοστα-5,7,9(11),22-τετραεν-3β-όλη, υπεροξείδιο εργοστερόλης, εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη, εργοστα-7,22-διεν-3β-όλη, 19-νορεργοστα-5,7,9,22,τετραεν-3β-όλη (ή νεοργοστερόλη), εργοστα-7-εν-3β-όλη, εργοστα-3β-5α,6β-τριυδροξυ-7,22-διένιο (ή σερεβιστερόλη), εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη και εργοστα-4,6,15(16),22-τετραεν-3-όνη.

1.12.1.4.3 Αρωματικές και Πτητικές Ενώσεις

Από τα καρποσώματα του *P. ostreatus* έχουν απομονωθεί αρωματικές ενώσεις και συγκεκριμένα 3-οκτανόνη, 3-οκτανόλη, 1-οκτεν-3-όλη, βενζαλδεΐδη, 1-οκτανόλη και βενζοϊκό οξύ (Beltran-Garcia et al. 1997). Ακόμα, από τα καρποσώματα του *P. eryngii* έχουν απομονωθεί πτητικές ενώσεις και συγκεκριμένα 3-οκτανόνη, 1-οκτεν-3-όνη, 3-οκτανόλη, βενζαλδεΐδη, 1-οκτανόλη και 2-οκτεν-1-όλη, μονοφωσφορικό της 5' κυτοσίνης (Mau et al. 1998). Οι Venkateshwarlu et al. (1999) απομόνωσαν από τα καρποσώματα του *P. florida* n-οκτανόλη, 1-οκτεν-3-όλη, 3-οκτανόλη, 3-οκτανόνη, 2-οκτεν-1-όλη, n-πεντανάλη, n-πεντανόλη, 1-εξανόλη, βενζυλική αλκοόλη, 2-οκτενάλη και n-οκτανάλη. Επιπλέον, από τα μυκηλιακά συσσωματώματα του *P. florida* σε βυθισμένη καλλιέργεια έχουν απομονωθεί δεκαεννιά αρωματικές πτητικές ενώσεις από τις οποίες οι επικρατέστερες είναι ανισαλδεΐδη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθύλ-1-προπανόλη, βενζαλδεΐδη και 1-οκτεν-3-όνη (Venkateshwarlu et al. 2000).

1.12.1.4.4 Πρωτεΐνες και Λεκτίνες

Οι λεκτίνες είναι γλυκοπρωτεϊνικά μόρια που συναντώνται σε πολλούς οργανισμούς. Η λειτουργική τους σημασία είναι μεγάλη καθώς μέσω της αλληλεπιδράσεως τους με

υδατανθρακικά μόρια συμμετέχουν σε πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες (Sharon & Lis 1989). Λεκτίνες έχουν απομονωθεί από καρποσώματα μακρομυκήτων του γένους *Pleurotus*, όπως για παράδειγμα από το *P. ostreatus* (Wang et al. 2000), από το *P. eösus* (Mahajan et al. 2002) και από το *P. citrinopileatus* (Li et al. 2008) με αποδεδειγμένες αντικαρκινικές δράσεις. Ακόμα, μία λεκτίνη συνδεδεμένη με *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη έχει απομονωθεί από σκληρώτια του εδώδιμου *P. tuber-regium* με ισχυρή αιμοσυγκολλητική δράση σε εμπλουτισμένα με θρυψίνη ερυθροκύτταρα κουνελιών (Wang & Ng 2003).

Η ερυνγκεολυσίνη, έχει απομονωθεί από τα καρποσώματα του *P. eryngii* με δράση εναντίον των λευχαιμικών κυττάρων (Ngai & Ng 2006). Βιολογικά δραστικές αιμολυσίνες έχουν επίσης απομονωθεί από είδη του γένους *Pleurotus*, και συγκεκριμένα η οστρεολυσίνη από το *P. ostreatus* (Berne et al. 2002, Juntas et al. 2009, Sepčić et al. 2004) και η νεμπροντεολυσίνη από το *P. nebrodensis* (Lv et al. 2009). Μάλιστα, η οστρεολυσίνη έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κατά την ανάπτυξη των καρποσωμάτων του *P. ostreatus* και άρα ευθύνεται για το σχηματισμό των καρποσωμάτων (Berne et al. 2007).

1.12.1.4.5 Ριβονουκλεάσες, DNA

Ριβονουκλεάσες έχουν απομονωθεί από είδη του γένους *Pleurotus*, όπως για παράδειγμα από τα σκληρώτια του *P. tuber-regium* (Wang & Ng 2001), από τα καρποσώματα του *P. eryngii* (Ng & Wang 2004) και του *P. pulmonarius* (Ye & Ng 2002). Ακόμα, δύο ριβονουκλεάσες με αντινεοπλασματική δράση σε καρκινικά και λευχαιμικά κύτταρα έχουν απομονωθεί από καρποσώματα του *P. sajor-caju* και του *P. ostreatus* (Ngai & Ng 2004, Xia et al. 2005). Ακόμα DNA που έχει απομονωθεί από καρποσώματα του *P. ostreatus* φαίνεται να έχει αντικαρκινικές ιδιότητες (Shlyakhovenko et al. 2006).

1.12.2 *Ganoderma australe*

Ο Βασιδιομύκητας *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. [θεωρείται συνώνυμο του *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk, αν και υπάρχουν ακόμη πολλά ταξινομικά προβλήματα] είναι πολύ κοινός στην Ευρώπη, όλες τις εποχές του χρόνου. Προκαλεί λευκή σήψη σε φυλλοβόλα κυρίως δέντρα, όπου αναπτύσσεται πάνω σε κομμένους κορμούς δέντρων. Γενικά, τα καρποσώματα των ειδών του γένους *Ganoderma* έχουν σκληρή υφή που τα καθιστά μη εδώδιμα. Μολαταύτα, τα είδη του γένους *Ganoderma* θεωρούνται κορυφαία όσον αφορά την παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων, φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, για αυτό και το γένος αυτό έχει

χαρακτηριστεί “βιοεργοστάσιο θεραπευτικών ενώσεων” (Chang 1995, Paterson 2006). Αρκετά είδη της οικογένειας Ganodermataceae, μεταξύ των οποίων το είδος *G. lucidum* που έχει μελετηθεί ιδιαίτερα, θεωρούνται σήμερα οι επόμενοι υποψήφιοι παραγωγοί πολύτιμων φαρμάκων (Paterson 2006, Sanodiya et al. 2009). Αυτός είναι και ο λόγος που, αν και τα είδη του γένους *Ganoderma* δεν είναι εδώδιμα, πολλοί τύποι φαρμακευτικών προϊόντων (π.χ. συμπληρώματα διατροφής) που προέρχονται από αυτά, κυκλοφορούν ευρέως στην αγορά (Jong & Birmingham 1992). Παράλληλα, τα είδη του γένους *Ganoderma* παράγουν λιγνινολυτικά ένζυμα (*LiP*, *MnP*, *Lac*) και έτσι αξιοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπως της βιοπολυτοποίησης (Mendonça et al. 2008) και της βιοαποκατάστασης (Ellis et al. 2007, Matos et al. 2007, Rigas et al. 2007).

1.12.2.1 Ταξινομικά και Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Το είδος *G. australe* ανήκει στο βασίλειο των Μυκήτων, στο φύλο Basidiomycota, στην ομάδα Agaricomycetes, στην τάξη Polyporales και στην οικογένεια Ganodermataceae (Kirk et al. 2008). Στο γένος *Ganoderma*, περισσότερα από 250 είδη έχουν παγκοσμίως αναφερθεί: π.χ. *G. australe*, *G. applanatum*, *G. carnosum*, *G. boninense*, *G. cupreum*, *G. incrassatum*, *G. lipsiense*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. oerstedii*, *G. oregonense*, *G. pfeifferi*, *G. platense*, *G. resinaceum*, *G. sessile*, *G. sinense*, *G. tornatum*, *G. tsugae* και *G. weberianum*. Παρ’ όλα αυτά η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών δεδομένων ως προς τη βιοτεχνολογική αξιοποίηση αυτών ως φυσικά φάρμακα αναφέρεται στο είδος *G. lucidum*.

Η λέξη *ganoderma* είναι ελληνικής ετοιμολογίας και προέρχεται από το γάνο (=γυαλιστερό) και -δέρμα. Εξάλλου, χαρακτηριστικό γνώρισμα των ειδών που ανήκουν στην οικογένεια Ganodermataceae είναι ότι έχουν καρποσώματα με ξυλώδη ή δερματώδη υφή και στην κάτω επιφάνεια τους φέρουν πολλές μικρές οπές (πόρους) ως απολήξεις των σωλήνων. Το γένος *Ganoderma* διακρίνεται από άλλα παραπλήσια γένη γιατί παράγει καστανόχρωμα βασιδιοσπόρια με χαρακτηριστικά διπλά τοιχώματα. Τα καρπόσωματα του *G. australe* έχουν μεγάλο μέγεθος, άνω των 15cm, ο πύλος είναι ποικιλόμορφος, συνήθως οστρακόμορφος και δεν υπάρχει στύπος (Kirk et al. 2008). Τα είδη του γένους *Ganoderma* ευδοκούν σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας και απαντώνται σε υποτροπικές και τροπικές περιοχές.

1.12.2.2 Ανάπτυξη σε Βυθισμένη Καλλιέργεια

Παραδοσιακά, η καλλιέργεια των καρποσωμάτων των ειδών του γένους *Ganoderma* πραγματοποιούνταν σε σακιά ή μπουκάλια με πριονίδι ή και πάνω σε φυσικούς κορμούς δέντρων. Καθώς το γένος *Ganoderma* συνίσταται από μακρομύκητες που προκαλούν λευκή σήψη στο ξύλο, αποδομώντας τη λιγνίνη, ξυλώδες υλικό, όπως είναι το πριονίδι, αποτελεί ένα φυσικό υπόστρωμα ανάπτυξης (Boh et al. 2007). Στο παρελθόν, φυσικοί κορμοί δέντρων χρησιμοποιούνταν χωρίς αποστείρωση για την ανάπτυξη των ειδών *Ganoderma* στην Κίνα, που όμως απαιτούνταν μεγάλοι χρόνοι επώασης (2-3 χρόνια) για την ανάκτηση ώριμων καρποσωμάτων (Chen 2004). Αργότερα, η καλλιέργεια των περισσότερων ειδών *Ganoderma* πραγματοποιούνταν σε αποστειρωμένους κορμούς μικρότερου μήκους, κατά την οποία η επώαση διαρκούσε 4-5 μήνες, ενώ η συλλογή των ώριμων καρποσωμάτων μπορούσε να γίνει μέσα στον ίδιο χρόνο (Chen 2004, Sukarno 2004).

Η βιοτεχνολογική καλλιέργεια του μυκηλίου του γένους *Ganoderma* σε βιοαντιδραστήρες έχει καθιερωθεί τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιώντας τόσο στερεά υποστρώματα, όσο και υγρά μέσα ανάπτυξης. Οι Habjanic & Beronic (2002) προτείνει την ανάπτυξη του *G. lucidum* σε οριζόντιο αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα με στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης, που επιτρέπει το χειρισμό των συνθηκών ανάπτυξης για παραλαβή επαρκούς ποσότητας βιομάζας με σκοπό την ικανοποιητική απόδοση προϊόντων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Ο Chen (2002), αναφέρει ότι στη Β. Αμερική, τα μυκηλιακά σκευάσματα από *Ganoderma* για ανθρώπινη κατανάλωση παράγονται σε συνθήκες ΖΣΚ σε υποστρώματα με βάση κόκκους δημητριακών ή σόγια. Ακόμα, οι Song et al. (2007) προτείνουν τη χρήση τυρογάλακτος για την ανάπτυξη του *G. lucidum* σε συνθήκες ΖΣΚ.

Η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια για παραγωγή βιομάζας, αλλά και βιολογικά δραστικών ενώσεων από είδη του γένους *Ganoderma* κυριαρχεί στη σύγχρονη διεθνή βιβλιογραφία. Οι περισσότερες εργασίες εστιάζονται στην μελέτη των διαφορετικών παραμέτρων καλλιέργειας που επηρεάζουν την μυκηλιακή ανάπτυξη αλλά και την παραγωγή βιοενεργών μεταβολιτών και κυρίως πολυσακχαριτών και γανοδερικών οξέων (Beronic et al. 2003, Chang M.Y. et al. 2006, Fang et al. 2002, Fang & Zhong 2002, Hsieh et al. 2005, Hsieh et al. 2006, Lee et al. 2007, Pappinuti et al. 2010, Tang et al. 2009, Tang & Zhong 2003, Wagner et al. 2004, Xu et al. 2008, Yang F.C. et al. 2000, Yang et al. 2009, Zhang & Zhong, 2010, Zhu et al. 2010).

Σχετικά με τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας και βιοενεργών μεταβολιτών από είδη του *Ganoderma*, οι Chang et al. (2006), που μελέτησαν τις συνθήκες ανάπτυξης του *G. lucidum* σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες, παρατήρησαν ότι η καστανή ζάχαρη και το εκχύλισμα βύνης ευνόησαν την παραγωγή βιομάζας και πολυσακχαριτών σε σχέση με άλλες δοκιμαζόμενες πηγές άνθρακα, ενώ το εκχύλισμα ζύμης και το αποβουτυρωμένο γάλα αποδείχτηκαν οι καταλληλότερες πηγές αζώτου. Η προσθήκη έλαιου από κάρδαμο στο μέσο αύξησε σημαντικά την μυκηλιακή ανάπτυξη, ενώ η προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου ευνόησε τόσο την παραγωγή βιομάζας όσο και πολυσακχαριτών. Επιπλέον, οι Xu et al. (2008) ανέφεραν ότι η γλυκόζη και η πεπτόνη ευνόησαν την παραγωγή βιομάζας, ενώ το καλαμποκάλευρο και η σκόνη σόγιας ευνόησαν την παραγωγή γανοδερικών οξέων από το *G. lucidum* SB97 σε βυθισμένη καλλιέργεια.

Επιπροσθέτως, οι Hsieh et al. (2006) μελέτησαν την παραγωγή και το μοριακό βάρος των ανακτώμενων πολυσακχαριτών από το *G. lucidum* σε συνθήκες στέρησης διαφορετικών κάθε φορά θρεπτικών στοιχείων. Σε συνθήκες έλλειψης αζώτου η παραγωγή βιομάζας ήταν μειωμένη σε αντίθεση με την παραγωγή πολυσακχαριτών που αυξήθηκε σημαντικά. Σε συνθήκες έλλειψης άνθρακα, η παραγωγή πολυσακχαριτών μειώθηκε, ενώ υπό συνθήκες έλλειψης μαγνησίου και φωσφόρου μειώθηκε τόσο η παραγωγή πολυσακχαριτών όσο και βιομάζας. Μεγαλύτερη παραγωγή πολυσακχαριτών επιτεύχθηκε όταν εφαρμόστηκε επαρκής αερισμός τις πρώτες 5 ημέρες καλλιέργειας και μετά ακολούθησαν για άλλες 5 ημέρες συνθήκες στέρησης οξυγόνου. Μεγαλύτερου μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες ανακτήθηκαν σε συνθήκες έλλειψης μαγνησίου, όπως και κατά τη διάρκεια της έλλειψης οξυγόνου στη βιοδιεργασία.

Οι Lee et al. (2007) σχετικά με την παραγωγή υδατοδιαλυτών πολυσακχαριτών από το *G. applanatum* απέδειξαν ότι η μαλτόζη και η γλυκόζη είναι οι καταλληλότερες πηγές άνθρακα. Υψηλή απόδοση εξωπολυσακχαριτών επιτεύχθηκε σε μέτριες θερμοκρασίες ανάπτυξης (25°C), με υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και μικρή διάρκεια καλλιέργειας (8-12 ημέρες). Σε αντίθεση, οι εσωπολυσακχαρίτες απαιτούσαν χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης (10-15°C), μικρή τιμή της αναλογίας C/N και το λιγότερο 10 ημέρες διάρκεια καλλιέργειας. Μάλιστα, παρατήρησαν ότι όσο περισσότερο διαρκεί η καλλιέργεια τόσο το μοριακό βάρος των ανακτώμενων πολυσακχαριτών αυξάνεται. Οι ενδοπολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κατά τη φάση θνησιμότητας, ενώ οι εξωπολυσακχαρίτες παράγονται κατά τη φάση στασιμότητας της καλλιέργειας. Πρόσφατα, οι Parinutti et al. (2010) σημείωσαν ότι το εκχύλισμα ζύμης και η

γλυκόζη, αλλά και η ενεργότητα του νερού έχουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *G. lucidum*. Μάλιστα, η μεγαλύτερη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε σε μέσο με τιμή pH 3.5 και με υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης και γλυκόλης πολυαιθυλενίου (καταστολέας της ενεργότητας του νερού).

Η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων *Ganoderma* φαίνεται να είναι η πλέον οικονομικά συμφέρουσα και σύντομη εναλλακτική για την παραγωγή βιομάζας αλλά και βιοενεργών μεταβολιτών. Παρόλα αυτά, το ιξώδες του υγρού καλλιέργειας αυξάνεται με το χρόνο, ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης μυκηλιακής ανάπτυξης και συσσώρευσης εξωπολυσακχαριτών, που μεταβάλλουν όμως τις ρεολογικές ιδιότητες του ζυμού, προκαλώντας πολλά προβλήματα, μεταξύ των οποίων είναι η παροχή οξυγόνου στα κύτταρα (Boh et al. 2007). Οι Tang & Zhong (2003) ανέφεραν τις επιδράσεις της παροχής οξυγόνου σε βυθισμένη καλλιέργεια του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα και συμπέραναν ότι ο K_{La} σε εύρος τιμών 16.4-96.0 h^{-1} επιδρά σημαντικά στην κυτταρική ανάπτυξη και μορφολογία καθώς και στη βιοσύνθεση μεταβολιτών. Η αύξηση της αρχικής τιμής του συντελεστή K_{La} οδήγησε σε μεγαλύτερου μεγέθους μυκηλιακά συσσωματώματα και υψηλότερη παραγωγή γανοδερικών οξέων. Επιπλέον, οι Zhang & Zhong (2010) μελέτησαν την επίδραση της συγκέντρωσης οξυγόνου σε αέρια φάση (21-100%) στην παραγωγή γανοδερικών οξέων από το *G. lucidum* σε υγρές καλλιέργειες, και κατέληξαν ότι το άριστο επίπεδο συγκέντρωσης οξυγόνου για τη μέγιστη παραγωγή τους είναι 80%.

Οι Fang et al. (2002) διαπίστωσαν την επίδραση της συγκέντρωσης εμβολίου στην μυκηλιακή ανάπτυξη, μορφολογία και παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδερικών οξέων από το *G. lucidum* σε βυθισμένη καλλιέργεια. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση εμβολίου 330 mg DW/L. Η υψηλή χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση εμβολίου οδήγησε σε μικρό μέγεθος μυκηλιακών συσσωματωμάτων και υψηλή παραγωγή εξω- και εσωπολυσακχαριτών, ενώ υψηλή παραγωγή γανοδερικών οξέων και σχετικά μεγάλο μέγεθος μυκηλιακών συσσωματωμάτων επιτεύχθηκε όταν η συγκέντρωση εμβολίου ήταν χαμηλή. Οι Yang et al. (2009), παρατήρησαν ότι η μορφολογία των μυκηλιακών συσσωματωμάτων του *G. lucidum* BCRC36123 σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες επηρέασαν την παραγωγής βιομάζας. Η χρήση κατάλληλων πολυμερών πρόσθετων (άγαρ, αλγινικό νάτριο ή πολυακρυλαμίδιο) για τη μείωση του μεγέθους των μυκηλιακών συσσωματωμάτων, καθώς και η εφαρμογή διακοπτόμενης ανάδευσης, επέδρασαν θετικά στην παραγωγή βιομάζας.

Οι Fang & Zhong (2002) μελέτησαν την επίδραση της τιμής του pH στην παραγωγή γανοδερικών οξέων και πολυσακχαριτών από το *G.lucidum* σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες. Σε τιμή pH 6.5, επιτεύχθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας και γανοδερικών οξέων, ενώ μειώνοντας την τιμή pH από 6.5 μέχρι 3.5, αυξήθηκε σταδιακά η παραγωγή εξω- και ενδοπολυσακχαριτών. Ακόμα, οι Tang et al. (2009) παρατήρησαν αλλαγές στην παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών από το *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα, μεταβάλλοντας την τιμή του pH και της τάσης διαλυμένου οξυγόνου κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και μάλιστα με την εφαρμογή κατάλληλης στρατηγικής μεταβολής αυτών των δύο παραμέτρων ανάπτυξης, πέτυχαν σημαντική αύξηση της παραγωγής γανοδερικών οξέων. Επιπλέον, οι Wagner et al. (2004) διαπίστωσαν ότι οι μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές κατά την καλλιέργεια του *G. lucidum* επηρεάζουν την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και έτσι με τον κατάλληλο χειρισμό τους είναι δυνατός ο έλεγχος της παραγωγής τους, ενώ οι Tang & Zhong (2002) έχουν προτείνει άριστες συνθήκες ασυνεχούς ζύμωσης του *G. lucidum* για ταυτόχρονη παραγωγή γανοδερικών οξέων και πολυσακχαριτών.

Τέλος, πρόσφατα οι Zhu et al. (2010) εισήγαγαν μια νέα στρατηγική με σκοπό την αύξηση της παραγωγής γανοδερικών οξέων και βιομάζας από το *G. lucidum*. Η προσθήκη ιόντων χαλκού (Cu^{2+}), η χρήση τριών βαθμίδων φωτεινής ακτινοβολίας και η πολλαπλή τροφοδοσία (multi-pulse feeding) με πηγές άνθρακα και αζώτου αποτελούν τα συστατικά αυτής της στρατηγικής, που η εφαρμογή της προτείνεται και για υψηλής κλίμακας παραγωγή γανοδερικών οξέων.

1.12.2.3 Φαρμακευτική Αξία

Πολλά είδη του γένους *Ganoderma* παρουσιάζουν αξιόλογο φαρμακολογικό ενδιαφέρον, αφού παράγουν βιολογικά δραστικές ουσίες με θεραπευτικές δράσεις έναντι πολλών νοσημάτων. Τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες που παράγουν οι μακρομύκητες *Ganoderma* αποτελούν τα κύρια βιοενεργά συστατικά τους που ευθύνονται για τις ωφέλιμες δράσεις τους (Boh et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, οι μακρομύκητες *Ganoderma* επιδεικνύουν αντικαρκινική δράση (Hsu et al. 2008, Liu et al. 2007, Mueller et al. 2006, Sliva 2006, Yuen & Gohel 2005), ανοσορρυθμιστική (Kuo et al. 2006, Lin & Zhang 2004), αντιοξειδωτική (Chen et al. 2008, Jia et al. 2009, Joseph et al. 2009, Kim et al. 2008, Ping et al. 2009, Saltarelli et al. 2009, Wu & Wang 2009), ηπατοπροστατευτική (Shi et al. 2008, Wang et al. 2007), υπογλυκαιμική (Seto et al. 2009, Yang et al. 2007, Zhang & Lin 2004), υποχοληστεριναϊμική (Hajjaj et al. 2005),

αντιβακτηριακή (Liu D. et al. 2009, Moradali et al. 2006, Ofodile et al. 2005), δράση κατά της αγγειογένεσης (Hsu et al. 2009, Stanley et al. 2005), κατά των μυκήτων (Ofodile et al. 2005, Wang & Ng 2006), δράση κατά των ιών (Li Y. et al. 2006), κατά των βλαβών από ακτινοβολία (Pillai et al. 2008), καθώς και κατά των ουρολοιμώξεων (Nogushi et al. 2008).

1.12.2.4 Βιοενεργές Ενώσεις Ειδών του γένους *Ganoderma*

Πολυσακχαρίτες και τριτερπένια έχουν απομονωθεί και μελετηθεί από είδη *Ganoderma* και ιδιαίτερα από το *G. lucidum*, είδος ιδιαίτερου φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Παρόλα αυτά, έχουν ακόμα αναφερθεί στερόλες, λεκτίνες, αλκαλοειδή, νουκλεοζίτες, νουκλεοτίδια, πεπτιδογλυκάνες και πρωτεΐνες (Paterson et al. 2006).

1.12.2.4.1 Πολυσακχαρίτες

Οι κύριοι βιοενεργοί πολυσακχαρίτες που έχουν απομονωθεί από είδη του γένους *Ganoderma* είναι β-1,3 και β-1,6-D-γλουκάνες. Η επικρατέστερη δομή τους αποτελείται από β-1-3 D-γλουκοκυρονάνη με 1-15 μονάδες β-1-6 μονογλυκοζυλ-πλευρικών ομάδων (Mizuno 1991). Ακόμα, στους πολυσακχαρίτες με ισχυρή αντικαρκινική δράση που έχουν απομονωθεί από μακρομύκητες *Ganoderma* περιλαμβάνονται και κάποιες γλυκοπρωτεΐνες, ετεροπολυσακχαρίτες καθώς οι πεπτιδογλυκάνες γανοδεράνες A, B και C (Lindequist 1995, Peng et al. 2005, Tomoda et al. 1986, Wang et al. 2002). Οι πολυσακχαρίτες αναφέρεται ότι διαθέτουν αντικαρκινικές (Peng et al. 2005, Zhao et al. 2010, Wang et al., 2002) ανοσοδιεγερτικές (Beronici et al. 2003, Guo L. et al. 2009), υπογλυκαιμικές (Tomoda et al. 1986, Zhang & Lin 2004), αντιοξειδωτικές (Jia et al. 2009, Liu W. et al. 2010, Xu et al. 2009) και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες (Zhang G.L. et al. 2002). Από τους πολυσακχαρίτες, οι περισσότεροι προέρχονται από τα καρποσώματα (Bao et al. 2002, Chen et al. 2008, Zhang & Lin 2004) και από τη μυκηλιακή βιομάζα υγρών καλλιέργειών (Peng et al. 2005, Zhao & He 2003) και λίγοι μόνο από το υγρό της καλλιέργειας (Li Y.Q. et al. 2007).

Περισσότεροι από 200 πολυσακχαρίτες έχουν απομονωθεί από τα βασιδιοκάρπια, τα σπόρια, το μυκήλιο και το υγρό καλλιέργειας του *G. lucidum* (Zhu et al. 2007), στους οποίους περιλαμβάνονται και πολλοί βιοδραστικοί αδιάλυτοι σε υδατικό μέσο, όπως έτερο-β-γλουκάνες, ξυλο-β-γλουκάνη, ξυλομαννο-β-γλουκάνη και μαννο-β-γλουκάνη. Παρόλο που οι τυπικές β-γλουκάνες έχουν ένα μέσο μοριακό βάρος 1000kDa, το μοριακό βάρος των βιοενεργών πολυσακχαριτών του *G. lucidum* ποικίλει για παράδειγμα γανοδεράνη C (5.8kDa),

γανοδεράνη B (7.4Da), PL-1 (8.3Da), SP (10Da), γανοδεράνη A (23Da), GL-1 (40Da), GL-3 (63Da), PL-4 (200Da) και PSGL-I-1A (718Da) (Wang et al. 2002).

1.12.2.4.2 Τερπενοειδή και Στεροειδή

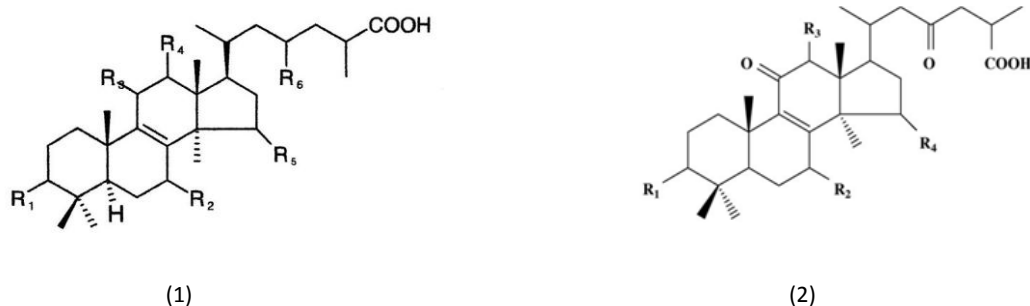
Οι περισσότερες αναφορές σχετικά με τις τερπενοειδείς ουσίες που έχουν απομονωθεί από τους μακρομύκητες *Ganoderma* σχετίζονται με πτητικά τριτερπενοειδή και ενώσεις τύπου στερόλης. Πάνω από 150 τριτερπενοειδή έχουν απομονωθεί από είδη του γένους *Ganoderma*, στα οποία περιλαμβάνονται τα γανοδερικά, λουσιντενικά, γανοδερμικά, γανοδερηνικά, γανολουσιντικά και αππλανοξιδικά οξέα, οι λουσιντόνες, οι γανοδεράλες και οι γανοδερόλες (Boh et al. 2007). Μόνο από το *G. lucidum* έχουν αναφερθεί σαράντα γανοδερικά οξέα, πέντε γανολουσιντικά οξέα, δεκατέσσερις γανοδεριόλες και δεκαπέντε λουσιντενικά οξέα (Paterson et al. 2006).

Οι στερόλες είναι συγγενή μόρια με τα τριτερπενοειδή και συναντώνται στα βασιδιοκάρπια και στο μυκήλιο των μακρομυκήτων *Ganoderma* και εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση (Zhao et al. 2005). Γενικά, έχουν περιγραφεί οι φυσικοχημικές ιδιότητες για πολλά τριτερπενοειδή (Kim & Kim 1999), μετά την ανακάλυψη των γανοδερικών οξέων A και B. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Nishitoba et al. (1986) πίστευαν ότι τα τριτερπένια είναι μόρια που παράγει ειδικά το είδος *G. lucidum*. Αργότερα όμως η παρουσία τους και σε άλλα είδη *Ganoderma*, όπως στα *G. colossum*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. concinna*, *G. tropicum* και *G. pfeifferi*, διέψευσε την αρχική διαπίστωση (Roberts 2004). Η απόμκνωση των τριτερπενίων από τα βασιδιοκάρπια είναι κοινή για τα περισσότερα είδη *Ganoderma*, ενώ και τα σπόρια μπορούν να περιέχουν τριτερπένια (Paterson 2006). Μάλιστα, τα σπόρια σε πολλές περιπτώσεις περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις γανοδερικών αλκοολών και οξέων από ότι τα βασιδιοκάρπια (Min et al. 1998). Επίσης, τα μυκήλια που προέρχονται από την υγρή καλλιέργεια των μακρομυκήτων *Ganoderma* έχει αναφερθεί ότι περιέχουν τριτερπενικά μόρια (Lin et al. 2003).

Τα γανοδερικά οξέα αποτελούν μια τάξη τριτερπενοειδών, παράγωγα του μορίου της λανοστερόλης που συναντώνται σε πολλά είδη του γένους *Ganoderma*. Δεκάδες γανοδερικών οξέων έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, από τα οποία τα πλέον μελετημένα είναι τα γανοδερικά οξέα A και B (Εικ. 1.10). Η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια για την παραγωγή αυτών των βιοενεργών μεταβολιτών από τους μακρομύκητες *Ganoderma* είναι πολλά υποσχόμενη για την βιοτεχνολογική παραγωγή και αξιοποίηση τους (Xu et al. 2010). Τα γανοδερικά οξέα

αποτελούν ενδιαφέροντα βιολογικά μόρια, αφού έχουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών εφαρμογών. Κάποια έχουν επιδείξει δράση κατά του ιού HIV-1 (γανοδερικά οξέα *A, B, H, C1*) (El-Mekkawy et al. 1998, Min et al. 1998), αντικαρκινική (Jiang et al. 2008, Tang et al., 2006,) αντι-ισταμινική (γανοδερικά οξέα *C₂, D*) (Kohda et al. 1985), υποχοληστεροναϊμική δράση (γανοδερικά οξέα *B, C₂*) (Komoda et al. 1989), καθώς και παρεμποδιστική δράση στο μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (γανοδερικά οξέα *K, F, S*) (Morigiwa et al. 1986). Οι Wang et al. (2006) έχουν προτείνει μια μεθοδολογία για την ποσοτικοποίηση μάλιστα έξι τριτερπενοειδών (γανοδερικά οξέα *C2, B, AM₁, K, H* και *D*) μέσω HPLC.

Οι Strigina et al. (1971) και οι Protiva et al. (1979) ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν τριτερπένια και στεροειδή από το *G. applanatum* και οι Kubota et al. (1982) απομόνωσαν πρώτοι δύο από τα πλέον μελετημένα τριτερπένια, τα γανοδερικά οξέα *A* και *B* από το *G. lucidum*. Οι Nishitoba et al. (1985a), απομόνωσαν από το *G. lucidum* τα τερπενοειδή λουσιντενικά οξέα *A* και *B*, καθώς και το γανοδερικό οξύ *C*. Ακόμα, απομόνωσαν τα *C27* τερπενοειδή λουσιντενικά οξέα *D* και *E*, καθώς και ένα πικρό *C24* τερπενοειδές τη λουσιντόνη *A*. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν τα *C30* και *C24* μη πικρά τερπενοειδή, το γανοδερικό οξύ *D* και τη λουσιντόνη *B* αντίστοιχα. Οι Nishitoba et al. (1985b), απομόνωσαν ακόμα από το *G. lucidum* τα τερπενοειδή γανοδερικό οξύ *J*, καθώς και το γανολουσιδικό οξύ *C*. Τα γανοδερικά οξέα *A, B, G* και *H*, που έχουν απομονωθεί από το *G. lucidum*, έχουν επιδείξει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (Koyama et al. 1997). Τα γανοδερικά οξέα *T, S* και *R* απομόνωθηκαν για πρώτη φορά από τους Hirotsani et al. (1986) από το μυκήλιο του *G. lucidum*. Οι Nishitoba et al. (1987) απομόνωσαν πρώτοι από το *G. lucidum* τα *C30* τριτερπενοειδή, τα γανοδερικά οξέα *Mg, Mh, Mj* και *Mk*, ενώ πρόσφατα οι Li et al. (2005a) απομόνωσαν το γανοδερικό οξύ *Sz* από το καρπόσωμα του *G. lucidum*, το οποίο είναι γεωμετρικά *Z* ισομερές με το γανοδερικό οξύ *S*. Οι Chen & Yu (1991) απομόνωσαν από τα σπόρια του *G. lucidum* πέντε τριτερπενοειδή από τα οποία το 3,7,11,12,15,23-εξαοξο-5α-λανοστα-8-εν-26-οϊκό οξύ είναι γνωστό ως γανοσποροερίκό οξύ *A* (Εικ. 10, 1,i) και αποτελεί φυσικό προϊόν.



Εικόνα 1.10 Μοριακή δομή (1) γανοδερικών οξέων (a) *A* ($R_1=R_3=R_6=O, R_2=R_5=\beta\text{-OH}, R_4=H$), (b) *B* ($R_1=R_3=R_5=R_6=O, R_2=\beta\text{-OH}, R_4=H$), (c) *C* ($R_1=R_3=R_5=R_6=O, R_2=\beta\text{-OH}, R_4=H$), (d) *D* ($R_1=R_3=R_5=R_6=O, R_2=R_4=\beta\text{-OH}$), (e) *F* ($R_1=R_2=R_3=R_5=R_6=O, R_4=\beta\text{-OH}$), (f) *G* ($R_1=R_2=R_4=\beta\text{-OH}, R_3=R_5=R_6=O$), (g) *H* ($R_1=\beta\text{-OH}, R_2=R_3=R_5=R_6=O, R_4=\beta\text{-OAc}$), (h) *Z* ($R_1=\beta\text{-OH}, R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$) και (i) γανοσπορικού οξέος *A* ($R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=O$) και (2) γανοδερικών οξέων (a) *AM1* ($R_1=\beta\text{-OH}, R_2=R_4=O, R_3=H$) και (b) *K* ($R_1=R_2=\beta\text{-OH}, R_3=\beta\text{-OAc}, R_4=O$)

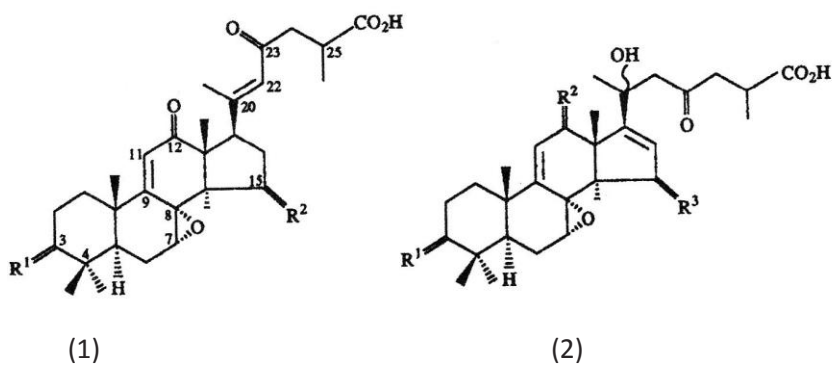
Οι Hajjaj et al. (2005), απομόνωσαν από το *G. lucidum* 26-οξυγενοστερόλες που παρεμοδίζουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, τη γανοδερόλη *A* (24E-3-οξο-5α-λανοστα-7,9 (11),24-τριεν-26-όλη), τη γανοδερόλη *B* (24E-3-ολ-5α-λανοστα-7,9 (11),24-τριεν-26-όλη), τη γανοδεράλη *A* (24E-3-οξο-5α-λανοστα-7,9 (11),24-τριεν-26-άλη) και το γανοδερικό οξύ *Y* (24E-3-ολ-5α-λανοστα-7,9 (11),24-τριεν-26-οϊκό οξύ). Πολλά τριτερπένια από το *G. lucidum*, όπως η γανοδεριόλη *F*, η γανοδερμανοτριόλη, και το γανοδερικό οξύ *B* έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά ως προς τη δράση τους εναντίον του ιού HIV-1 (El-Mekrawy et al. 1998). Οι Min et al. (2001) απομόνωσαν από τα σπόρια του *G. lucidum* τα τριτερπενοειδή γανοδεριόλη *F*, γανοδερμανονδιόλη, και γανοδερμανοτριόλη. Οι Ziegenbein et al. (2006) απομόνωσαν από τα καρποσώματα του *G. lucidum* τρεις εστέρες τριτερπενοειδών, συγκεκριμένα το εργοστα-7,22-διεν-3β-υλ παλμιτικό, το εργοστα-7,22-διεν-3β-υλ λινελαϊκό, καθώς και ένα νέο στεροειδή εστέρα το εργοστα-7,22-διεν-3β-υλ πενταδεκανοϊκό.

Οι Ko et al. (2008) μελέτησαν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τριτερπενοειδών και στεροειδών από τα είδη *G. lucidum* και *G. tsugae*. Συγκεκριμένα, απομόνωσαν και μελέτησαν την εργοστα-7,22-διεν-3β-όλη, το εργοστα-7,22-διεν-3β-υλ παλμιτικό, την εργοστα-7,22-διεν-3-όνη, την εργοστα-7,22-διεν-2β,3α,9α-τριόλη, την 5α,8α-επιδιοξυ-εργοστα-6,22-διεν-3β-όλη, τη γανοδεράλη *A*, τη γανοδεράλη *B*, τη γανοδερική αλδεΐδη *A*, το τσουγγαρικό οξύ *A*, το 3-οξο-5α-λανοστα-8,24-διεν-21-οϊκό οξύ, το 3α-ακετοξυ-5α-λανοστα-8,24-διεν-21-οϊκού οξέος εστέρα β-d-γλυκοζίτη, και το τσουγγαρικό οξύ *B*.

Για τα τριτερπένια απλανοξιδικά οξέα *A* [(20E)-15α-υδροξυ-7α,8α-εποξυ-3,11,23-τριοξο-5α-λανοστα-9(11),20-διεν-26-οϊκό οξύ], *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* και *H* (Εικ. 1.11), που έχουν πρώτη φορά απομονωθεί από το *G. applanatum*, έχει αναφερθεί κυτταροστατική δράση

(Chairul et al. 1991, Chairul & Hayashi 1994). Στεροειδή μόρια, όπως η 5 α -εργοστα-7,22-διεν-3 β -όλη, ή η 5,8-επιδιοξυ-5 α ,8 α -εργοστα-6,22-διεν-3 β όλη, έχουν απομονωθεί από το *G. applanatum* και μάλιστα έχει αναφερθεί η δραστικότητα τους εναντίον πολλών Gram θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών (Smania et al. 1999). Από το ίδιο είδος, οι Shim et al. (2004) απομόνωσαν τέσσερα τριτερπένια και συγκεκριμένα το 3 β ,7 β ,20,23 ξ -τετραϋδροξυ-11,15-διοξολανοστα-8-εν-26-οϊκό οξύ, το 7 β ,20,23 ξ -τριυδροξυ-3,11,15-τριοξολανοστα-8-εν-26-οϊκό οξύ, το 7 β ,23 ξ -διυδροξυ-3,11,15-τριοξολανοστα-8,20E(22)-διεν-26-οϊκό οξύ και τον μεθυλεστέρα του 7 β -υδροξυ-3,11,15,23-τετραοξολανοστα-8,20E(22)-διεν-26-οϊκού οξέος. Το απλανοξιδικό οξύ, που έχει απομονωθεί από το *G. annulare* (Smania et al. 2003), επέδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.

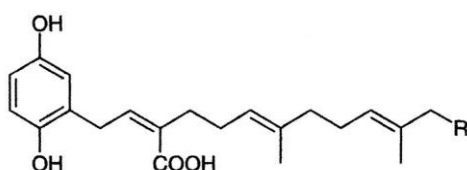
Από το *G. concinnum* έχουν επίσης απομονωθεί τριτερπένια, όπως η 5 α -λανοστα-7,9(11),24-τριεν-15 α -26-διυδροξυ-3-όνη (Gonzalez et al. 2002). Η γανοδεριόλη *F* που έχει απομονωθεί από το *G. amboinense* έχει βρεθεί ότι επάγει γηρασμό σε κύτταρα με ηπάτωμα HepG2 (Chang Y.M. et al. 2006). Ένα από τα πλέον δραστικά με αντικαρκινικές ιδιότητες τριτερπένιο είναι το γανοδερικό οξύ *X* (3 α -υδροξυ-15 α -ακετοξυ-λανοστα-7,9(11),24-τριεν-26-οϊκό οξύ) που έχει απομονωθεί επίσης από το *G. amboinense* (Li et al. 2005b). Από το *G. colossum*, οι Kleinwächter et al. (2001) απομόνωσαν επτά τριτερπενοειδή, κολοσσολακτόνες με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.



Εικόνα 1.11 Μοριακή δομή των απλανοξιδικών οξέων (*A-H*) που απομονώθηκαν από το το *G. applanatum* (Chairul et al. 1991): (1) *A* ($R_1=O, R_2=\alpha-OH$), *B* ($R_1=\beta-OH, R_2=O$), *E* ($R_1=O, R_2= \beta-OH$), *F* ($R_1=R_2=O$) και (2) *C* ($R_1=R_2=R_3=O$), *D* ($R_1=\beta-OH, R_2=R_3=O$), *G* ($R_1=R_2=O, R_3= \beta-OH$), *H* ($R_1=\beta-OH, R_2=\alpha-OH, R_3=O$)

Οι Niedermeyer et al. (2005) απομόνωσαν τέσσερα στερολικά μόρια και δέκα τριτερπένια από τα καρποσώματα του *G. pfeifferi*, στις οποίες περιλαμβάνονται τρία νέα τριτερπένια: η λουσιαλδεϋδη *D* (3,7,11-τριοξο-5 α -λανοστα-8,24-διεν-26-άλη), η γανοδερόνη *A*

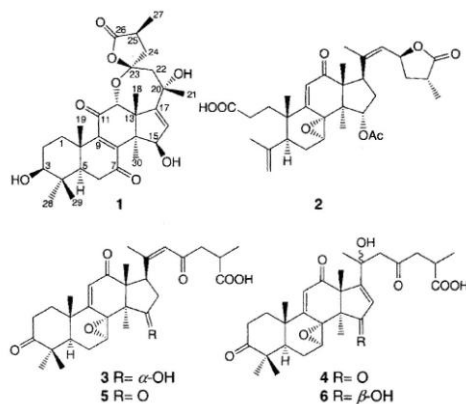
(5α-λανοστα-8,24-διεν-26-υδροξυ-3,7-διόνη), και η γανοδερόνη C (5α-λανοστα-8-εν-24,25-εποξυ-26-υδροξυ-3,7-διόνη). Ακόμα, η γανοδερμαδιόλη, η λουσινταδιόλη, και το αππλανοξιδικό οξύ G έχουν απομονωθεί από το *G. pfeifferi* και είναι δραστικά εναντίον του ιού της γρίπης τύπου A (Mothana et al. 2003). Ακόμα, από το *G. pfeifferi* έχουν απομονωθεί, από την ομάδα των σεσκιτερπενοειδών μορίων, κάποιες υδροκινόνες με αντιμικροβιακή δράση, γνωστές ως γανομυκίνες (Εικ. 1.12) (Mothana et al. 2000). Οι Cole et al. (2003) έχουν απομονώσει από το *G. mastoporium* τέσσερα σεσκιτερπένια και συγκεκριμένα τη γανομαστενόλη, τη γανομαστενόλη B, C και D.



Εικόνα 1.12 Μοριακή δομή (a) γανομυκίνης A (R=OH) και (b) γανομυκίνης B (R=H) που απομονώθηκαν από το *G. pfeifferi* (Mothana et al. 2000)

Οι Gerber et al. (2000) απομόνωσαν από το *G. australe* εργοστερόλες και τριτερπένια και συγκεκριμένα την 5α-εργοστα-7-εν-3β-όλη, την 5α-εργοστα-7,22-διεν-3β-όλη, την 5,8-επιδιοξυ-5α,8α-εργοστα-6,22-διεν-3β-όλη καθώς και τα αππλανοξιδικά οξέα A, C, F και G. Οι Leon et al. (2003), από το ίδιο είδος απομόνωσαν την εργοστερόλη, την 5,6-δεϋδροεργοστερόλη, το υπεροξείδιο εργοστερόλης, τα αππλανοξιδικά οξέα A, C, F και G, καθώς ακόμα δύο νέα τριτερπενοειδή, την αυστραλακτόνη [(23S,25S)-12α,23-εποξυ-3β,15β, 20α-τριυδροξυ-7,11-διοξο-5α-λανοστα-8,16-διεν-23,26-ολίδιο / αυστραλικό οξύ [(20Z,23R,25R)-15α-ακετυλ-7α,8α-εποξυ-12-οξο-3,4-σεκο-5α-λανοστα-4(28),9,20(22)-τριεν 23,26-ολιντ-3-οϊκό οξύ] με κυτταρικές ιδιότητες (Εικ.1.13). Ακόμα, οι Smania et al. (2007) απομόνωσαν το μεθυλ-αυστραλικό οξύ από το ίδιο είδος για το οποίο ανέφεραν αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Κυτταροτοξικές δράσεις εναντίον καρκινικών κυττάρων επιδεικνύουν οι λουσιαλδεΐδες A, B και C, τρεις τριτερπενικές αλδεΐδες τύπου λανοστερόλης από τα καρποσώματα του *G. lucidum* (Gao et al. 2002), τα γανοδερικά οξέα Z, Y, X, W, V, T από το *G. lucidum* (Toth et al. 1983 a,b) καθώς και το αυστραλικό οξύ που απομονώθηκε από τα καρποσώματα του *G. australe* (Leon et al. 2003).



Εικόνα 1.13 Μοριακή δομή (1) αυστρολακτόνης, (2) αυστραλικού οξέος και απλανοξιδικών οξέων (3) A, (4) C, (5) F και (6) G (Gerber et al. 2000) που απομονώθηκαν από το *G. australe*

1.12.2.4.3 Πρωτεΐνες και Λεκτίνες

Βιονεργές πρωτεΐνες έχουν απομονωθεί από πολλούς μακρομύκητες *Ganoderma*, όπως για παράδειγμα μια ανοσοτροποποιητική πρωτεΐνη, γνωστή ως *Ling Zhi-8* (LZ-8), που έχει απομονωθεί από το μυκήλιο του *G. lucidum*. Πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο που συνίσταται από 110 αμινοξέα με ακετυλιωμένο αμινοτελικό άκρο και μοριακή μάζα 12kDa (Tanaka et al. 1989). Οι Ngai & Ng (2004) απομόνωσαν από το *G. carpense* μία λεκτίνη με μιτογονική και αντιπολλαπλασιαστική δράση σε λευχαιμικά και με ηπάτωμα κύτταρα *in vitro*. Επίσης, μια νέα εξαμερής λεκτίνη 114kDa απομονώθηκε πρόσφατα από τα καρποσώματα του *G. lucidum* (Thakur, et al. 2007). Οι Wang & Ng (2006), απομόνωσαν από το *G. lucidum* μία πρωτεΐνη 15kDa, γνωστή ως γανοδερίνη, με δράση εναντίον των μυκήτων.

1.12.2.4.4 Νουκλεοζίτες και Νουκλεοτίδια

Από το μυκήλιο του είδους *G. carpense* έχουν απομονωθεί τα μόρια της αδενίνης, αδενοσίνης, ουρακίλης, και ουριδίνης (Huie & Di 2004). Μάλιστα για τους νουκλεοζίτες ουριδίνη και ουρακίλη έχει βρεθεί ότι μειώνουν το επίπεδο αλδολάσης στον ορό αίματος ποντικών που υποφέρουν από πειραματική μυοτονία, ενώ η αδενοσίνη παρεμποδίζει την συσσώρευση αιμοπετάλιων (Paterson 2006). Οι Gao et al. (2007), απομόνωσαν έξι νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, κυτιδίνη, γουανοσίνη, ινοσίνη, θυμιδίνη και ουριδίνη) και πέντε νουκλεοβάσεις (αδενίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, θυμίνη, και ουρακίλη) από τα είδη *G. lucidum* και *G. sinense*.

1.12.2.4.5 Αλκαλοειδή, Βιταμίνες, Αρωματικές Ενώσεις και Λιπαρά οξέα

Οι Tasaka et al. (1988) έχουν απομονώσει ελαϊκό οξύ από το υγρό καλλιέργειας του *G. lucidum*. Ακόμα, τα αλκαλοειδή χολίνη και μεταΐνη έχουν απομονωθεί από σπόρια του *G. lucidum* (Paterson et al. 2006). Επιπλέον, δύο αλκαλοειδή πυρρολίου, η γανοΐνη (N-ισοπεντυλ-5-υδροξυμεθυλ-πυρρυλ αλδεΐδη) και η γανοδίνη (N-φαινυλαιθυλ-5-υδροξυμεθυλ-πυρρυλ αλδεΐδη) και ένα αλκαλοειδές πουρίνης, η γανοδερπουρίνη [N9-(άλφα, άλφα διμεθυλ-γάμμα-οξοβουτυλ) αδενίνη] έχουν απομονωθεί από το μυκήλιο του *G. carpense* (Yu et al. 1990). Πρόσφατα, ένα νέο μόριο αλκαλοειδούς, η σινενσίνη απομονώθηκε από τα καρποσώματα του *G. sinense* (Liu C. et al. 2010).

Από τους μακρομύκητες *Ganoderma* έχουν απομονωθεί ακόμα κερεβροζίτες (McKenna et al. 2002) και συγκεκριμένα η (4E',8E')-N-D-2'-υδροξυστεαροϋλ-1-O-β-D-γλυκοπυρανοζυλ-9-μεθυλ-4-8-σφιγγαδιενίνη και η (4E',8E')-N-D-2'-υδροξυπαμιτοϋλ-1-O-β-D-γλυκοπυρανοζυλ-9-μεθυλ-4-8-σφιγγαδιενίνη.

Επιπλέον, βιταμίνες, στις οποίες περιλαμβάνεται το β-καροτένιο, έχουν ανιχνευτεί σε είδη του γένους *Ganoderma*. Αρωματικές ενώσεις έχουν απομονωθεί από το *G. applanatum* με πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Πάνω από 120 πτητικές αρωματικές ενώσεις, κυρίως αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες και φαινόλες έχουν βρεθεί σε μακρομύκητες *Ganoderma* (Huie & Di 2004). Τέλος, πολύ μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα με περισσότερα από 23 άτομα άνθρακα έχουν απομονωθεί για το *G. applanatum* (Paterson et al. 2006).

Ι. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μικροοργανισμοί

2.1.1 Επιλογή στελεχών Βασιδιομυκήτων

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν αρχικά 14 στελέχη Βασιδιομυκήτων. Από τα στελέχη αυτά, 7 ανήκουν στο γένος *Pleurotus*, 2 στο γένος *Agaricus*, 2 στο γένος *Clitocybe*, 1 ανήκει στο γένος *Ganoderma*, 1 στο γένος *Polyporus* και τέλος 1 ανήκει στο γένος *Agrocybe* (Πιν. 2.1). Η επιλογή των ειδών έγινε με βάση την εδωδιμότητά τους και τη δυνατότητα αξιοποίησής τους βιοτεχνολογικά. Όλα τα στελέχη προέρχονται από τη Συλλογή Καλλιεργειών Μυκήτων ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών και έχουν απομονωθεί από βασιδιοκάρπια που προέρχονται είτε από φυσικά οικοσυστήματα της Ελλάδας (ATHUM 4387, 3688, 2337, 4376, 4375, 4345, 5657, 5656 και 5658), είτε από μονάδες καλλιέργειας μανιταριών (ATHUM 4438, 5653, 4439, 5654, 5655).

Πίνακας 2.1 Στελέχη Βασιδιομυκήτων που μελετήθηκαν

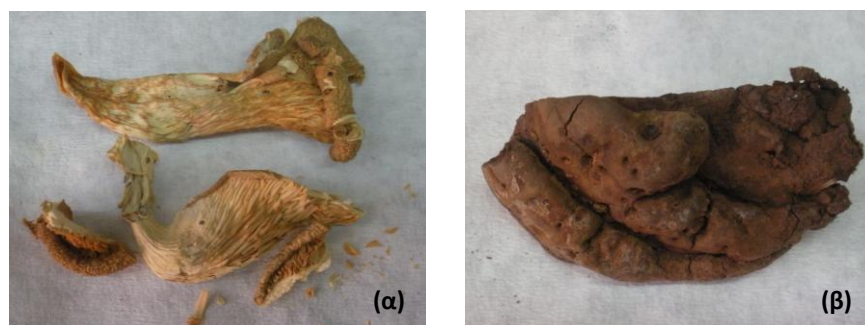
ATHUM	Είδος Βασιδιομύκητα
4438	<i>Pleurotus ostreatus</i>
4387	<i>Pleurotus nebrodensis</i>
3688	<i>Pleurotus ostreatus</i>
5653	<i>Pleurotus ostreatus</i>
4439	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
2337	<i>Pleurotus eryngii</i>
4376	<i>Pleurotus dryinus</i>
4375	<i>Polyporus meridionalis</i>
4345	<i>Ganoderma australe</i>
5655	<i>Agaricus bisporus</i> cultivar portobello
5654	<i>Agaricus bisporus</i>
5657	<i>Agrocybe cylindracea</i>
5656	<i>Clitocybe nebularis</i>
5658	<i>Clitocybe odora</i>

Μετά από την προκαταρκτική μελέτη των 14 στελεχών Βασιδιομυκήτων και τον έλεγχο της παραγόμενης βιομάζας επιλέχθηκαν, ως τα καλύτερα για περαιτέρω ανάλυση, τα στελέχη *P. ostreatus* ATHUM 4438 και *G. australe* ATHUM 4345. Το στέλεχος ATHUM 4438 έχει προέλθει από μονάδα καλλιέργειας μανιταριών μικρής κλίμακας στη Σιάτιστα Μακεδονίας, ενώ το στέλεχος ATHUM 4345 έχει απομονωθεί από βασιδιοκάρπιο που αναπτυσσόταν σε κορμό ιτιάς (*Salix alba*) στην Πάρνηθα. Επιπλέον, για συγκριτικούς σκοπούς, αναλύθηκαν αποξηραμένα βασιδιοκάρπια από τη Μυκητοθήκη του Πανεπιστημίου Αθηνών, για μεν το είδος *P. ostreatus* από τη συλλογή αναφοράς ATHUM 4438, από την οποία προήλθε το στέλεχος, για δε το *G. australe* από τη συλλογή ATHUM 4322.

2.1.2. Διατήρηση στελεχών Βασιδιομυκήτων

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στο εργαστήριο η καλλιέργεια των στελεχών Βασιδιομυκήτων γινόταν σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 9 cm και φυλάσσονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA (Potato Dextrose Agar 3.8% w/v) ως θρεπτικό υπόστρωμα, στους 4°C. Ανακαλλιέργεια των στελεχών πραγματοποιούταν κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η διατήρηση των στελεχών Βασιδιομυκήτων στη Συλλογή Καλλιεργειών Μυκήτων ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών γίνεται σε σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε κλίση, με ή χωρίς την προσθήκη παραφίνης, σε θερμοκρασία 5°C. Παράλληλα, στη Μυκητοθήκη ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών φυλάσσονται σε αποξηραμένη μορφή βασιδιοκάρπια, ως αντιπροσωπευτικά δείγματα αναφοράς των μυκήτων αυτών, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και εκείνα από τα οποία έχουν απομονωθεί τα μελετώμενα στελέχη [Εικ. 2.1 (α,β)].



Εικ. 2.1 Αποξηραμένα βασιδιοκάρπια **(α)** του *P. ostreatus* ATHUM 4438 και **(β)** του *G. australe* ATHUM 4322

2.2. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), και η καθαρότητα τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία ελέγχου (standards) στο GC για το χρωματογραφικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων ήταν: λαυρικό οξύ M-E, *cis*-5,8,11,14,17-εικοσαπεντανοϊκό οξύ M-E και το *cis*-4,7,10,13,16,19-δοκοσαεξανοϊκό οξύ M-E, (καθαρότητας $\geq 98\%$) της εταιρείας Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, UK), Matreya Bacterial Acid Methyl Esters CPTM Mix, (Catalog No:1114), SupelcoTM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100 mg Neat, (Catalog No:18919-1AMP) και Supelco PUFA No.1, Marine Source, 100 mg Neat, (Catalog No:47033).

2.3 Υλικά-Όργανα-Χρωματογραφικές Τεχνικές

Τα υλικά, όργανα και είδη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη πειραματική διαδικασία συνοψίζονται παρακάτω:

- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co. Ltd (Κίνα)
- Βιοαντιδραστήρας υγρής καλλιέργειας χωρητικότητας 20L (MRB Bioreactor AG, Ελβετία)
- Αυτόκαυστος Labo Autoclave (SANYO)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Συσκευή εξάχνωσης υπό κενό (freeze drying), Christ ALPHA 1-4, B. Braun Biotec. International, Melsungen, (Γερμανία)
- Συσκευή υπερήχων μοντέλο VC 600, Sonics and Materials, (Η.Π.Α.)
- Φούρνοι κενού, ξήρανσης (100-120°C) και αποτέφρωσης (525°C)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού RE111 (Büchi, Σουηδία)
- Σύστημα διήθησης υπό κενό
- pH-μετρο 537 (WTW, Γερμανία)

- Φυγόκεντροι Model J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), ALC 4239R (Μ. Βρετανία) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Φωτόμετρο SPECTRAmax 250 (Molecular Devices, Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο (Hitachi UV 2000)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q (Millipore, Η.Π.Α.).
- Ομογενοποιητής (παλμικός) τύπου Stomacher (Bagmixer, Interscience, Γαλλία)
- Διάταξη Kheldahl-συσκευή απόσταξης και καύσης (Büchi 321 Distillation unit, Flawwil, Ελβετία)
- Διάταξη Soxhlet
- Θάλαμος φωτογράφησης (Reprostar 3 Camag, Ελβετία)
- Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction – ASE 300, Dionex)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)
- Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (Kromaton FCPC)
- Υγρή χρωματογραφία στήλης ανοιχτού τύπου υπό κενό (VLC)
- Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC)
- Υγρή χρωματογραφία ανοιχτού τύπου, μοριακού αποκλεισμού (Sephadex)
- Χρωματογραφία Προσρόφησης (ρητίνη XAD-4)
- Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS): Αεριοχρωματογράφος Hewlett-Packard (τύπου Agilent 6890, στήλη HP-5 MS) και Φασματογράφος μάζας (τύπου HP 5973)
- Αέρια χρωματογραφία (GC): Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εφοδιασμένος με split/splitless εισαγωγή. Η χρησιμοποιούμενη στήλη ήταν DB-23 τριχοειδής (60 m × 0.25mm i.d., 0.15μm film) [50%-Cyanopropyl)-methylpolysiloxane], υψηλής πολικότητας, σχεδιασμένη για την ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES), με εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα των *cis*- και *trans*- FAME ισομερών
- Αυτόματη συσκευή παρασκευαστικής TLC (Linomat 5, CAMAG)
- Φασματογράφοι Brüker DRX400 και Brüker Avance III 600 για την λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητισμού (NMR)

2.4 Ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες μικρής κλίμακας

2.4.1 Αρχική αξιολόγηση στελεχών

Τα 14 στελέχη Βασιδιομυκήτων για την αξιολόγηση τους ως προς την παραγωγή βιομάζας, αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με το μέσο ανάπτυξης Hagen, που είχε την ακόλουθη σύσταση (ανά λίτρο απιονισμένου νερού): 10 g γλυκόζη, 3.0 g εκχύλισμα βύνης, 0.05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g KH_2PO_4 , 0.25 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 1.3 ml FeCl_3 1% (Alarcón et al. 2003). Το μέσο ρυθμίστηκε σε pH 6.5 με διαλύματα HCl (2M) και KOH (2M). Ακολούθησε αποστείρωση του σε αυτόκλειστο κλίβανο (15 min, 121°C). Η προκαλλιέργεια των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά δύο τετραγωνικών εμβολίων (περίπου 5mm) από τα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL με 100 mL αποστειρωμένου μέσου Hagen. Μετά από 10 ημέρες ανάπτυξης, 10 mL μυκηλίου εμβολιάστηκαν σε 90 mL αποστειρωμένου μέσου Hagen που περιέχονταν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε περιστρεφόμενο επωαστήριο με συνεχή ανάδευση (150 rpm), στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 25°C (Alarcón et al. 2003, Alarcón & Águila 2006), αφού είχε προηγηθεί ομογενοποίηση του εμβολίου στον παλμικό ομογενοποιητή (Stomacher).

Η βιομάζα επί ξηρού εκφρασμένη σε g/L υγρής καλλιέργειας, προσδιορίστηκε βαρομετρικά ύστερα από διήθηση σε κενό, δια μέσω φίλτρου κυτταρίνης 0.45-μm της Millipore, γνωστού όγκου διαλύματος καλλιέργειας, ξέπλυμα των κυττάρων με αποσταγμένο νερό και ψυχοξήρανση.

2.4.2 Αξιολόγηση θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη των επιλεγμένων στελεχών

Η ανάπτυξη των *P. ostreatus* ATHUM 4438 και *G. australe* ATHUM 4345, που επιλέχτηκαν για περαιτέρω μελέτη, έγινε σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες, μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL με 100 mL από το δοκιμαζόμενο μέσο ανάπτυξης και σε περιστρεφόμενο επωαστήριο με συνεχή ανάδευση (220rpm), στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 28±2°C (*P. ostreatus*) και 30±2°C (*G. australe*). Της ανάπτυξης των στελεχών σε υγρές καλλιέργειες προηγήθηκε προκαλλιέργεια ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.4.1 με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο συγκέντρωσης 5% (v/v). Να σημειωθεί ότι η αποστείρωση των μέσων ανάπτυξης γινόταν σε αυτόκλειστο κλίβανο (121°C για 20min). Τα σάκχαρα κάθε μέσου αποστειρώνονταν ξεχωριστά (109°C για 40min).

Σχετικά με το *P. ostreatus*, αξιολογήθηκαν 4 μέσα (για χάρη συντομίας αναφέρονται ως **P_I**, **P_{II}**, **P_{III}** και **P_{IV}**). Η σύσταση των εξεταζόμενων μέσων ανάπτυξης αναφέρεται ανά λίτρο απιονισμένου νερού. Το μέσο **P_I** είχε τη σύσταση του μέσου Hagen (παρ. 2.4.1). Το μέσο **P_{II}** περιείχε 60 g γλυκόζη, 1 g πεπτόνη, 2 g εκχύλισμα ζύμης, 5 g (NH₄)₂SO₄, 1 g K₂HPO₄ και 0.2 g MgSO₄·7H₂O (Rosado et al. 2003). Το μέσο **P_{III}** περιείχε 20 g γλυκόζη, 17 g εκχύλισμα βύνης, 3 g μυκητολογική πεπτόνη, 0.46 g KH₂PO₄, 1.0 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄·5H₂O και 2.0 g ασπαραγίνη (Rigas & Dritsa 2006). Τέλος, το μέσο **P_{IV}** περιείχε 20 g γλυκόζη, 2 g εκχύλισμα ζύμης, 2 g τρυπτοφάνη, 0.5mg υδροχλωρική θειαμίνη, 1.0 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O και 10mL διάλυμα ιχνοστοιχείων η σύσταση του οποίου ανά λίτρο απιονισμένου νερού ήταν 1.4 g H₃BO₃, 0.22g ZnSO₄, 0.08g CuSO₄·H₂O, 0.05g NH₄6MO₇·4H₂O και 0.01g FeSO₄, (Gbolagade et al. 2006b). Η τιμή του pH για το **P_I** μέσο ρυθμίστηκε στο 6.5 , για το **P_{II}** και για το **P_{IV}** μέσο στο 6.0, ενώ για το **P_{III}** στο 6.8 με διαλύματα HCl (1M) και NaOH (2M).

Σχετικά με το *G. australe* αξιολογήθηκαν 5 μέσα ανάπτυξης (για χάρη συντομίας αναφέρονται ως **G_I**, **G_{II}**, **G_{III}**, **G_{IV}** και **G_V**). Η σύσταση των εξεταζόμενων μέσων ανάπτυξης αναφέρεται ανά λίτρο απιονισμένου νερού. Το μέσο **G_I** είχε τη σύσταση του μέσου Hagen (παρ. 2.4.1). Το μέσο **G_{II}** περιείχε 40 g γλυκόζη, 3.5 g πεπτόνη, 1 g KH₂PO₄, 0.45 g MgSO₄·7H₂O και 0.01 g βιταμίνη B₁ (Liu & Zhang 2006). Το μέσο **G_{III}** περιείχε 35 g γλυκόζη, 2.5 g εκχύλισμα ζύμης, 5 g πεπτόνη, 0.88 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O και 0.05 g βιταμίνη B₁ (Fang & Zhong 2002). Το μέσο **G_{IV}** περιείχε 50 g γλυκόζη, 10 g εκχύλισμα βύνης, 2 g εκχύλισμα ζύμης, 2 g βακτηριακή πεπτόνη, 5 g KH₂PO₄ και 5.11 g MgSO₄·7H₂O (Kawagishi et al. 1997). Τέλος, το μέσο **G_V** περιείχε 12.4 g γλυκόζη, 14.0 g αλεσμένη σόγια, 2.2 g KH₂PO₄ και 0.4g MgSO₄·7H₂O (Avtonomova et al. 2006). Η τιμή του pH για το **G_I** μέσο ρυθμίστηκε στο 6.5 , για το **G_{II}** στο 5.6, για το **G_{III}** στο 5.5, για το **G_{IV}** στο 5.1, ενώ για το **G_V** μέσο στο 6.0 με διαλύματα HCl (1M) και NaOH (2M). Όλες οι δοκιμές των μέσων ανάπτυξης και για τα δύο μελετώμενα στελέχη πραγματοποιήθηκαν σε διπλές επαναλήψεις.

2.4.3 Αξιολόγηση πηγών άνθρακα και αζώτου για τα επιλεγμένα μέσα ανάπτυξης

2.4.3.1 Ανάλυση με την FF Biolog μικροσυστοιχεία (Biolog FF MicroPlate)

Η αφομοίωση του άνθρακα και η μιτοχονδριακή ενεργότητα των στελεχών Βασιδιομυκήτων μελετήθηκαν με τη χρήση των μικροσυστοιχειών Biolog FF (Biolog, Hayward, CA). Μια μικροσυστοιχεία FF αποτελείται από 95 κελιά με το καθένα από τα οποία να περιέχει, στο εσωτερικό του, διαφορετική πηγή άνθρακα και ένα κελί μάρτυρα με νερό (Εικ. 2.2). Τα

θρεπτικά στοιχεία και τα χημικά αντιδραστήρια έχουν προγεμιστεί και ξηραθεί στα κελιά της μικροσυστοιχείας. Γενικότερα, τα υποστρώματα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα από έναν μικροοργανισμό και δοκιμάζονται με τη FF Biolog μικροσυστοιχεία, ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες: υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα, αμινοξέα, αμίδια, αλκοόλες, εστέρες, αρωματικές, φωσφορυλιωμένες και πολυμερείς ενώσεις.

Το ιώδες του ιωδονιτροτετραζολίου (iodonitrotetrazolium violet, INT) χρησιμοποιείται ως οξειδοαναγωγική χρώση με σκοπό τη χρωματομετρική μέτρηση της μιτοχονδριακής ενεργότητας που προκύπτει από την οξείδωση των μεταβολιζόμενων πηγών άνθρακα. Όλα τα κελιά είναι άχρωμα πριν τον εμβολιασμό με τον μύκητα. Η οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό οξύ κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέος, με τη μεσολάβηση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και του φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD), προκαλεί την αναγωγή του INT σε μια ερυθρόχρωμη χρωστική, τη φορμαζάνη με μέγιστο απορρόφησης τα 490nm. Η αναγωγή της INT και η παραγωγή της ερυθρόχρωμης φορμαζάνης, είναι μη αντιστρεπτή ενώ η συσσώρευση της χρωστικής, που είναι δυνατό να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά, αντικατοπτρίζει ποσοτικά την οξείδωση του εκάστοτε δοκιμαζόμενου υποστρώματος. Οι μετρήσεις απορρόφησης λαμβάνονται σε δύο μήκη κύματος, στα 490nm και 750nm.

Στα κελιά με το υπόστρωμα που μεταβολίζεται από τον μικροοργανισμό, είναι δυνατό να συμβεί ένα ή και τα δύο από τα παρακάτω: (1) αυξημένη μιτοχονδριακή ενεργότητα, που οδηγεί στην ανάπτυξη ερυθρού χρώματος και στην αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 490 nm και (2) ανάπτυξη του μυκηλίου, που οδηγεί στην αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 490 και στα 750 nm.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας ανάλυσης 20 mL υγρής βυθισμένης καλλιέργειας του μελετώμενου στελέχους Βασιδιομύκητα φυγοκεντρήθηκαν (20 min, 5,000g). Το ίζημα μεταφέρθηκε ασηπτικά σε 100 mL αποστειρωμένου διαλύματος (0.25% phytigel και 0.03% Tween 40) και ακολούθησε ανάδευσή του σε μαγνητικό αναδευτήρα με τη βοήθεια θρυμματισμένου γυαλιού για 10 min. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μ L του ομογενοποιημένου διαλύματος μυκηλίου με διαπερατότητα 75(\pm 2)% στα 590 nm σε καθένα από τα 96 κελιά της μικροσυστοιχείας FF Biolog. Οι μικροσυστοιχείες, εις τριπλούν για κάθε μελέτη, μετά τον εμβολιασμό επώαστηκαν στους 26°C σε συνθήκες σκότους για 4 ημέρες και προσδιορίστηκε η (%) απορρόφηση στα 490 nm και στα 750 nm με τη βοήθεια ενός αναγνώστη μικροσυστοιχειών SpectraMax 250 (Molecular Device) (Kubicek et al. 2003).

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Νερό	Tween 80	N-ακετυλ-D-γλακτοζαμίνη	N-ακετυλ-D-γλακτοζαμίνη	N-ακετυλ-D-μαννοζαμίνη	Αδονιτόλη	Αμυγδαλίνη	D-αραβινόζη	L-αραβινόζη	D-αραβιτόλη	Αρβουτίνη	D-σελλοβιόζη
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
α-κυκλοδεξτρίνη	β-κυκλοδεξτρίνη	Δεξτρίνη	ι-ερυθριτόλη	D-φρουκτόζη	L-φουκόζη	D-γαλακτόζη	D-γαλακτουρονικό οξύ	Γεντιοβιόζη	D-γλουκονικό οξύ	D-γλυκοζαμίνη	α-D-γλυκόζη
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1-φωσφορική γλυκόζη	Γλυκοροναμίδιο	D-γλουκορονικό οξύ	Γλυκερόλη	Γλυκογόνο	m-ιννοσιτόλη	2-κετο-D-γλουκονικό οξύ	α-D-λακτόζη	Λακτουλόζη	Μαλτιτόλη	Μαλτόζη	Μαλτιτριόζη
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D-μαννιτόλη	D-μαννόζη	D-μελεζιτόζη	D-μελιβιόζη	α-μεθυλ-D-γαλακτοζίτης	β-μεθυλ-D-γαλακτοζίτης	α-μεθυλ-D-γλυκοζίτης	β-μεθυλ-D-γλυκοζίτης	Παλατινόζη	D-ψικόζη	D-ραφινόζη	L-ραμνόζη
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
D-ριββόζη	Σαλαϊσίνη	Σεντοεππουλοζόνη	D-σορβιτόλη	L-σορβόζη	Σταχυόζη	Σουκρόζη	D-ταγατόζη	D-τρεχαλόζη	Τουρανόζη	Ξυλιτόλη	D-ξυλόζη
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
γ-αμινοβουτυρικό οξύ	Βρωμοηλεκτρικό οξύ	Φουμαρικό οξύ	β-υδροξυβουτυρικό οξύ	γ-υδροξυβουτυρικό οξύ	ρ-υδροξυφαινυλ-οξικό οξύ	α-κετογλουταρικό οξύ	Μεθυλεστέρας D-γαλακτικού οξέος	L-γαλακτικό οξύ	D-μηλικό οξύ	L-μηλικό οξύ	Κινικό οξύ
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
D-σακχαρικό οξύ	Σεβακικό οξύ	Σουσαμιναμικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ	Μονομεθυλεστέρας του ηλεκτρικού οξέος	N-ακετυλ-L-γλουταμινικό οξύ	Αλανιναμίδιο	L-αλανίνη	L-αλανυλ-γλυκίνη	L-ασπαργίνη	L-ασπαρτικό οξύ	L-γλουταμινικό οξύ
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Γλυκιλ- L-γλουταμινικό οξύ	L-ορνιθίνη	L-φαινυλανίνη	L-προλίνη	L-πιρογλουταμινικό οξύ	L-σερίνη	L-θρεονίνη	2-αμινοαιθανόλη	Πουτρεσκίνη	Αδενοσίνη	Ουριδίνη	5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη

Εικ. 2.2 Οι περιεχόμενες πηγές άνθρακα στη FF Biolog μικροσυστοιχεία

Η διορθωμένη μιτοχονδριακή ενεργότητα ($A_k=490-750$ nm) για κάθε δοκιμαζόμενο υπόστρωμα κανονικοποιήθηκε με τη χρήση της μέσης τιμής ανάπτυξης χρώματος κελιού (Average Well Colour Development) ή αλλιώς *AWCD* (Garland & Mills 1991). Η κανονικοποιημένη μιτοχονδριακή ενεργότητα (\bar{A}_k) για το κελί *k* υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\bar{A}_k = \frac{A_k - A_{k0}}{\frac{1}{96} \sum_{i=1}^{96} (A_i - A_{i0})} \quad (1)$$

όπου A_{i0} και A_i αναφέρονται στη διαφορά των αναγνώσεων (490-750 nm) για το κελί *i* της μικροσυστοιχείας τη στιγμή του εμβολιασμού και ύστερα από 4 ημέρες επώασης, αντίστοιχα. Ο παρανομαστής της εξίσωσης ουσιαστικά αντιπροσωπεύει την τιμή *AWCD*. Για κάθε

δοκιμαζόμενο υπόστρωμα ως \bar{A}_k χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της \bar{A}_k από τις τριπλές αναλύσεις για κάθε δοκιμαζόμενο υπόστρωμα της μικροσυστοιχείας.

2.4.3.2 Προσδιορισμός των καταλληλότερων πηγών άνθρακα και αζώτου

Για την επιλογή της καταλληλότερης πηγής άνθρακα και αζώτου για τη μυκηλιακή ανάπτυξη από τα δύο μελετώμενα στελέχη Βασιδιομυκήτων στις υγρές βυθισμένες καλλιέργειες, δοκιμάστηκαν διαφορετικές πηγές άνθρακα και αζώτου. Οι πηγές άνθρακα που επιλέχθηκαν για αξιολόγηση ανήκουν στη χημική ομάδα των υδατανθράκων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι μονοσακχαρίτες αραβινόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη, ξυλόζη, μαννόζη και οι ολιγοσακχαρίτες μαλτόζη, σουκρόζη, τρεχαλόζη και ραφινόζη. Στις αζωτούχες ουσίες που δοκιμάστηκαν περιλαμβάνονται τα αμινοξέα ασπαραγίνη, τρυπτοφάνη και γλυκίνη, και ακόμα ορισμένες σύνθετες πηγές αζώτου στις οποίες περιλαμβάνονται η πεπτόνη, η υδρολυμένη καζεΐνη, το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (Corn Steep Liquor, CSL), το εκχύλισμα βύνης (malt extract), το εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract, YE) και η αλεσμένη σόγια. Τα πειράματα αξιολόγησης όλων των πηγών άνθρακα και αζώτου διεξάχθηκαν εις διπλούν και για τα δύο στελέχη Βασιδιομυκήτων.

Το μέσο ανάπτυξης που τελικά χρησιμοποιήθηκε, μετά τα παραπάνω πειράματα, για την αξιολόγηση των σακχάρων σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες του *P. ostreatus* ήταν το μέσο **P_{II}**. Στο παραπάνω μέσο δοκιμάστηκαν τα διαφορετικά σάκχαρα προς αξιολόγηση σε συγκέντρωση 60 g/L. Για τα πειράματα αξιολόγησης των αζωτούχων πηγών χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μέσο **P_{II}** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη (60 g/L) και στο οποίο δοκιμάστηκαν οι διαφορετικές αζωτούχες ουσίες προς αξιολόγηση σε συγκέντρωση 10 g/L εκτός από το CSL (30 g/L).

Αντίστοιχα, για το *G. australe*, το μέσο ανάπτυξης που δοκιμάστηκε ήταν το μέσο **G_V**. Στο παραπάνω μέσο δοκιμάστηκαν τα διαφορετικά σάκχαρα προς αξιολόγηση σε συγκέντρωση 12.4 g/L. Επιπλέον, δοκιμάστηκαν οι 9 αζωτούχες ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, και ακόμα η ουρία. Ως μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μέσο **G_V** στο οποίο για πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη (12.4 g/L) και στο οποίο δοκιμάστηκαν οι διαφορετικές αζωτούχες ουσίες προς αξιολόγηση σε συγκέντρωση 10 g/L εκτός από το CSL (30 g/L) και την ουρία (5 g/L). Παράλληλα, και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν στα προαναφερόμενα μέσα ανάπτυξης (**P_{II}** και **G_V** για το *P. ostreatus* και το *G. australe*, αντίστοιχα) απουσία πηγής άνθρακα: περίπτωση που αναφέρεται ως επέμβαση ελέγχου (control).

2.4.3.3 Προσδιορισμός της άριστης αρχικής συγκέντρωσης των επιλεγμένων πηγών άνθρακα και αζώτου

Αφού καθορίστηκε η καταλληλότερη πηγή άνθρακα και αζώτου στο μέσο ανάπτυξης των δύο μελετώμενων στελεχών Βασιδιομυκήτων με σκοπό την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, ακολούθησαν πειράματα για τον καθορισμό της καταλληλότερης αρχικής συγκέντρωσης αυτών στα επιλεγμένα μέσα ανάπτυξης.

Σχετικά με το *P. ostreatus*, αρχικά έγινε μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της ξυλόζης του μέσου ανάπτυξης P_{II} στην παραγωγή βιομάζας σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες, διατηρώντας ως πηγή αζώτου το CSL (30 g/L). Οι συγκεντρώσεις ξυλόζης που δοκιμάστηκαν ήταν 20, 40, 60, 80 και 100 g/L. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του CSL του μέσου ανάπτυξης P_{II} στην παραγωγή βιομάζας, όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη (60 g/L), όπως κρίθηκε από τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων. Οι συγκεντρώσεις CSL που δοκιμάστηκαν ήταν 10, 20, 30, 40 και 50 g/L.

Παράλληλα, για το *G. australe*, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 5, 10, 20, 40 και 60 g/L γλυκόζης στο μέσο G_v , διατηρώντας ως πηγή αζώτου το YE σε συγκέντρωση 14 g/L. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του YE του μέσου G_v στην παραγωγή βιομάζας, όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη (10 g/L), όπως κρίθηκε από τα προηγούμενα πειράματα. Οι συγκεντρώσεις του YE που δοκιμάστηκαν ήταν 5, 10, 15, 20, 25 και 30 g/L. Όλες οι δοκιμές εξετάστηκαν σε διπλές επαναλήψεις.

2.4.4 Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση

Η μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM), που χρησιμοποιείται ευρέως και επιτυχώς σε μελέτες αριστοποίησης σύστασης μέσων (Banga & Tripathi 2009), συνθηκών ενζυμικών υδρολύσεων και παραγωγής ενζύμων (Katapodis et al. 2007), βιομηχανικών διεργασιών (Mao et al. 2005), αποτελεί μία συλλογή στατιστικών τεχνικών για πειραματικό σχεδιασμό, ανάπτυξη μοντέλων, εκτίμηση παραγόντων και διερεύνηση άριστων συνθηκών (Cui et al. 2006, Hamedi et al. 2007). Με τη μέθοδο RSM, αποφεύγονται τα μειονεκτήματα των κλασικών ή εμπειρικών μεθόδων, όπως για παράδειγμα της μεθόδου ένας-παραγόντας-σε-ένα-χρόνο, που αποτελεί μια χρονοβόρα αλλά και ταυτόχρονα ακατάλληλη στρατηγική για τον προσδιορισμό «σφαιρικών» άριστων συνθηκών, ειδικά όταν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών. Η RSM επέτρεψε την εκτίμηση της

μέγιστης παραγωγής βιομάζας από τα μελετώμενα στελέχη Βασιδιομυκήτων, βασισμένη σε μικρό αριθμό πειραμάτων, όπου όλοι οι παράγοντες μεταβάλλονταν μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών.

Με σκοπό την αριστοποίηση της σύστασης του μέσου ανάπτυξης για την παραγωγή βιομάζας σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες και για τα δύο μελετώμενα στελέχη, προσδιορίστηκε η επιφανειακή απόκριση της παραγωγής βιομάζας συναρτήσει επιλεγμένων ανεξάρτητων μεταβλητών. Οι πηγές άνθρακα και αζώτου χρησιμοποιήθηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Χρησιμοποιήθηκε ένας 3^2 κεντρικός πειραματικός σχεδιασμός με βάση τον οποίο απαιτούνται 11 συνδυασμένες πειραματικές συνθήκες. Ο πίνακας 2.2 παρουσιάζει τους συνδυασμούς των κωδικοποιημένων τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών.

Αυτός ο σχεδιασμός μπορεί να περιγραφεί από το δευτέρου βαθμού πολυωνυμικό μοντέλο (1), με προσαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης και να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την κατασκευή της επιφάνειας απόκρισης των ανεξάρτητων μεταβλητών:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \quad (1)$$

όπου Y είναι η εξαρτημένη μεταβλητή (παραγωγή ξηρής βιομάζας), X_1 και X_2 οι κωδικοποιημένες ανεξάρτητες μεταβλητές (πηγή άνθρακα και αζώτου, αντίστοιχα), b_0 μια σταθερά; b_1 και b_2 οι συντελεστές της γραμμικής εξάρτησης πρώτου βαθμού, b_{12} ο συντελεστής αλληλεπίδρασης, b_{11} και b_{22} οι συντελεστές της γραμμικής εξάρτησης δευτέρου βαθμού. Ο τύπος που περιγράφει τη σχέση μεταξύ των κωδικοποιημένων μορφών των μεταβλητών και των πραγματικών τιμών της πηγής άνθρακα και της πηγής αζώτου φαίνεται στην εξίσωση (2):

$$X_i = \frac{(A_i - A_0^*)}{\Delta A} \quad (2)$$

όπου X_i είναι η κωδικοποιημένη μεταβλητή και A_i η πραγματική τιμή της πηγής άνθρακα ή της πηγής αζώτου, A_0^* η πραγματική τιμή της ίδιας μεταβλητής στο κεντρικό σημείο και ΔA το βήμα μεταβολής της μεταβολής.

Για το *P. ostreatus* οι ανεξάρτητες μεταβλητές ήταν οι συγκεντρώσεις ξυλόζης και CSL. Οι κεντρικές τιμές του παραγοντικού σχεδιασμού ήταν 60 g/L για τη ξυλόζη, με βήμα μεταβολής 10 g/L, και 40 g/L για το CSL, με βήμα μεταβολής 15 g/L. Αντίστοιχα για το *G.*

australe οι ανεξάρτητες μεταβλητές ήταν οι συγκεντρώσεις γλυκόζης και ΥΕ. Οι κεντρικές τιμές του παραγοντικού σχεδιασμού ήταν 10 g/L για τη γλυκόζη με βήμα μεταβολής 5 g/L, και 25 g/L για το ΥΕ με βήμα μεταβολής 10 g/L.

Για την προσαρμογή του μοντέλου και τη γραφική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Sigma plot 9,01 (Systat software Inc, Richmond, USA). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση ANOVA (Analysis of Variance) για τον προσδιορισμό των στατιστικών παραμέτρων. Η προσαρμογή του μοντέλου περιγράφεται από τον όρο R^2 .

Πίνακας 2.2 Κωδικοποιημένες ανεξάρτητες μεταβλητές για τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κεντρικό πειραματικό σχεδιασμό (CCD) αριστοποίησης παραγωγής βιομάζας από τα μελετώμενα στελέχη (C: Πηγή άνθρακα, N: Πηγή αζώτου)

Πείραμα	Κωδικοποιημένες τιμές των μεταβλητών ($X_1=C, X_2=N$)	
	X_1	X_2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1.41	0
9	0	-1.41
10	1.41	0
11	0	1.41

2.5 Ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 L

Η ανάπτυξη των δύο επιλεγμένων στελεχών μελετήθηκε και σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, βυθισμένης καλλιέργειας 20-L (MBR, Switzerland) με ενεργό όγκο 17-L, στις άριστες συνθήκες ανάπτυξης, όπως αυτές καθορίστηκαν από τις παραπάνω μικρής κλίμακας πειραματικές σειρές. Η σύσταση του μέσου ανάπτυξης διαμορφώθηκε ως εξής για καθένα από τα στελέχη: 57 g/L ξυλόζη, 37 g/L CSL, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ για το *P. ostreatus* και 13.7 g/L γλυκόζη, 30 g/L ΥΕ, 2.2 g/L KH_2PO_4 , 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. για το *G. australe*. Η αποστείρωση του μέσου ανάπτυξης στο βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε στους

110°C για 50 min. Ακολούθησε ο εμβολιασμός του με προσθήκη προκαλλιέργειας του μύκητα στο ίδιο μέσο σε φιάλες Erlenmeyer, σε αναλογία 5% (v/v) του συνολικού όγκου καλλιέργειας. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε αυτόματα στους 28°C για την καλλιέργεια του *P. ostreatus* και στους 30°C για την καλλιέργεια του *G. australe*. Η ρύθμιση του pH του μέσου γινόταν επίσης αυτόματα στην επιθυμητή τιμή (6.0) με την προσθήκη διαλύματος HCl ή NaOH (1M). Τέλος, ο αερισμός προσαρμόστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε το διαλυμένο οξυγόνο να διατηρείται πάνω από 10% της τιμής κορεσμού, ενώ η ανάδευση ρυθμίστηκε στα 160 rpm.

2.5.1 Προσδιορισμός των εναπομεινάντων σακχάρων στην καλλιέργεια

Η εναπομείνασα γλυκόζη κατά τη διάρκεια της υγρής βυθισμένης καλλιέργειας του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα προσδιορίστηκε ενζυμικά με εμπορικό διαγνωστικό ενζυμικό σκεύασμα-kit (Biosis, Ελλάς). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην μετατροπή της γλυκόζης σε ένα προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο είναι αποτέλεσμα της διαδοχικής δράσης των ενζύμων οξειδάση και υπεροξειδάση της γλυκόζης (Trinder 1969, Bergmeyer & Bernt 1974). Αρχικά, η γλυκόζη με την δράση της οξειδάσης της γλυκόζης (*GOD*) μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία αμινοφαιναζόνης και κάποιου φαινολικού παραγωγού με τη δράση της υπεροξειδάσης (*POD*) μετατρέπεται σε προϊόν ερυθρού χρώματος το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 510 nm .

Αρχικά, 1 mL διαλύματος εργασίας με 10 µL δείγματος για ανάλυση (διηθήματα ζυμού καλλιέργειας που συλλέχτηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξης του στελέχους Βασιδιομύκητα στο βιοαντιδραστήρα) επώαστηκαν για 15 min σε υδατόλουτρο στους 37°C. Ακολούθησε ανάδευση και φωτομέτρηση έναντι τυφλού (1 mL διαλύματος εργασίας και 10 µL απεσταγμένου νερού), σε μήκος κύματος 510 nm σε φωτόμετρο (U-1100, HITACHI). Παράλληλα, έγινε και φωτομέτρηση διαλύματος που περιείχε 1 mL διαλύματος εργασίας και 10 µL πρότυπου διαλύματος γλυκόζης 1 mg/ml.

Ο προσδιορισμός της εναπομεινάσας ξυλόζης κατά την υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* ATHUM 4438 στο βιοαντιδραστήρα έγινε με ενζυμικό προσδιορισμό (Megazyme, Ireland). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ενδομετατροπή των α - και β -ανωμερικών μορφών της D-ξυλόζης καταλυόμενη από την πολυστροφάση της ξυλόζης (*XMR*) και εν συνεχεία της οξείδωσης της β -D-ξυλόζης από το NAD^+ προς D-ξυλονικό οξύ με την

παρουσία αφυδρογονάσης της β-ξυλόζης (*β-ΧDH*) σε τιμή pH 7.5. Η συγκέντρωση NADH που σχηματίζεται σε αυτήν την αντίδραση και που μετρείται φωτομετρικά με την αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, είναι στοιχειομετρικά ίση με την συγκέντρωση της D-ξυλόζης.

Συγκεκριμένα, σε αναγνώστη μικροσυστοιχειών SpectraMax 250 (Molecular Device) αναλύθηκαν τα εξής διαλύματα: 127 μL απεσταγμένο νερό, 50 μL δείγμα (διηθήματα ζωμού καλλιέργειας που συλλέχτηκαν σε διαφορετικούς χρόνους της ανάπτυξης του στελέχους Βασιδιομύκητα στο βιοαντιδραστήρα), 33.2 μL ρυθμιστικού διαλύματος TEA (1M, pH 7.5) συν MgCl₂ (70mM) συν NaN₃ (0.02% w/v), 33.2 μL διαλύματος NAD⁺ (105 mg) συν ATP (1.05g) και 1.7 μL διαλύματος εξοκινάσης (1000U/mL). Το συνολικό διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε και μετρήθηκε η απορρόφηση του (A1) ύστερα από τουλάχιστον 5 min, σε μήκος κύματος 340 nm και θερμοκρασία 25°C. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 1.7 μL εναιωρήματος αφυδρογονάσης της β-ξυλόζης (120 U/mL) και πολυστροφάση της ξυλόζης (4.1 mg/mL) και ύστερα από τακτικές αναδεύσεις μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος (A2) στο τέλος της αντίδρασης (~30 min).

2.6 Χημική Ανάλυση του μυκηλίου και των καρποσωμάτων

Η βιομάζα (μυκήλιο) που προήλθε από την ανάπτυξη των δύο μακρομυκήτων στο βιοαντιδραστήρα ύστερα από τη ξήρανό της, αναλύθηκε ως προς το περιεχόμενό της σε διαιτητικές ίνες, ολικές γλουκάνες (α- και β- γλουκάνες), λίπος, πρωτεΐνες και τέφρα. Παράλληλα, για συγκριτικούς ρόλους αναλύθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους στα παραπάνω συστατικά, τα αντίστοιχα φυσικά απαντώμενα καρποσώματα και των δύο μακρομυκήτων.

2.6.1 Προσδιορισμός της περιεχόμενης Υγρασίας

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης υγρασίας έγινε σύμφωνα με το AOAC πρωτόκολλο (AOAC 1995). Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, τα προς ανάλυση δείγματα ξεράθηκαν σε φούρνο στους 105°C για 17h τουλάχιστον (Mattila et al. 2002).

2.6.2 Προσδιορισμός των περιεχόμενων Πρωτεϊνών

Η μέτρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AOAC 984.13 (AOAC, 1990) με χρήση συσκευής προσδιορισμού αζώτου Kjeldhal (Büchi 321 Distillation unit, Flawwil, Switzerland), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 2.3. Η καθολικότητα, η υψηλή αποδοτικότητα και ακρίβεια που χαρακτηρίζει αυτή τη μέθοδο την καθιστά επικρατέστερη για

τον έμμεσο πρωτεϊνικό προσδιορισμό πολλών τροφίμων. Η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης είναι βασισμένη στον προσδιορισμό του συνολικού ποσού του αζώτου, υποθέτοντας ότι οι μη πρωτεϊνικές ενώσεις του αζώτου (π.χ. DNA) στα τρόφιμα βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά.

Η εκτίμηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός τροφίμου, εξαρτάται σημαντικά από το συντελεστή μετατροπής αζώτου προς πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται. Το ποσοστό του αζώτου στις περισσότερες πρωτεΐνες είναι 16% (w/w)· έτσι χρησιμοποιείται συνήθως ο συντελεστής 6.25 για να μετατρέψει την περιεκτικότητα του αζώτου σε περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Στους μύκητες, συναντάται υψηλό περιεχόμενο σε μη πρωτεϊνούχο άζωτο, ειδικά στην χιτίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, αλλά και στα ελεύθερα αμινοξέα, όπως και στα νουκλεϊκά οξέα (Miles & Chang 1997). Μόνο το 60-77% του αζώτου στους μακρομύκητες περιέχεται στις πρωτεΐνες (Danell & Eaker 1992, Fujihara et al. 1995) και έτσι ο συντελεστής μετατροπής 6.25 που χρησιμοποιείται γενικότερα στα τρόφιμα κρίνεται πολύ υψηλός για τους μακρομύκητες. Ο συντελεστής μετατροπής αζώτου προς πρωτεΐνη είναι συγκεκριμένος για κάθε είδος μακρομύκητα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας μέσος συντελεστής 4.38 (70% N x 6.25) που έχει υιοθετηθεί κιάλας από τους περισσότερους ερευνητές για την εκτίμηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των μακρομυκήτων (Crisan & Sands 1978, Miles & Chang 1997).



Εικόνα 2.3 Συσκευές (α) καύσης και (β) απόσταξης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του οργανικώς δεσμευμένου αζώτου (N%) κατά Kjeldahl στις αναλύσεις

Συγκεκριμένα, ποσότητα δείγματος (η οποία αντιστοιχούσε σε 1-2 g ξηρού προϊόντος) τοποθετήθηκε σε ειδικό γυάλινο σωλήνα καύσης και υποβλήθηκε σε θέρμανση με μίγμα θειϊκού καλίου και πυκνού θειϊκού οξέος παρουσία καταλύτη θειϊκού χαλκού (II), προκειμένου

να μετατραπεί το οργανικό άζωτο σε αμμωνιακό άζωτο. Στη συνέχεια, ο σωλήνας τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή καύσης Kjeldahl, όπου θερμαινόταν 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 τελικά σε συνθήκες έντονου βρασμού για 30 min. Η σχηματιζόμενη αμμωνία αποστάχθηκε με τη βοήθεια υδρατμών σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον, δεσμεύτηκε από διάλυμα θειϊκού οξέος ενώ το υπόλοιπο τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα καυστικού νατρίου. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και λευκός προσδιορισμός. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε οργανικό άζωτο (N%) υπολογίστηκε από την εξίσωση (1):

$$N\% = \frac{x \text{ moles}}{1000 \text{ ml}} \times \left(\frac{V_1 - V_2}{\alpha \text{ g}} \right) \text{ ml} \times \frac{14 \text{ g}}{\text{moles}} \times 100 \quad (1)$$

όπου, V_1 και V_2 οι καταναλωθέντες όγκοι του πρότυπου διαλύματος καυστικού νατρίου κατά τον κυρίως και τον λευκό προσδιορισμό αντιστοίχως, x η μοριακότητα του πρότυπου διαλύματος καυστικού νατρίου και α (g) το βάρος του δείγματος. Ο αριθμός 14 στη σχέση (1) αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του αζώτου. Ο προσδιορισμός έγινε εις διπλούν για κάθε δείγμα.

2.6.3 Προσδιορισμός του περιεχόμενου Λίπους

Ο προσδιορισμός του λίπους έγινε σύμφωνα με το AOAC πρωτόκολλο (AOAC 1995) και πραγματοποιήθηκε ύστερα από συνεχή εκχύλιση γνωστού βάρους λυοφιλιωμένου και κονιορτοποιημένου δείγματος χρησιμοποιώντας τη διάταξη Soxhlet για 6 h με κατάλληλο σύστημα διαλυτών.

Η εκχύλιση με τη διάταξη Soxhlet αποτελεί μια από τις ευρέως διαδεδομένες μεθόδους για τον προσδιορισμό του ολικού λίπους σε ξηρές τροφές. Το δείγμα προς απαλαίωση, τοποθετείται σε ένα πορώδες *cartouche* και τοποθετείται στο θάλαμο του εκχυλιστήρα, στον οποίο στο κάτω μέρος προσαρμόζεται η φιάλη απόσταξης με το διαλύτη εκχύλισης και στο πάνω ένας συμπυκνωτήρας. Καθώς η σφαιρική θερμαίνεται, ο διαλύτης εξατμίζεται και εισέρχεται στο συμπυκνωτήρα όπου οι ατμοί ψύχονται και ρέουν πίσω στο θάλαμο με το δείγμα. Ο θάλαμος του εκχυλιστήρα είναι έτσι σχεδιασμένος ώστε όταν γεμίσει, αυτόματα αδειάζει μέσω ενός πλευρικού βραχίονα-σιφωνιού πίσω στη φιάλη απόσταξης που

θερμαίνεται. Καθώς ο διαλύτης περνά από το θάλαμο που βρίσκεται το δείγμα, εκχυλίζει το λίπος, το οποίο και συγκεντρώνεται στη φιάλη απόσταξης λόγω της χαμηλής πτητικότητάς του. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται πολλές φορές (Εικ. 2.4).

Όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση, η φιάλη απόσταξης περιέχει το λίπος διαλυμένο στο διαλύτη της εκχύλισης, οπότε ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και παραλαμβάνεται το λίπος μάζας (M_{lipid}). Το ποσοστό λίπους στο αρχικό δείγμα (M_{sample}) υπολογίζεται ως :

$$\text{Λίπος (\%)} = 100 \times (M_{lipid}/M_{sample}) \quad (1)$$

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα διαλυτών: α) χλωροφόρμιο - μεθανόλη σε αναλογία 2:1 (v/v) για την εκχύλιση τόσο των ουδέτερων (π.χ. λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια) όσο και των σύνθετων λιπιδίων (π.χ. φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, λιποπρωτεΐνες) και β) εξάνιο για εκχύλιση ουδέτερων λιπιδίων (μη πολικών λιπιδίων). Γενικότερα, τα ουδέτερα λιπίδια και γενικά τα αποθηκευτικά λίπη εκχυλίζονται με σχετικά μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο, ο διαιθυλαιθέρας και το χλωροφόρμιο, αλλά για τα λιπίδια που συνδέονται με κυτταρικές μεμβράνες, καθώς αυτά εμφανίζουν πολικό χαρακτήρα, απαιτούνται πολικοί διαλύτες όπως η αιθανόλη/μεθανόλη ώστε να γίνει διάρρηξη των δεσμών υδρογόνου ή των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Ειδικότερα, το χλωροφόρμιο είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης, κυρίως για λιπίδια μεσαίας πολικότητας, και όταν αναμιγνύεται με μεθανόλη μετατρέπεται σε ένα σύστημα διαλυτών εκχύλισης με γενική ισχύ, όπως προκύπτει και από τα παραπάνω.



Εικόνα 2.4 Η διάταξη Soxhlet στην οποία έλαβαν χώρα ταυτόχρονα δύο εκχυλίσεις

2.6.4 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων επιτεύχθηκε μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία (GC) του εκχυλιζόμενου ελαίου και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης Τροφίμων του Τ.Ε.Ι. Αθήνας. Τόσο η ποιοτική όσο και η ποσοτική ανάλυση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (GC) (Agilent 6890 Series) με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εφοδιασμένος με split/splitless εισαγωγή, όπως περιγράφεται από τους Sinanoglu et al. (2011).

Η παρασκευή των FAMES των λιπιδίων έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Sinanoglu & Miniadis-Meimaroglu (1998). Τα λιπαρά οξέα των δειγμάτων των λιπιδίων μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους, με εστεροποίηση σε αλκαλικό περιβάλλον. Για την μετατροπή των ουδέτερων λιπιδίων και κυρίως των κηρών σε μεθυλεστέρες εφαρμόζεται η οξυκαταλυόμενη μεθανόλυση. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η πτητικότητα των λιπαρών οξέων. Εν συνεχεία οι μεθυλεστέρες ενίονται στον αέριο χρωματογράφο και καθώς διαπερνούν τη στήλη κατανέμονται ανάμεσα στο υλικό της στατικής φάσης και του φέροντος αερίου (He). Η κατανομή εξαρτάται από την πτητικότητα των μεθυλεστέρων και τη συγγένεια τους με τη στατική φάση. Έτσι πραγματοποιείται έκλυση των μεθυλεστέρων από την στήλη, που αν είναι πολική, διαχωρίζει τα *cis-trans* ισομερή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, τα υδρόξυ, τα ίσο- και τα αντίσο- λιπαρά οξέα κατά σειρά ελατούμενης πτητικότητας και αυξανόμενης συγγένειας προς την στατική φάση και σε μικρό χρόνο ανάλυσης, συνήθως 20-60 min.

Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης τους (Rt) με τους Rt των προτύπων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού της σχετικής αναλογίας των λιπαρών οξέων στο μετρούμενο δείγμα μέσω του ανιχνευτή F.I.D. του οποίου το σήμα εξαρτάται από τα ιόντα που παράγονται κατά τη καύση των συστατικών του δείγματος σε φλόγα υδρογόνου-αέρα και από την ύπαρξη δραστικών ομάδων (π.χ. υδροξύλιο, αμινομάδα) στις ουσίες.

Δείγμα λιπιδίων έως 50 mg εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Κατόπιν προστέθηκαν 0.75ml n-εξανίου (95%) με το εσωτερικό πρότυπο του λαυρικού οξέος στον ίδιο διαλύτη και 0.1ml KOH 2N σε μεθανόλη. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύτηκε ισχυρά για 2 min σε κυκλοαναδευτήρα. Έπειτα προστέθηκε 0.2 g Na₂SO₄ (αφυδατικό) και το σύστημα αφέθηκε προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων για περίπου 25 min. Στο

υπερκεείμενο ελήφθησαν οι μεθυλεστέρες, ενώ στο ίζημα έμεινε η γλυκερόλη και άλλα αδιάλυτα συστατικά.

Η θερμοκρασία στον αέριο χρωματογράφο προγραμματίστηκε στους 100°C για 0 min. Στην συνέχεια αυξήθηκε από τους 100°C έως τους 150°C με ρυθμό 10°C min⁻¹ και διατηρήθηκε σταθερή στους 150°C για 0 min, έπειτα αυξήθηκε από τους 150 στους 195°C με ρυθμό 2°C min⁻¹ και διατηρήθηκε στους 195°C για 5 min. Ακολούθησε αύξηση από τους 195°C στους 210°C με ρυθμό 1°C min⁻¹. Διατηρήθηκε στους 210°C για 0 min και τελικά αυξήθηκε από τους 210°C στους 240°C με ρυθμό 10°C min⁻¹ όπου διατηρήθηκε σε αυτήν την θερμοκρασία για 5min. Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 55.50 min (Sinanoglou et al. 2011). Το λογισμικό Hewlett–Packard Chem Station Software χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των εμβαδών των κορυφών και των Rt. Η σχετική αναλογία των λιπαρών οξέων που προσδιοριστήκαν στα δείγματα, έγινε σύμφωνα με τους Sinanoglou et al. (2011).

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, ενώ για κάθε μία προσδιορίστηκε ο μέσος όρος τους μαζί με την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD). Τα δεδομένα σχετικά με το περιεχόμενο των λιπαρών οξέων αναλύθηκαν με τις δοκιμές One-Way ANOVA Post Hoc ενώ οι σε ζεύγη πολλαπλές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με τη στατιστική δοκιμή σημαντικότητας Tukey's. Οι πιθανότητες (P<0.05) θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 10.0 για τα Windows.

2.6.5 Προσδιορισμός της περιεχόμενης Τέφρας

Η τέφρα είναι το υπόλειμμα που παραμένει μετά την καύση στους 525°C και προσεγγίζει το ανόργανο περιεχόμενο. Ο προσδιορισμός της τέφρας έγινε σύμφωνα με το AOAC πρωτόκολλο (AOAC 1995). Η τέφρα προσδιορίστηκε με πύρωση (~550°C) προζυγισμένου δείγματος για 12 ώρες. Η περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά εκφράστηκε σε % ποσοστό επί του ξηρού βάρους δείγματος.

2.6.6 Προσδιορισμός των Ολικών Διαιτητικών Ινών (TDF)

Ο προσδιορισμός των περιεχόμενων ολικών διαιτητικών ινών (TDF) στα καρποσώματα και στη βιομάζα (μυκήλιο) που προέκυψε από την ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων στις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ειδικό εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα (kit) K- TDFR 12/05 (Total Dietary Fibre Assay Procedure) της Megazyme

(Ireland), σε συμφωνία με την ενζυμική-βαρομετρική μέθοδο AOAC 991.43, που ακολουθεί τις αρχές που περιγράφονται από τους Prosky et al. (1988, 1992) και Cheung (1996). Το βασικό πλεονέκτημα που προκύπτει από τη χρήση του συγκεκριμένου σκευάσματος της Megazyme για τον προσδιορισμό των ολικών διαιτητικών ινών είναι ότι περιέχει υψηλής καθαρότητας ένζυμα, απαλλαγμένα από οποιαδήποτε δράση αλληλεπίδρασης, ενώ ταυτόχρονα οι ενεργότητές τους είναι προκαθορισμένες.

Συνοπτικά, οι ολικές διαιτητικές ίνες προσδιορίζονται σε διπλά δείγματα ξηραμένου υλικού. Τα δείγματα αρχικά, επωάζονται στους 100°C με τη θερμοσταθερή α -αμυλάση ώστε να γίνει ζελατινοποίηση, υδρόλυση και αποπολυμερισμός του αμύλου. Ακολουθεί επώαση στους 60°C με *πρωτεάση* (για τη διαλυτοποίηση και τον αποπολυμερισμό των πρωτεϊνών) και *αμυλογλυκοζιδάση* (για να υδρολυθούν τα κλάσματα του αμύλου σε γλυκόζη). Τέλος, προστίθεται ο τετραπλάσιος όγκος σε αιθανόλη ώστε να γίνει καταβύθιση των διαλυτών ινών και να απομακρυνθούν οι αποπολυμερισμένες πρωτεΐνες και η γλυκόζη (από το άμυλο). Το ίζημα στη συνέχεια διηθείται, εκπλένεται με 78% αιθανόλη, 95% αιθανόλη και ακετόνη, ξηραίνεται και ζυγίζεται (Εικ. 2.5). Το ένα από τα διπλά δείγματα αναλύεται για πρωτεΐνες με τη μέθοδο Kjeldahl (παρ. 2.6.2) και το άλλο τοποθετείται σε φούρνο στους 525°C για τον προσδιορισμό της τέφρας (παρ. 2.6.5), με σκοπό τη διόρθωση της τιμής που προκύπτει. Οι ολικές διαιτητικές ίνες προκύπτουν από τη διαφορά του βάρους των πρωτεϊνών και της τέφρας από το βάρος του διηθημένου και ξηραμένου ιζήματος.

Η μαθηματική εξίσωση (1) για την εύρεση της περιεκτικότητας ολικών διαιτητικών ινών (%) στο δείγμα παρατίθεται παρακάτω:

$$\text{TDF (\%)} = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - p - A - B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \times 100 \quad (1)$$

όπου m_1 και m_2 τα βάρους του δείγματος 1 και 2 αντίστοιχα, R_1 και R_2 το διηθημένο και ξηρό βάρος από το m_1 και m_2 αντίστοιχα, A το βάρος της τέφρας από το R_1 , p το βάρος των πρωτεϊνών από το R_2 και B το τυφλό της μεθόδου που είναι:

$$B = \frac{BR_1 + BR_2}{2} - BP - BA \quad (2)$$

όπου BR_1 και BR_2 το βάρος που απέμεινε από το τυφλό 1 και 2 αντίστοιχα, BP το βάρος των πρωτεϊνών από το BR_1 και BA το βάρος της τέφρας από το BR_2 .



Εικόνα 2.5 Το χωνευτήριο με τις ολικές διαιτητικές ίνες όπως παραλαμβάνεται μετά τη ξήρανση

2.6.7 Προσδιορισμός των Ολικών Γλουκανών (α - και β - γλουκάνες)

Ο προσδιορισμός των περιεχόμενων γλουκανών στα καρποσώματα και στη βιομάζα που προέκυψε από την ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων στις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες έγινε σύμφωνα με εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα (Kit), K-YBGL 04/2008 (Mushroom and yeast beta-glucan) της Megazyme (Ireland). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εξής αρχή: οι 1,3:1,6- β -D-γλουκάνες και οι 1,3- β -D-γλουκάνες και οι α -γλουκάνες διαλυτοποιούνται σε πυκνό (37 %, 10 N) υδροχλωρικό οξύ και μετά υδρολύονται εκτενώς με 1.3 N HCl στους 100°C για 2 h. Η υδρόλυση σε D-γλυκόζη ολοκληρώνεται με επώαση με ένα μίγμα *exo*-1,3- β -γλουκανάσης και β -γλυκοζιδάσης υψηλής καθαρότητας. Αν και κάποιες β -γλουκάνες είναι εύκολα διαλυτές σε ζεστό νερό ή ζεστό KOH, αυτοί οι διαλύτες δεν είναι αποτελεσματικοί κατά τη διαλυτοποίηση των β -γλουκανών από τις ζύμες ή τους μακρομύκητες. Η ανάλυση αυτών των γλουκανών απαιτεί να έχει προηγηθεί μερική όξινη υδρόλυση για την «απομάκρυνση» των ιδιοτήτων ζελατινοποίησης και των ομοιοπολικών δεσμών με άλλους πολυσακχαρίτες (π.χ. χιτίνη) ή πρωτεΐνες. Όσον αφορά την ακρίβεια της συγκεκριμένου μεθόδου, συνήθως τα τυπικά σφάλματα που προκύπτουν είναι <5%. Η περιεκτικότητα σε β -γλουκάνες προκύπτει από την αφαίρεση της περιεκτικότητας των α -γλουκανών από τις ολικές γλουκάνες.

2.6.8 Προσδιορισμός των Εξωκυτταρικών Πολυσακχαριτών (EPS)

Ο προσδιορισμός των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) οι οποίοι εκκρίθηκαν από τα μυκήλια των μυκήτων στο περιβάλλον υγρό της καλλιέργειας, διεξάχθηκε σύμφωνα με τους

Kim et al. (2002). Συγκεκριμένα, η συλλεγόμενη βιομάζα που προέκυψε από την ανάπτυξη των μελετώμενων στελεχών Βασιδιομυκήτων στο βιοαντιδραστήρα, φυγοκεντρήθηκε στα 10000 g για 20min και στα υπερκείμενα προστέθηκε τετραπλός όγκος απόλυτης αιθανόλης. Τα διαλύματα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν για 18 h στους 4°C ώστε να γίνει η καταβύθιση των πολυσακχαριτών. Το ίζημα υπέστη λυοφιλίωση στη συσκευή εξάχνωσης υπό κενό και στη συνέχεια προσδιορίστηκε το βάρος του.

2.7 Μελέτη των Βιοδραστικών Μεταβολιτών

2.7.1 Εκχύλιση

Η ανακτώμενη βιομάζα από την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα εκχυλίστηκε στη συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) διαδοχικά με κυκλοεξάνιο (c-Hex), διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), μεθανόλη (MeOH) και απιονισμένο νερό (H₂O). Για την περίπτωση του *G. australe* η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε διαχωριστική χοάνη χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc)- (c-Hex).

2.7.1.1 Εκχύλιση της βιομάζας του *P. ostreatus* με την τεχνική ASE

Η συσκευή ASE (Accelerated Solvent Extraction) είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα για την εκχύλιση οργανικών ουσιών από ποικιλία στερεών και ημι-στερεών δειγμάτων. Πρόκειται για μια στερεή-υγρή εκχύλιση που πραγματοποιείται σε αυξημένη θερμοκρασία, συνήθως ανάμεσα στους 50 έως 100°C και σε πιέσεις μεταξύ 10 και 15 MPa. Η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών και η εφαρμογή πίεσης συντελεί στην επιτάχυνση της διαδικασίας παραλαβής των ουσιών. Η πίεση ασκείται στο δοχείο εκχύλισης του δείγματος για να διατηρήσει τον θερμαινόμενο διαλύτη στην υγρή του φάση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον, η ασκούμενη πίεση επιτρέπει την ταχύτερη πλήρωση του θαλάμου εκχύλισης και βοηθά το διαλύτη να εισχωρήσει αποτελεσματικότερα στους ιστούς του δείγματος. Οι αυξημένες θερμοκρασίες ενισχύουν την ικανότητα διάχυσης του διαλύτη με αποτέλεσμα την καλύτερη κινητική της εκχύλισης. Μετά τη παραμονή του για ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα σε σταθερή θερμοκρασία, το εκχύλισμα εκρέει από το δοχείο εκχύλισης στο δοχείο συλλογής και είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση (Σχ. 2.1).

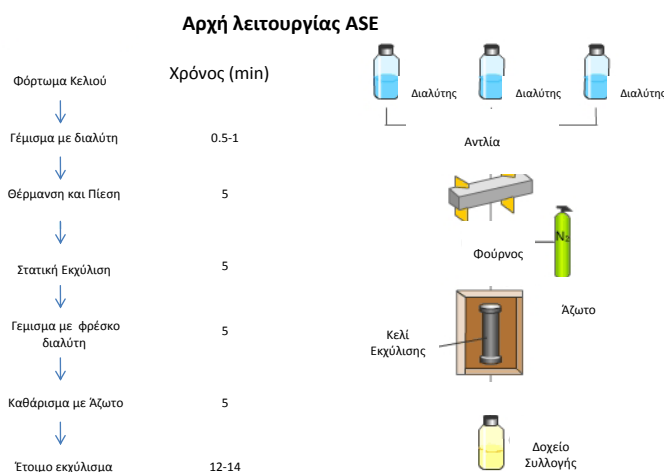
Τα κυριότερα λειτουργικά μέρη της συσκευής ASE 300 είναι το τμήμα των δοχείων διαλυτών, ο δίσκος υποδοχής των θαλάμων εκχύλισης, ο δίσκος των φιαλών συλλογής των

παραγόμενων εκχυλισμάτων και οι εν λόγω φιάλες, το τμήμα του κλιβάνου για τη ρύθμιση της θερμοκρασία και ο μηχανισμός της βελόνας (Εικ.2.6).



Εικόνα 2.6 Συσκευή εκχύλισης ASE 300 που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

Η εκχύλιση με τη τεχνική ASE πλεονεκτεί έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών εκχύλισης. Ένας από τους λόγους είναι ότι ο χρήστης μπορεί να επιλέξει ανάμεσα σε τέσσερα διαφορετικά δοχεία διαλυτών για τις εκχυλίσεις. Ακόμα, η συσκευή μπορεί να εκχυλίσει με μίγμα δύο, τριών ή τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, αρκεί αυτοί να σχηματίζουν μία φάση. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα εναλλαγής των διαλυτών ανάμεσα στις εκχυλίσεις με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ταχεία διαδοχική εκχύλιση ενός ή περισσότερων δειγμάτων με διαφορετικούς διαλύτες.



Σχήμα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της συσκευής ASE

Σημαντικό πλεονέκτημα είναι επίσης η δυνατότητα εκχύλισης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα (παραλαβή όλου του εύρους των μεταβολιτών σε διάστημα 4 h). Τέλος, λόγω της εφαρμογής καθορισμένων συνθηκών εκχύλισης (θερμοκρασία, πίεση, χρόνος εκχύλισης, όγκος διαλύτη εκχύλισης, όγκος διαλύτη έκπλυσης κ.ά.) τα παραλαμβανόμενα εκχυλίσματα έχουν σταθερή ποιοτική και ποσοτική σύσταση όταν το εκχυλιζόμενο υλικό παραμένει το ίδιο.

Ένα μέρος της συλλεγόμενης βιομάζας από την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα εκχυλίστηκε στην συσκευή ASE αφού είχε προηγηθεί η λειοφιλιώσή της στη συσκευή εξάχνωσης υπό κενό. Συνολικά εκχυλίστηκαν 131 g ξηρής βιομάζας που τοποθετήθηκε στις ειδικές μεταλλικές οβίδες της συσκευής και εκχυλίστηκε διαδοχικά με c-Hex, CH₂Cl₂, MeOH και H₂O. Οι συνθήκες της διαδικασίας εκχύλισης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης συλλέχτηκαν τα αντίστοιχα τέσσερα κλάσματα, συμπυκνώθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστήρα νερού, ζυγίστηκαν και αναλύθηκαν.

Πίνακας 2.3 Συνθήκες λειτουργίας ASE

Παράμετροι	c-Hex	CH ₂ Cl ₂	MeOH	H ₂ O
Θερμοκρασία (°C)	40	70	70	50
Πίεση (PSi)	1500	1500	1500	1500
Στατική Φάση Εκχύλισης (min)	20	20	20	20
Χρόνος Συλλογής Εκχυλίσματος (Flushing time) (sec)	60	60	60	60
Όγκος Διαλύτη Έκπλυσης (mL)	60	60	60	60
Χρόνος αναμονής (sec)	100	100	100	100

2.7.1.2 Εκχύλιση της βιομάζας του *G. australe*

Η συλλεγόμενη βιομάζα από την ανάπτυξη του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα εκχυλίστηκε. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με σκοπό τη διάρρηξή τους, με βρασμό για 1h σε διάλυμα αιθανόλης 50% (v/v) παρουσία 5% (w/v) KOH χρησιμοποιώντας κάθετο σωλήνα επαναρροής (reflux). Ακολούθησε διήθηση, απομάκρυνση των διαρρηγνυόμενων κυττάρων, παραλαβή του διηθήματος και περεταίρω διαχωρισμό του

χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών EtOAc- c-Hex (1:3 v/v), 3 φορές. Η εκχύλιση γινόταν στο εσωτερικό διαχωριστικής χοάνης με ανάδευση. Ακολούθησε συλλογή της πάνω οργανικής φάσης (εκχύλισμα). Στη συνέχεια, για 500 mL εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν 150 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl (υδρόφιλο) και αφού προηγήθηκε ανάδευση στη χοάνη, σχηματίστηκαν πάλι δύο φάσεις, όπου συλλέχθηκε η πάνω και αποχύθηκε η κάτω υδατική φάση. Για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ύδατος στο εκχύλισμα προστέθηκε Na_2SO_4 και αφού προηγήθηκε διήθηση για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων κόκκων Na_2SO_4 , έγινε συμπύκνωση του ολικού εκχυλίσματος σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, ζύγισμα και ανάλυση.

2.7.2 Απομόνωση και Ταυτοποίηση των Μεταβολιτών

Για τον ποιοτικό έλεγχο των ολικών εκχυλισμάτων αλλά και των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφική ανάλυσή τους, καθώς και για την απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών, χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές που περιγράφονται στα παρακάτω κεφάλαια.

2.7.2.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

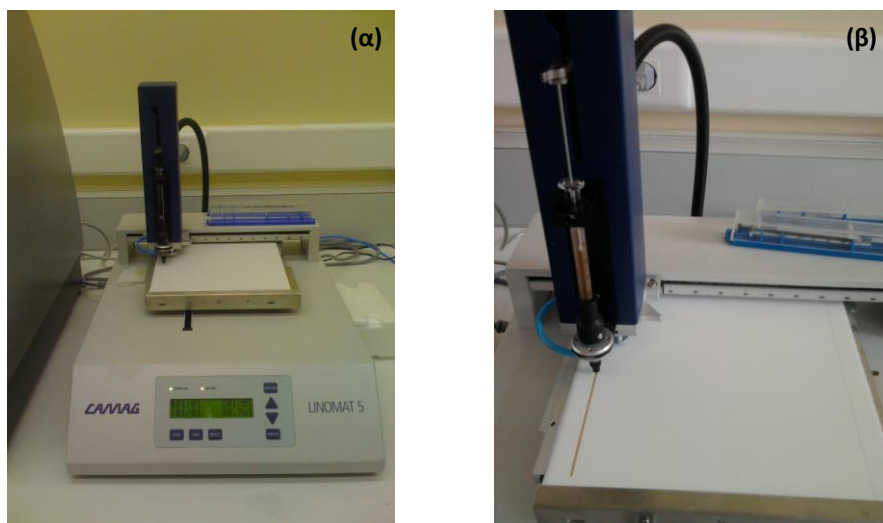
Για τον ποιοτικό έλεγχο των ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με στατική φάση:

- α) Γέλη οξειδίου του πυριτίου (Kieselgel 60 F_{254} , Merck) σε φύλλα αλουμινίου διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία)
- β) Γέλη οξειδίου του πυριτίου αντίστροφης φάσης (RP-18 F_{254S}) σε φύλλα αλουμινίου διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία).

Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), σε μήκη κύματος 254nm και 365nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό. Για το μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα: το διάλυμα (A) που περιείχε βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% (w/v) σε μεθανόλη και το διάλυμα (B) που περιείχε πυκνό H_2SO_4 5% (v/v) σε μεθανόλη (Stahl 1969). Ίσοι όγκοι αναμιγνύονταν αμέσως πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα θερμαίνονταν για 5 min στους 105°C.

2.7.2.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η TLC εκτός από αναλυτικούς χρησιμοποιήθηκε και για παρασκευαστικούς σκοπούς. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε γέλη οξειδίου του πυριτίου (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) σε γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική και παρασκευαστική χρωματογραφία). Με την παρασκευαστική TLC, το δείγμα δεν τοποθετείται με μορφή κηλίδων, αλλά ως μια ενιαία οριζόντια λεπτή γραμμή μέσω της αυτόματης συσκευής παρασκευαστικής TLC (Linomat 5, CAMAG), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 2.7 (α, β). Μετά την ανάπτυξη της πλάκας στο θάλαμο σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών που είχε προηγουμένως ελεγχτεί με αναλυτική TLC, η ζώνες της στατικής φάσης που φαίνεται ότι περιέχουν τις επιθυμητές ουσίες αποξύνονται από την επιφάνεια της πλάκας και εκχυλίζονται με κατάλληλο διαλύτη στο θάλαμο υπερήχων για 15min. Η στατική δε φάση απομακρύνεται με διήθηση και παραλαμβάνονται οι ουσίες προς ταυτοποίηση.



Εικόνα 2.7 (α, β). Φόρτωση του δείγματος προς ανάλυση στην αυτόματη συσκευή παρασκευαστικής TLC (Linomat 5, CAMAG)

2.7.2.3 Υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (VLC)

Πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία στήλης ανοιχτού τύπου υπό κενό (VLC) (Hostettmann et al. 1998), με στατική φάση γέλη οξειδίου του πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60, 40-60 μm) ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε σύστημα από c-Hex : EtOAc σε αυξανόμενη αναλογία.

Για την προετοιμασία του στερεού δείγματος προς διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό depot). Το ξηρό ολικό εκχύλισμα προς ανάλυση αφού πρώτα διαλύθηκε καλά σε c-Hex και EtOAc (3:1, v/v), προστέθηκε σε αυτό γέλη οξειδίου του πυριτίου (Silica gel 60H, 40-60 μm) διπλάσιου βάρους από το ξηρό βάρος του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού, οπότε το δείγμα προσροφήθηκε στη γέλη σχηματίζοντας μια λεπτόκοκκη σκόνη (ξηρό depot). Το δείγμα λοιπόν που φέρεται στο ξηρό depot διασπάρθηκε ομοιόμορφα πάνω στην Silica gel 60 που έχει προηγουμένως τοποθετηθεί σε ένα χωνί Buchner το οποίο συνδεόταν μέσω κατάλληλης κωνικής φιάλης με την παροχή του κενού (Εικ. 2.8). Ακολούθησε η πρόσθεση των διαλυτών και η συλλογή κλασμάτων. Με τη βοήθεια της TLC, γίνονταν ποιοτικός έλεγχος των συστατικών του εκχυλίσματος και ανάλογα άλλαζε η αναλογία του χρησιμοποιούμενου συστήματος διαλυτών με σκοπό να εκλουστούν πρώτα τα άπολα και εν συνέχεια τα πολικά μόρια.



Εικόνα 2.8 Υγρή χρωματογραφία στήλης ανοιχτού τύπου υπό κενό (VLC) που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

2.7.2.4 Παρασκευαστική Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

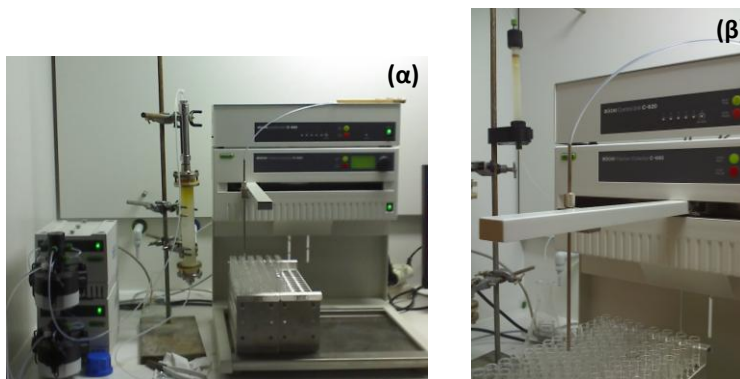
Για την παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Thermo Finnigan (San Jose, USA), τα μέρη της οποίας είναι: αντλία SpectraSystem P4000, απαερωτής SpectraSystem 1000, αυτόματος δειγματολήπτης SpectraSystem AS3000 και ανιχνευτής πολλαπλής δίοδου (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Το δείγμα εκχύθηκε τμηματικά ανά 40 μL σε χρωματογραφική στήλη A23 Supelco HS-C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm) (Discovery). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βαθμωτή έκλυση

(gradient) χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση, νερό:ακετονιτρίλιο (98:2→2:98), ενώ η ροή ρυθμίστηκε στα 1.2 mL/min. Ο όγκος της έκχυσης ήταν 10 μ L. Η ανίχνευση έγινε στα 254 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού ChromQuest 2.1.

2.7.2.5 Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC)

Στην υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC) χρησιμοποιείται ως στατική φάση πυριτίο υπό τη μορφή γέλης με μικρότερο μέγεθος κόκκων (20-40 μ m), ενώ η πίεση που αναπτύσσεται είναι μεγαλύτερη (10-20 bar) με αποτέλεσμα η διαχωριστική ικανότητα να είναι καλύτερη.

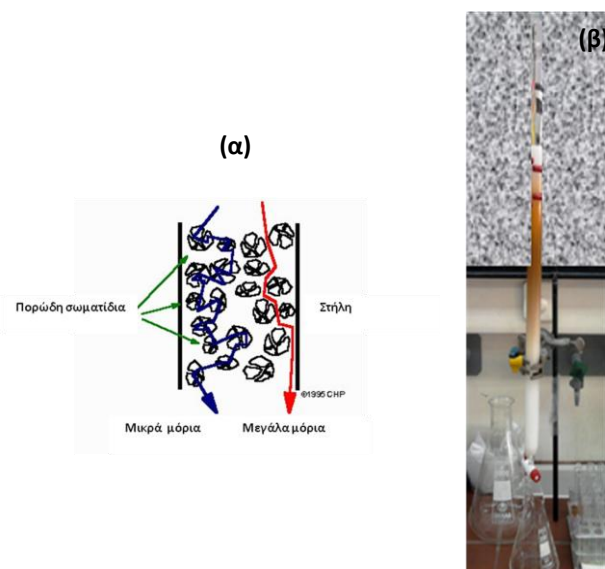
Για την παρούσα μελέτη, η ανάλυση σε MPLC πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Seracore με αντλία τύπου Büchi C-650. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60, 20-40 μ m) ενώ η έκλυση ήταν βαθμωτή (gradient) χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση σύστημα από CH₂Cl₂ και MeOH σε αυξανόμενη αναλογία. Το δείγμα προς ανάλυση προσροφήθηκε πρώτα σε γέλη οξειδίου του πυριτίου (Silica gel 60) με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (ξηρό derot). Όταν κρίθηκε απαραίτητο, το ξηρό derot τοποθετήθηκε σε προσθήκη, πάνω από την κύρια στήλη της ανάλυσης. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες στήλες ανάλογα με το βάρος του δείγματος που αναλυόταν. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε γυάλινη (36/920-044042) διαμέτρου 36mm και μήκους 920mm, ή πλαστική (Cartridge PP 12/150) διαμέτρου 12mm και μήκους 150mm (Εικ. 2.9 α, β). Η ροή του διαλύτη κυμαινόταν από 10-20 mL/min, ενώ η μέγιστη πίεση είχε οριστεί στα 10.0 bar. Στο τέλος της ανάλυσης γινόταν πάντα ξέπλυμα της στήλης με 100% MeOH.



Εικόνα 2.9 (α, β). Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC) με αυτόματο κλασματοσυλλέκτη που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

2.7.2.6 Υγρή χρωματογραφία ανοιχτού τύπου, μοριακού αποκλεισμού

Η υγρή χρωματογραφία ανοιχτού τύπου, μοριακού αποκλεισμού ή μοριακής διήθησης (molecular exclusion chromatography) είναι γνωστή και ως χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής-γέλης (Gel filtration chromatography). Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του μείγματος και της στατικής φάσης. Η υγρή φάση διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή, το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετό μικρό, ώστε να επιτρέπει την είσοδο στο δίκτυο της πηκτής μόνο των μορίων μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια μεγάλου μεγέθους. Έτσι, τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους μπαίνουν στο δίκτυο αργούν να εκλουστούν από τη στήλη, αφού χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για να τα παρασύρει. Έτσι, τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μόρια μεγάλου μεγέθους να εξέρχονται πρώτα (Εικ.2.10α). Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ανάλογα με το μέγεθος των μορίων τους. Η στατική φάση αποτελείται από γέλη πολυσακχαριτών (Sephadex) που δημιουργούν δομή με πόρους συγκεκριμένου μεγέθους. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με επιτυχία στο διαχωρισμό ουσιών με μεγάλες διαφορές στο μοριακό τους βάρος.

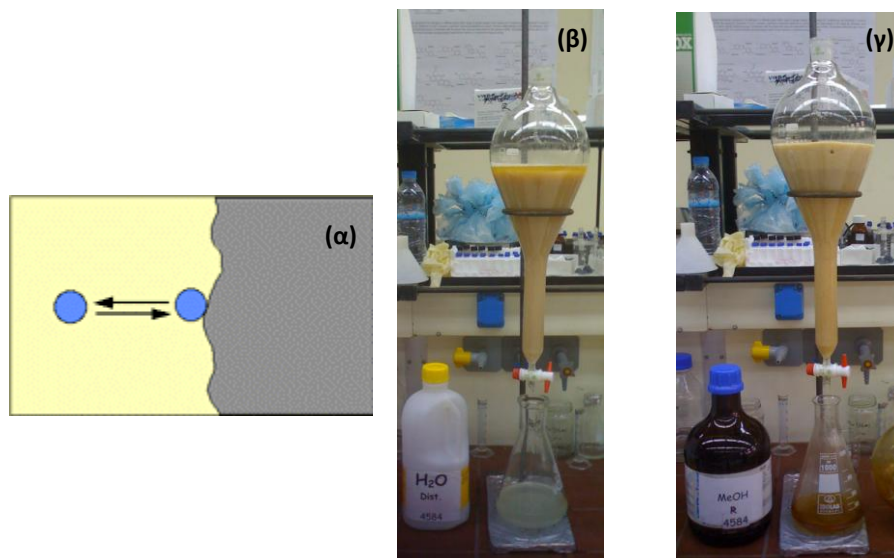


Εικόνα 2.10 (α) Αναπαράσταση της αρχής της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και **(β)** Στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υγρό Sephadex LH-20 που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε για πληρωτικό υγρό Sephadex LH-20, γέλη υδροξυπροπυλωμένης δεξτράνης (Pharmacia Fine Chemicals). Οι κόκκοι είχαν μέγεθος από 25 έως 100μ. Πριν από τη χρήση αφέθηκε να διογκωθεί με το διαλύτη έκλουσης επί 24 ώρες. Ακολούθως, φέρεται στη στήλη και εκπλένεται με τον ίδιο διαλύτη πέντε φορές (αντενδείκνυται η μηχανική και κυρίως η μαγνητική ανάδευση, διότι οι κόκκοι καταστρέφονται). Ως κινητή φάση για όλες τις αναλύσεις που έγιναν με χρωματογραφία γέλης χρησιμοποιήθηκε MeOH (Εικ. 2.10β).

2.7.2.7 Χρωματογραφία Προσρόφησης

Κατά την χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography) τα συστατικά του μείγματος αλληλεπιδρούν (προσροφούνται) στην επιφάνεια σε ορισμένες θέσεις της επιφάνειας της στερεής, συνήθως στατικής φάσεως (Εικ. 2.11α).



Εικόνα 2.11 (α) Αναπαράσταση της αρχής της χρωματογραφίας προσροφήσεως, **(β, γ)** Διαχωριστική χοάνη με ρητίνη (XAD-4) που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο με κινητή φάση H₂O και MeOH αντίστοιχα, για την παραλαβή του υδατικού (με σάκχαρα) και μεθανολικού κλάσματος (με φαινολικές ουσίες)

Οι ρητίνες που συνήθως χρησιμοποιούνται ως στατική φάση γενικά παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο συγγένειας με μόρια με συζυγείς διπλούς δεσμούς ή με δισδιάστατα αρωματικά συστήματα. Αυτή η ιδιότητά τους, τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα μέσα για τον διαχωρισμό πολλών διαφορετικών τύπων φυσικών προϊόντων όπως των πολυφαινολών. Τα

προσροφητικά πολυμερή έχουν μεγάλους πορώδους δομές, κυρίως στυρενικού ή ακρυλικού τύπου, των οποίων οι εσωτερικές επιφάνειες μπορούν και προσροφούν κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων και μετά να προκαλούν την εκροή διαφόρων χημικών ουσιών, ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται. Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι επιθυμητές ουσίες βρίσκονται διαλυμένες στο νερό ή μπορούν να διαλυθούν σε μείγματα νερού αλκοόλης. Το διάλυμα κινείται μέσω μια στήλης που περιέχει τον ειδικό τύπο και την κατάλληλη ποσότητα της προσροφητικής ρητίνης, και τα επιθυμητά μόρια (π.χ. πολυφαινόλες) επιλεκτικά προσροφώνται στην επιφάνεια της ρητίνης. Στην συνέχεια η ρητίνη ξεπλένεται με ένα λιγότερο πολικό διαλύτη (π.χ. EtOH), οπότε τα προσροφημένα μόρια εισέρχονται στην κινητή φάση και έτσι ανακτώνται στο κλάσμα που εκρέει από την ρητίνη.

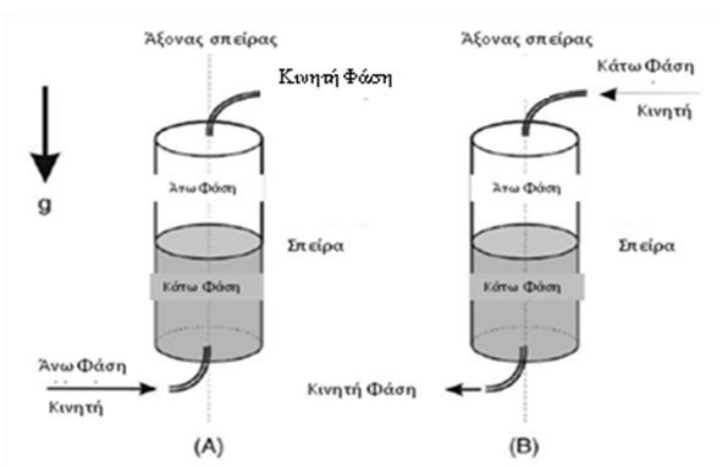
Η στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη χρωματογραφία προσρόφησης ήταν ρητίνη XAD-4 (Rohm & Haas) με σκοπό τον διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών από τα σάκχαρα στο μεθανολικό εκχύλισμα. Αρχικά, σε μεγάλη διαχωριστική χοάνη προστέθηκε η ρητίνη και ξεπλύθηκε με απιονισμένο H₂O (x 3 φορές) ανακινώντας τη χοάνη καλά κάθε φορά για πλήρη διαβροχή της ρητίνης. Στην συνέχεια, με MeOH (x 3 φορές) έγινε η ενεργοποίηση της ρητίνης. Ακολούθησε η διαβροχή της ρητίνης πάλι με απιονισμένο H₂O (x 3 φορές), ώστε η ρητίνη να επανέλθει στην υδατική φάση. Το δείγμα προς διαχωρισμό αφού είχε προηγουμένως διαλυθεί σε H₂O, προστέθηκε πάνω στη ρητίνη. Με ροή 5-8 mL/min, συλλέχτηκε το υδατικό αυτό κλάσμα στο οποίο περιέχονταν κυρίως σάκχαρα (Εικ. 2.11β). Με νερό ξεπλύθηκε καλά η ρητίνη διατηρώντας την παραπάνω ροή, και αφού στέγνωσε καλά, περνώντας MeOH, συλλέχτηκε το κλάσμα στο οποίο περιέχονταν οι φαινολικές ουσίες (μεθανολικό κλάσμα) (Εικ. 2.11γ). Στο τέλος, ξεπλύθηκε καλά η ρητίνη με H₂O (Anastasiadi et al. 2009).

2.7.2.8 Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (FCPC)

Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντριση (Fast Centrifugal partition chromatography, FCPC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη αναμειγνυόμενων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μια παραμένει στατική, ενώ η άλλη αποτελεί την κινητή φάση. Η όλη διαδικασία επιτελείται μέσα σε σπειροειδή στήλη η οποία είναι πληρωμένη με την στατική φάση (όπου είναι διαλυμένο το προς ανάλυση μίγμα), ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής (Σχ. 2.2).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος με βάση τους συντελεστές κατανομής τους στις δυο υγρές φάσεις. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, παρασύρει τα συστατικά του μίγματος με διαφορετική ταχύτητα το καθένα και ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής τους, κάνοντας έτσι δυνατό τον διαχωρισμό και την απομόνωση τους.

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο βασικούς τύπους ανάλογα με τον τρόπο που επιτυγχάνεται η ισορροπία στο σύστημα: το Σύστημα Υδροστατικής Εξισορρόπησης (HSES) και το Σύστημα Υδροδυναμικής Εξισορρόπησης (HDES). Το δεύτερο είναι αυτό που εφαρμόζεται στους διαχωρισμούς με τη συσκευή 'Kromaton FCCPC', την οποία διαθέτει το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων (Εικ. 2.12). Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι συσκευών για την εκτέλεση διαχωρισμών FCCPC, τα βασικά μέρη τα οποία απαντώνται στις περισσότερες από αυτές είναι η αντλία για τη διοχέτευση του διαλύτη, ένα απλό σύστημα εισαγωγής, ένας ανιχνευτής, ένας καταγραφέας και μία περιστρεφόμενη στήλη. Η τελευταία αποτελεί το κύριο μέρος της συσκευής.



Σχήμα 2.2 Παράσταση στήλης υγρής - υγρής χρωματογραφίας. **A)** Στατική η κάτω φάση **B)** Στατική η άνω φάση

Η στήλη συνήθως είναι κατασκευασμένη από έναν ελικοειδή σωλήνα, ο οποίος είναι τοποθετημένος κυλινδρικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα, σχηματίζοντας πολλαπλές στοιβάδες από σπείρες. Ο σωλήνας περιστρέφεται τόσο γύρω από τον κεντρικό άξονα όσο και γύρω από τον άξονά του. Η κίνηση αυτή προκαλεί έντονη ανάδευση των δύο φάσεων και μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία διαδοχικής ανάμειξης και εξισορρόπησης, η οποία συμβαίνει

13 φορές το λεπτό. Οι σπείρες μπορούν να χαρακτηριστούν σαν να έχουν «κεφαλή» και «ουρά». Ως «κεφαλή» ορίζεται το άκρο στο οποίο θα κινηθεί μία σταγόνα όταν η σπείρα περιστρέφεται. Όταν αλλάζει η κατεύθυνση περιστροφής οι θέσεις «κεφαλή» και «ουρά» αντιστρέφονται. Αύξηση του αριθμού των μονάδων κατανομής επιτυγχάνεται με αύξηση του αριθμού των σπειρών, με μείωση της εσωτερικής διαμέτρου της σπειροειδούς στήλης και με μείωση της διαμέτρου της έλικας.

Η FCPC προσφέρει διακριτά πλεονεκτήματα για το διαχωρισμό, απομόνωση και καθαρισμό των ουσιών ενός μίγματος, συγκρινόμενο με παραδοσιακές υγρές-στερεές μεθόδους διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως, διότι δεν απαιτεί τη χρήση στερεής στατικής φάσης και επομένως η πιθανότητα αμετάκλητης κατακράτησης ουσιών αποκλείεται. Έτσι, χρωματογραφούνται και ανακτώνται σχεδόν το 100% των ουσιών του μίγματος. Ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε διφασικό σύστημα. Επομένως, η επιλογή του κατάλληλου συστήματος μπορεί να γίνει μέσα από ένα μεγάλο αριθμό συστημάτων, τα οποία μπορούν να προκύψουν από το συνδυασμό πληθώρας διαλυτών. Επίσης, το FCPC μπορεί να προσαρμοστεί σε μεγάλης κλίμακας, συνεχείς διαχωρισμούς. Επιπλέον, η αλλοίωση ευαίσθητων πολύτιμων ουσιών, η οποία συμβαίνει συχνά όταν χρησιμοποιούνται οι συνηθισμένες χρωματογραφικές στήλες, είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη στις ήπιες συνθήκες λειτουργίας της μεθόδου FCPC. Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί ότι η ανάλυση με FCPC δεν απαιτεί μεγάλη κατανάλωση διαλυτών, στην οποία συμβάλλει και το γεγονός ότι το ίδιο ζεύγος διαλυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αντίστροφης φάσης έκλυση. Τέλος, η διαδικασία εκτελείται σε υγρές φάσεις και σε κλειστό σύστημα. Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις είναι ελάχιστες και οι διαλύτες μπορούν να ανακτηθούν εξολοκλήρου και να ανακυκλωθούν.



Εικόνα 2.12 Συσκευή Kromaton FCPC που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

Η επιλογή συστήματος διαλυτών αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο στη διαδικασία διαχωρισμού. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η πολικότητα των συστατικών του μίγματος και η διαλυτότητά τους. Οι διαλύτες που θα συνδυασθούν θα πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: α) να σχηματίζουν διφασικό σύστημα, β) να διαθέτουν μικρό χρόνο εξισορρόπησης (μικρότερο των 30 sec), γ) οι όγκοι των δύο φάσεων να είναι περίπου ίσοι, δ) να διαλύουν πλήρως το δείγμα (το FCPC είναι παρασκευαστική τεχνική και γι' αυτό το επιλεγόμενο σύστημα θα πρέπει να διαλύει μεγάλες ποσότητες δείγματος) και ε) οι τιμές των συντελεστών κατανομής των ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0.2 και 5.0 (ιδανική περίπτωση να πλησιάζουν την τιμή 1.0).

Πρώτο και βασικό στάδιο της διαδικασίας επιλογής συστήματος αποτελεί ο βιβλιογραφικός έλεγχος και συγκεκριμένα η αναζήτηση των συστημάτων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομόνωση ουσιών που ανήκουν σε κατηγορίες ανάλογες με αυτές που περιέχονται στο προς ανάλυση δείγμα. Εναλλακτικά, μπορεί να επιλεγούν ως σημείο έναρξης της διαδικασίας τα κλασικά συστήματα χλωροφόρμιο/μεθανόλη/νερό (πολικό) και η-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη/νερό (λιγότερο πολικό) σε ποικίλες αναλογίες των διαλυτών μέχρι να επιτευχθεί μια ικανοποιητική κατανομή του δείγματος ανάμεσα στις δυο φάσεις. Στη συνέχεια, συστήματα που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία μπορεί να ελεγχθούν είτε με TLC είτε με HPLC. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με TLC. Παρόλο που στην TLC εκτός από κατανομή λαμβάνει χώρα και προσρόφηση, υπάρχουν ορισμένες παραδοχές : α) όταν ως διαλύτης ανάπτυξης χρησιμοποιείται η οργανική φάση του διφασικού συστήματος, οι τιμές R_f των ουσιών του δείγματος θα πρέπει να κυμαίνονται από 0.2 ως 0.5, β) όταν μία μικρή ποσότητα του δείγματος κατανέμεται ανάμεσα στις δύο φάσεις του συστήματος των διαλυτών, η TLC είναι χρήσιμη για τον έλεγχο του καταμερισμού ανάμεσα στις δύο φάσεις και γ) όταν ένα δείγμα κατανέμεται σχεδόν αποκλειστικά στη μία φάση, τότε το συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών δεν χρησιμοποιείται για την FCPC ανάλυση. Ο έλεγχος με TLC δεν μπορεί να δώσει πλήρη εικόνα για ένα σύστημα και να καθορίσει με ασφάλεια εάν αυτό είναι κατάλληλο, διότι βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε υποκειμενικούς παράγοντες (κρίση του ερευνητή). Είναι όμως χρήσιμος διότι είναι απλός, γρήγορος και προσφέρει τη δυνατότητα απόρριψης κάποιων συστημάτων, στα οποία οι ουσίες που ελέγχονται βρίσκονται εξ' ολοκλήρου στη μια από τις δυο φάσεις. Ο έλεγχος για την επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών γίνεται και με αναλυτική HPLC με σκοπό τον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις.

Για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών στην παρούσα εργασία, για το εκχύλισμα προς ανάλυση με FCPC δοκιμάστηκαν με TLC 10 διαφορετικά συστήματα. Ο τελικός όγκος για κάθε δοκιμαζόμενο σύστημα διαλυτών ήταν περίπου 3 mL, μέσα στα οποία διαλύθηκαν από 10 mg περίπου ξηρού εκχυλίσματος. Μετά το σχηματισμό διφασικού συστήματος, έγινε TLC και για τις δύο φάσεις για κάθε δοκιμαζόμενο σύστημα διαλυτών. Αφού επιλέχτηκε το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, βασιζόμενοι στα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω, σε μεγάλη διαχωριστική χοάνη (4L) παρασκευάστηκε το σύστημα και διαχωρίστηκαν οι δύο σχηματιζόμενες φάσεις σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα πριν εκχυθεί στο σύστημα διαλύθηκε σε 50 mL της κάτω φάσης. Αρχικά, για την ανάλυση στην συσκευή FCPC, χρησιμοποιήθηκε η κάτω φάση (πολική) ως στατική και η άνω φάση (μη πολική) ως κινητή και αφού συλλέχτηκαν 114 κλάσματα, έγινε η αλλαγή φάσεων, με την άνω φάση να αποτελεί την στατική και την κάτω την κινητή φάση. Η ροή για όλη την ανάλυση ρυθμίστηκε στα 8 mL/min και οι στροφές στα 950rpm (Πίν.2.4).

Πίνακας 2.4 Συνθήκες διεξαγωγής FCPC

Σύστημα Διαλυτών	EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O (3:10:5:15)
Κινητή Φάση	Πάνω Φάση
Στατική Φάση	Κάτω Φάση
Στροφές	950
Ροή Κινητής Φάσης	8 mL/min
Αλλαγή Φάσεων	Κλάσμα 114
Μέθοδος Εισαγωγής Δείγματος	Εξισορρόπηση

2.7.2.9 Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (GC) Hewlett-Packard (τύπου Agilent 6890, στήλη HP-5 MS) και φασματογράφος μάζας (MS) (τύπου HP 5973) (Εικ. 2.13). Το ήλιο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο, διοχετεύθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης με ροή 0.8 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης περιελάμβανε παραμονή στους 60°C για 5min, στη συνέχεια άνοδο με ρυθμό 3°C/min μέχρι τη θερμοκρασία των 280°C και τέλος παραμονή σε αυτή για 15min. Τα φάσματα μάζας των ουσιών που εξέρχονταν από τη στήλη ελήφθησαν με την τεχνική του ηλεκτρονιοβομβαρδισμού, στην οποία χρησιμοποιήθηκε

ενέργεια ιονισμού 70eV. Η ταυτοποίηση των συστατικών βασίσθηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας με πρότυπα φάσματα μάζας που περιέχονται στη βιβλιοθήκη Wiley 275.



Εικόνα 2.13. Αέριος Χρωματογράφος συζευγμένος με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο

2.7.2.10 Φασματοσκοπία μάζας (MS)

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν με τη μέθοδο του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS) σε φασματογράφο μάζας MSQ ThermoFinnigan.

Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HR-MS) ελήφθησαν με τη χρήση υβριδικού φασματογράφου μάζας που αποτελείται από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) σε σειρά με κυκλοτρονικού τύπου αναλυτή μαζών μετασχηματισμού Fourier (Orbitrap) – (LTQ-Orbitrap Discovery-ThermoFinnigan, San Jose, USA). Η πηγή ιονισμού για όλα τα μόρια που αναλύθηκαν ήταν ESI (+) και ESI (-). Η θερμοκρασία στο τριχοειδές της πηγής ιονισμού ESI ρυθμίστηκε στους 300°C, σε δυναμικό ιονισμού 3.5 kV. Η ροή του αερίου αζώτου στο τριχοειδές (sheath gas) ρυθμίστηκε στα 30 arb και του βοηθητικού αερίου αζώτου στα 10 arb. Για όλες τις μετρήσεις m/z ως όριο εμπιστοσύνης (mass tolerance) ορίστηκαν τα 5 ppm.

2.7.2.11 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για την ταυτοποίηση των ουσιών που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η λήψη των φασμάτων έγινε με φασματογράφους Bruker DRX 400 και Bruker Avance III 600 (400 MHz και 600 MHz) (Εικ. 2.14 α,β).

Συγκεκριμένα, ελήφθησαν πειράματα 1D (^1H NMR και ^{13}C NMR) και 2D [COSY (Colleration Spectroscopy), COSY-LR (Long-Range COSY), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear

Multiple Bond Coherence)]. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλή) και m (πολλαπλή). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$), δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD), δευτεριωμένο διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO- d_6), και δευτεριωμένο ύδωρ (D_2O) (Aldrich). Ειδικά για τα φασματοσκοπικά δεδομένα ^{13}C NMR, τα περισσότερα προέρχονται από τη σχετική βιβλιογραφία, τα οποία επιβεβαιώθηκαν από τη μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC).

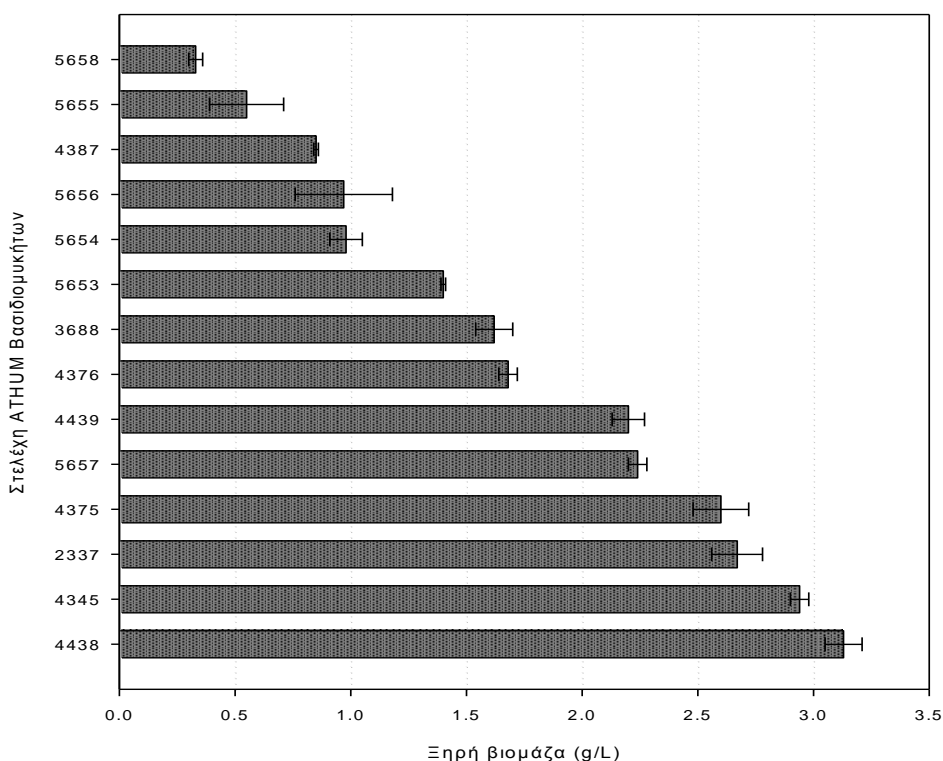


Εικόνα 2.14 Φασματογράφοι NMR (α) Bruker DRX 400 (400 MHz) και (β), (γ) Bruker Avance III 600 (600 MHz) στους οποίους πραγματοποιήθηκε η λήψη των φασμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ

3.1 Αξιολόγηση στελεχών Βασιδιομυκήτων ως προς την παραγωγή βιομάζας

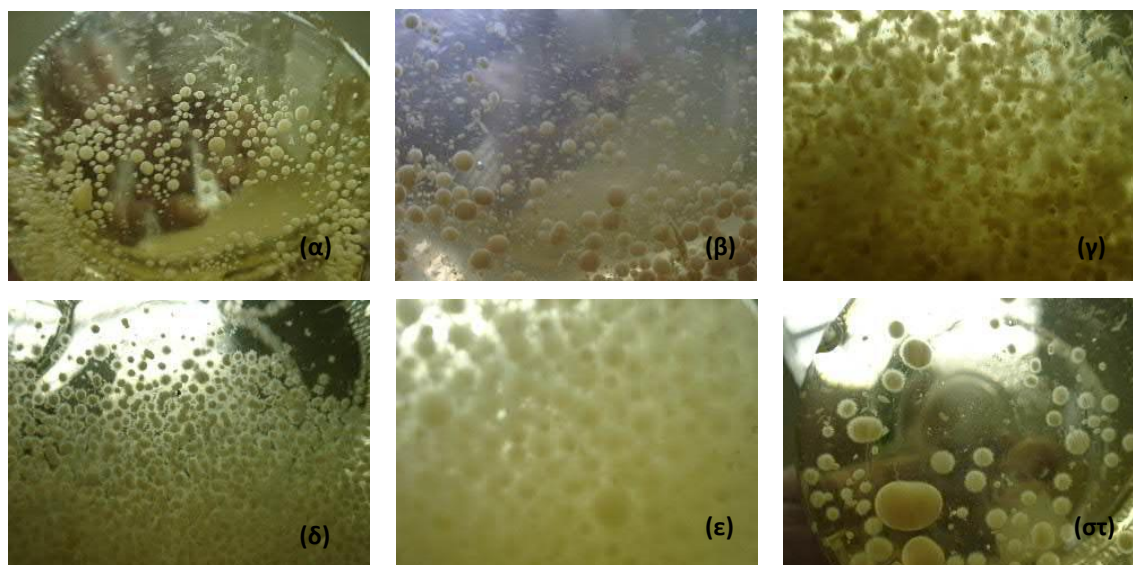
Τα 14 στελέχη Βασιδιομυκήτων (βλ. 2.2.1) αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας το μέσο ανάπτυξης Hagen, με σκοπό την επιλογή δύο εξ αυτών για περαιτέρω μελέτη. Από το Γραφ. 3.1 φαίνεται η διαφοροποίηση μεταξύ των δοκιμαζόμενων στελεχών ως προς την παραγωγή βιομάζας.



Γράφημα 3.1 Αξιολόγηση των 14 στελεχών Βασιδιομυκήτων ως προς την παραγωγή βιομάζας. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε περιστρεφόμενο επωαστήριο σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (150 rpm) και θερμοκρασίας $T=25^{\circ}\text{C}$ με μέσο ανάπτυξης το Hagen. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέγιστη παραγωγή βιομάζας για κάθε στέλεχος.

Γενικότερα, για όλα τα δοκιμαζόμενα στελέχη Βασιδιομυκήτων, οι τιμές της ανακτώμενης βιομάζας ήταν σε χαμηλά επίπεδα (<3.0 g/L). Τα στελέχη *P. ostreatus* ΑΤΗUM

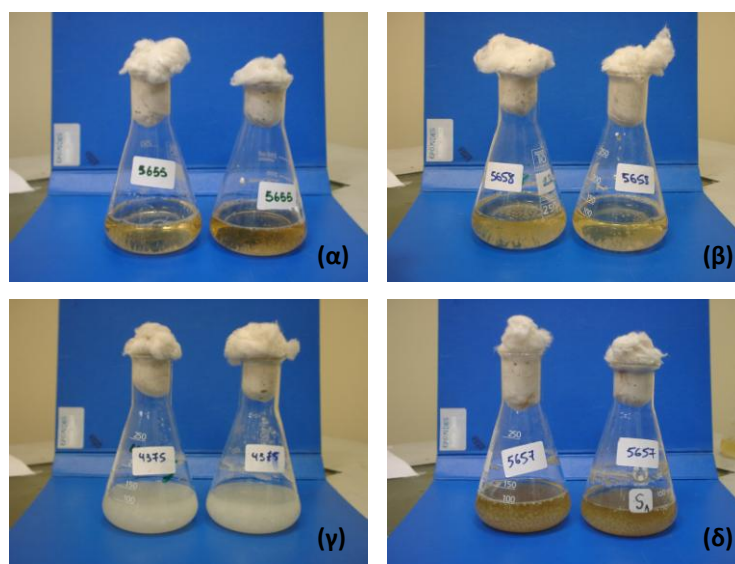
4438, *G. australe* ATHUM 4345, *P. eryngii* ATHUM 2337 και *Polyporus meridionalis* ATHUM 4375, έδωσαν σε σχέση με τα άλλα δοκιμαζόμενα στελέχη υψηλότερες τιμές ξηρής βιομάζας και συγκεκριμένα 3.13 ± 0.08 , 2.94 ± 0.04 , 2.67 ± 0.11 , και 2.60 ± 0.12 g/L, αντίστοιχα. Όλα τα δοκιμαζόμενα στελέχη του γένους *Pleurotus*, με εξαίρεση το *P. nebrodensis* ATHUM 4387 είχαν καλή μυκηλιακή ανάπτυξη, σε αντίθεση με τα δοκιμαζόμενα στελέχη των γενών *Agaricus* και *Clitocybe* (<1.0 g/L).



Εικόνα 3.1 Παραδείγματα διαφορετικής μορφολογίας των μυκηλιακών συσσωματωμάτων σε βυθισμένες καλλιέργειες διαφορετικών στελεχών Βασιδιομυκήτων: (i) σφαιρικά με ομαλή επιφάνεια (α) *G. australe* ATHUM 4345 και (β) *Agaricus bisporus* ATHUM 5654, (ii) τριχόμορφα αστεροειδούς μορφής (γ) *Clitocybe* sp. ATHUM 5658 (δ) *Clitocybe odora* ATHUM 5656 και (ε) *Pleurotus eryngii* ATHUM 2337 και (iii) κυλινδρικής μορφής (δ) *Agrosybe cylindracea* ATHUM 5657

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι κατά την αξιολόγηση των διαφορετικών στελεχών Βασιδιομυκήτων ως προς την παραγωγή βιομάζας, οι βυθισμένες καλλιέργειές τους έδειξαν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Κοινό χαρακτηριστικό όλων ήταν ο σχηματισμός των μυκηλιακών συσσωματωμάτων, “πέλλετς” (pellets) των οποίων η μορφή μπορεί να ήταν συμμετρική ή ακανόνιστη, το σχήμα κυλινδρικό ή σφαιρικό και το μέγεθος από 1 έως 20 mm. Εξωτερικά, η μορφή τους ήταν λεία, τριχωτή ή με περιφερειακές προεκβολές πυκνών υφών, δίνοντας τους την εικόνα αστεριών (Εικ. 3.1). Το χρώμα και η συμπάγεια τους, όπως και το άρωμα που ανέδιδαν δεν ήταν ίδιο για όλα τα δοκιμαζόμενα στελέχη μανιταριών. Το υγρό

καλλιέργειας, ήταν διαυγές, σε κάποια στελέχη όμως φαινόταν θολερό και παχύρευστο (Εικ. 3.2). Παρόμοια σχόλια έχουν γίνει και από τους Maziero et al. (1999) σε σχετική μελέτη.



Εικόνα 3.2 Παραδείγματα διαφορετικής μορφολογίας του υγρού καλλιέργειας σε βυθισμένες καλλιέργειες διαφορετικών στελεχών Βασιδιομυκήτων: **(i)** διαυγές (α) *Agaricus bisporus* cultivar portobello ATHUM 5655, (β) *Clitocybe odora* ATHUM 5658, και **(ii)** θολερό (γ) *Polyporus meridionalis* και (δ) *Agrocybe cylindracea* ATHUM 5657

Εξάλλου είναι γνωστό, ότι στις βυθισμένες καλλιέργειες των μυκήτων, οι παραγόμενες μυκηλιακές υφές περιπλέκονται σε πυκνές μάζες (Atkinson & Daoud, 1976). Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση της μορφολογίας των καλλιεργειών οφείλεται στη συγκεκριμένη περίπτωση στο διαφορετικό στέλεχος, μιας και η φύση του εμβολίου, οι χημικοί και οι φυσικοί καλλιεργητικοί παράμετροι διατηρήθηκαν κοινοί για όλα τα στελέχη Βασιδιομυκήτων στη μελέτη αξιολόγησής τους για παραγωγή βιομάζας. Είναι εξάλλου γνωστό από τους Kossen, (2000) και Παραγιάννη (2004) ότι η μορφολογία των βυθισμένων καλλιεργειών καθορίζεται από το γενετικό υλικό του είδους του μικροοργανισμού, καθώς και από τους χημικούς (σύσταση του μέσου ανάπτυξης), φυσικούς (θερμοκρασία, τιμή pH, ανάδευση) και βιολογικούς (συγκέντρωση και τύπος εμβολίου) παράγοντες της καλλιέργειας.

Για περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκαν τα στελέχη *P. ostreatus* ATHUM 4438 και *G. australe* ATHUM 4345, αφενός μεν γιατί έδωσαν καλύτερη παραγωγή βιομάζας, αφετέρου γιατί αντιπροσωπεύουν δύο είδη με διαφορετικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές: το πρώτο αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα εδώδιμαμανιτάρια, γνωστό για την θρεπτική αξία του (Gregori

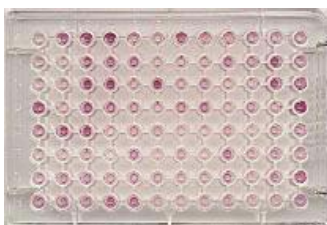
et al. 2007), το δεύτερο ανήκει σε ένα γένος φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, πηγή παραγωγής πολύτιμων βιολογικά ενεργών ενώσεων (Paterson et al. 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *G. australe* ATHUM 4345

4.1 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με μικροσυστοιχεία FF Biolog

Η FF μικροσυστοιχεία Biolog που συνιστά μια υψηλής αποδοτικότητας μεταβολική ανάλυση, αποτελείται από 95 διαφορετικές πηγές άνθρακα που κάθε είδος μύκητα πιθανά να αφομοιώνει διαφορετικά. Έτσι, για κάθε είδος με την μεταβολική ανάλυση σε FF μικροσυστοιχεία Biolog είναι δυνατή η ανάκτηση ενός ορισμένου προφίλ-«δακτυλικού αποτυπώματος» μεταβολικού δυναμικού (Εικ. 4.1). Αυτό το προφίλ αφομοίωσης των υποστρωμάτων κρίνεται χρήσιμο για την επιλογή των συστατικών του μέσου ανάπτυξης με σκοπό την αριστοποίηση για βέλτιστη παραγωγή βιομάζας αλλά και δευτερογενών μεταβολιτών (Singh 2009) καθώς επίσης δίνει και χρήσιμες πληροφορίες για τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον καταβολισμό του υποστρώματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αριστοποίηση της διεργασίας.

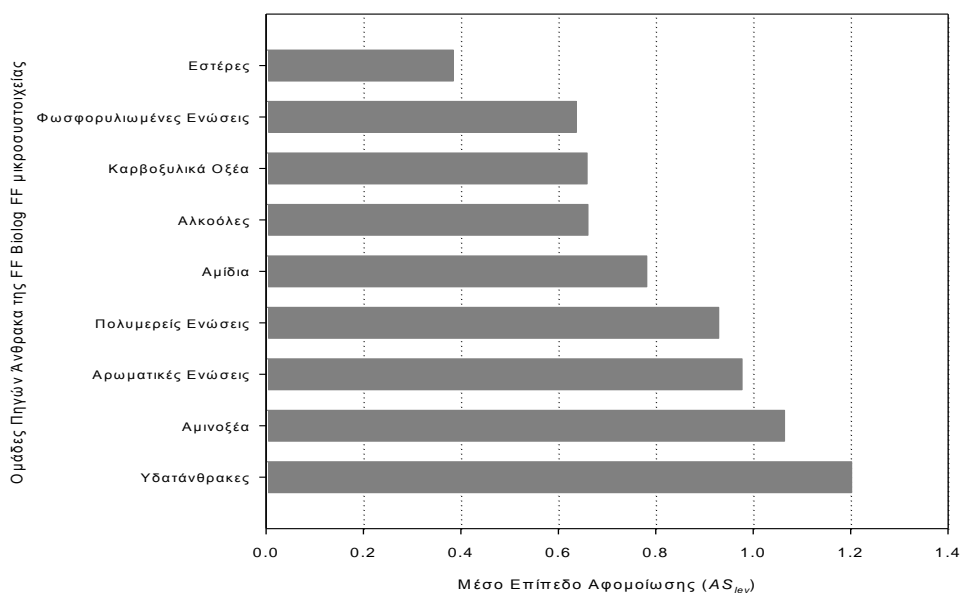


Εικόνα 4.1 FF Biolog μικροσυστοιχεία ύστερα από την επώαση, όπου σε ορισμένα κελιά παρατηρείται ανάπτυξη ερυθρού χρώματος που συνιστά αυξημένη μεταβολική ενεργότητα

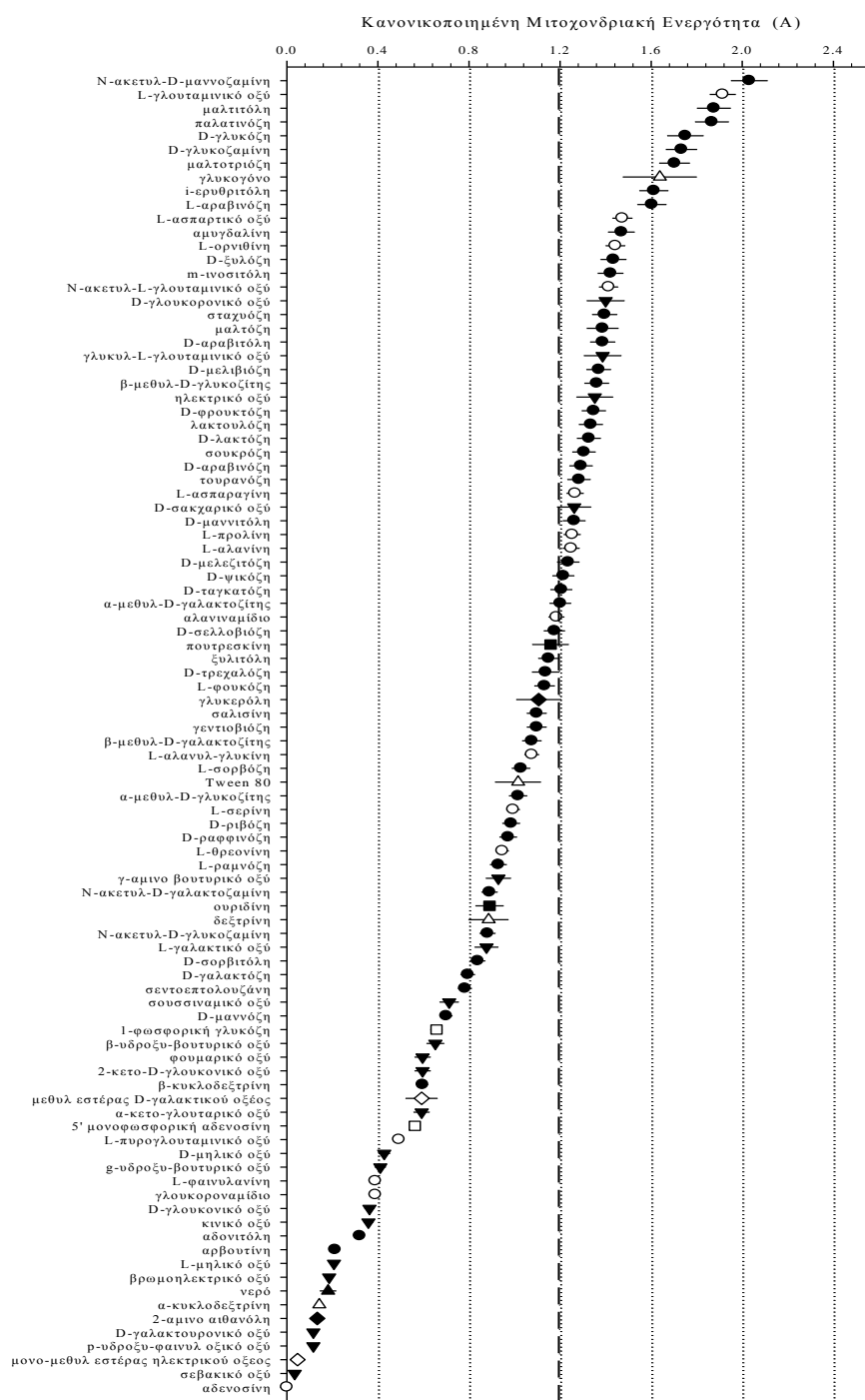
Με βάση την ανάλυση με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog για το *G. australe* ATHUM 4345, υπολογίστηκε το μέσο επιπέδο αφομοίωσης (AS_{lev}) για κάθε σύνολο πηγών άνθρακα που δοκιμάστηκε και συνιστούν μία ενιαία κατηγορία βιομορίων, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γραφ. 4.1. Η τιμή (AS_{lev}) προέκυψε από τον λόγο του μέσου όρου των διαφορών των αναγνώσεων (490-750nm) για τα μέλη κάθε ενιαίας ομάδας βιομορίων, προς τον μέσο όρο όλων των διαφορών των αναγνώσεων (490-750nm) για όλες τις πηγές άνθρακα της μικροσυστοιχείας. Όπως διαπιστώνεται για την ομάδα των υδατανθράκων και των αμινοξέων το επίπεδο αφομοίωσής τους από τον μικροοργανισμό ήταν μεγαλύτερο.

Το προφίλ αφομοίωσης των 95 δοκιμαζόμενων πηγών άνθρακα για το *G. australe* ATHUM 4345, βασιζόμενοι στην μιτοχονδριακή ενεργότητα παρουσιάζεται στο Γραφ. 4.2. Οι

πηγές άνθρακα που αφομοιώθηκαν καλύτερα από το συγκεκριμένο στέλεχος (τιμή κανονικοποιημένης μιτοχονδριακής ενεργότητας, $\bar{A}>1.2$) ήταν (25) υδατάνθρακες και συγκεκριμένα η Ν-ακετυλ-D-μαννοζαμίνη ($\bar{A}=2.03$), η μαλιτιτόλη ($\bar{A}=1.88$), η παλατινόζη ($\bar{A}=1.87$), η D-γλυκόζη ($\bar{A}=1.75$), η D-γλυκοζαμίνη ($\bar{A}=1.73$), η μαλτοτρίοζη ($\bar{A}=1.70$), η *i*-ερυθριτόλη ($\bar{A}=1.62$), η L-αραβινόζη ($\bar{A}=1.60$), η αμυγδαλίνη ($\bar{A}=1.47$), η D-ξυλόζη ($\bar{A}=1.44$), η *m*-ινοσιτόλη ($\bar{A}=1.42$), η σταχυόχη ($\bar{A}=1.40$), η μαλτόζη ($\bar{A}=1.39$), η D-αραβιτόλη ($\bar{A}=1.39$), η D-μελιβιόζη ($\bar{A}=1.37$), ο β-μεθυλ-D-γλυκοζιτης ($\bar{A}=1.36$), η D-φρουκτόζη ($\bar{A}=1.35$), η λακτουλόζη ($\bar{A}=1.34$), η D-λακτόζη ($\bar{A}=1.33$), η σουκρόζη ($\bar{A}=1.31$), η D-αραβινόζη ($\bar{A}=1.29$), η τουρανόζη ($\bar{A}=1.28$), η D-μαννιτόλη ($\bar{A}=1.26$), η D-μελεζιτόζη ($\bar{A}=1.24$), και η D-ψικόζη ($\bar{A}=1.21$). Από την ομάδα των αμινοξέων καλύτερα αφομοιώθηκαν από το συγκεκριμένο στέλεχος τα εξής 7 αμινοξέα: L-γλουταμινικό οξύ ($\bar{A}=1.91$), L-ασπαρτικό οξύ ($\bar{A}=1.48$), L-ορνιθίνη ($\bar{A}=1.44$), Ν-ακετυλ-L-γλουταμινικό οξύ ($\bar{A}=1.41$), L-ασπαραγίνη ($\bar{A}=1.27$), L-προλίνη ($\bar{A}=1.25$) και L-αλανίνη ($\bar{A}=1.25$). Ακόμα, υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα σημειώθηκε για (4) καρβοξυλικά οξέα και συγκεκριμένα το D-γλουκονικό, το γλυκυλ-L-γλουταμινικό, το ηλεκτρικό και το D-σακχαρικό οξύ με τιμές (\bar{A}) 1.40, 1.39, 1.36 και 1.26 αντίστοιχα. Τέλος, για ένα πολυσακχαρίτη και συγκεκριμένα για το γλυκογόνο παρατηρήθηκε υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα ($\bar{A}=1.64$) από το μελετώμενο στέλεχος.



Γράφημα 4.1 Μέσο επίπεδο αφομοίωσης (AS_{lev}) για κάθε ενιαία κατηγορία βιομορίων-πηγών άνθρακα που δοκιμάστηκαν με την Biolog FF μικροσυστοιχεία για το *G. australe* ATHUM 4345



Γράφημα 4.2 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog για το *G. australe* ATHUM 4345 στο οποίο δίνεται ο μέσος των τριπλών αναλύσεων για την (\bar{A}) του δοκιμαζόμενου υποστρώματος καθενός κελιού της μικροσυστοιχείας. Σύμβολα: (●) υδατάνθρακες, (▼) καρβοξυλικά οξέα, (○) αμινοξέα, (△) πολυμερείς ενώσεις, (◆) αλκοόλες, (■) αρωματικές ενώσεις, (□) εστέρες, (◇) φωσφορυλιωμένες ενώσεις και (▲) νερό.

Η περιορισμένη αφομοίωση των ενδοιάμεσων ενώσεων του κύκλου του κιτρικού οξέος (ΚΚΟ), όπως για παράδειγμα του α -κετογλουταρικού ($\bar{A}=0.59$), του μηλικού [$\bar{A}=0.21$ (L-ισομερές), 0.43 (D-ισομερές)] και του φουμαρικού ($\bar{A}=0.60$) οξέος από το *G. australe* υποδεικνύουν πιθανή μεταβολική ανενεργότητα του ΚΚΟ κατά τη φάση ανάπτυξής του. Εν αντιθέσει, το γλουταμινικό οξύ αποτέλεσε το αμινοξύ που προτιμήθηκε περισσότερο από το συγκεκριμένο στέλεχος Βασιδιομύκητα. Είναι γνωστό ότι το γλουταμινικό οξύ χρησιμεύει ως δότης για την παραγωγή ενδιάμεσων του ΚΚΟ όπως το α -κετογλουταρικό μέσω της τρανσαμίνωσης καθώς και των αντιδράσεων μεταφοράς αμιδικού αζώτου που καταλύονται από την γλουταμινική αφυδρογονάση (*GDH*) (EC 1.4.1.4). Η NADP-εξαρτώμενη μορφή της *GDH* (*NADP-GDH*) καταλύει προφανώς τη σύνθεση του γλουταμινικού, ενώ το NAD-εξαρτώμενο ένζυμο (*NAD-GDH*) καταλύει την απαμίνωσή του προς σχηματισμό α -κετογλουταρικού. Στους Βασιδιομύκητες, όπως για παράδειγμα στο *P. ostreatus* έχει αναφερθεί απουσία της *NADP-GDH* (Mikeš et al. 1994). Το γλουταμινικό διοχετεύεται απευθείας στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων για τη βιοσύνθεση α -κετογλουταρικού οξέος, μέσω της *GDH* για να ενισχύσει το αδύναμο ΚΚΟ.

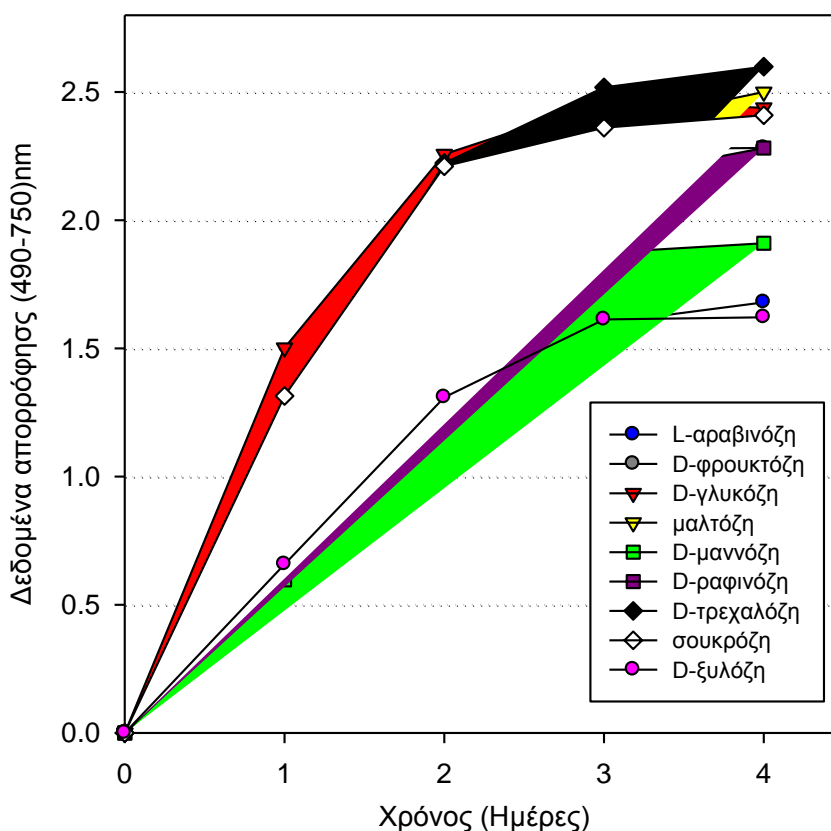
Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα από την μεταβολική ανάλυση σε μικροσυστοιχεία Biolog FF, το συγκεκριμένο στέλεχος του *G. australe* φαίνεται να αφομοιώνει καλύτερα τους α -γαλακτοζίτες, όπως είναι η σταχυόζη, η μελιβιόζη και ο α -μεθυλ-D-γαλακτοζίτης από ότι οι β -γαλακτοζίτες όπως η λακτόζη και ο β -μεθυλ-D-γαλακτοζίτης. Ακόμα, φαίνεται ότι ο μύκητας αναπτύσσεται καλά σε μια ποικιλία α - και β -γλυκοζιτών, γεγονός που υποδεικνύει την παραγωγή διαφορετικών γλυκοζυλ-υδρολασών.

Στον Πιν. 4.1 δίνονται οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) εκφρασμένου σε h^{-1} για όλα τα υποστρώματα της ομάδας των υδατανθράκων που δοκιμάστηκαν με την FF Biolog μικροσυστοιχεία για το μελετώμενο στέλεχος του *G. australe*.

Οικονομικές, εμπορικά διαθέσιμες πηγές άνθρακα που ανήκουν στην ομάδα των υδατανθράκων και συγκεκριμένα η D-γλυκόζη, η L-αραβινόζη, η D-ξυλόζη, η μαλτόζη, η D-φρουκτόζη, η σουκρόζη, η D-τρεχαλόζη, η D-ραφινόζη και η D-μαννόζη με τιμές (\bar{A}) 1.75, 1.60, 1.44, 1.39, 1.35, 1.31, 1.14, 0.97 και 0.70 αντίστοιχα, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με σκοπό να αξιολογηθούν και σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του μύκητα. Η τιμή μ_{\max} που προσδιορίστηκε ήταν για την D-γλυκόζη ($0.037 h^{-1}$), την L-αραβινόζη ($0.022 h^{-1}$), την D-ξυλόζη ($0.024 h^{-1}$), τη μαλτόζη ($0.033 h^{-1}$), την D-φρουκτόζη ($0.035 h^{-1}$), τη σουκρόζη ($0.037 h^{-1}$), την D-τρεχαλόζη ($0.038 h^{-1}$), την D-ραφινόζη ($0.030 h^{-1}$) και την D-μαννόζη ($0.027 h^{-1}$). Για τα σάκχαρα

που επιλέχτηκαν για περαιτέρω μελέτη παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης στο Γράφ. 4.3.

Η προτίμηση των παραπάνω πηγών άνθρακα έναντι των άλλων που δοκιμάστηκαν με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog, βασίζεται και στο γεγονός ότι ανήκουν στην ομάδα των υδατανθράκων για την οποία ο μικροοργανισμός παρουσίασε όπως αποδείχτηκε και το καλύτερο επίπεδο αφομοίωσης. Επιπλέον, οι υδατάνθρακες αποτελούν τις πιο σημαντικές πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα είδη του γένους *Ganoderma* και χρησιμοποιούνται πιο συχνά στις διεργασίες ζύμωσής τους (Avtonomova et al. 2005, Fang & Zhong 2002, Lee W.V. et al. 2007, Tang & Zhong 2002, 2003, Wagner et al. 2003, Xu et al. 2008, Yang F.C. et al. 2000).



Γράφημα 4.3 Καμπύλες ανάπτυξης για τα σάκχαρα D-γλυκόζη, L-αραβινόζη, D-ξυλόζη, μαλτόζη, D-φρουκτόζη, σουκρόζη, D-τρεχαλόζη, D-ραφινόζη και D-μαννόζη όπως προσδιορίστηκαν με βάση τα δεδομένα από την ανάλυση σε FF Biolog μικροσυστοιχεία [διαφορά των αναγνώσεων (490-750) nm] για το *G. australe* ATHUM 4345

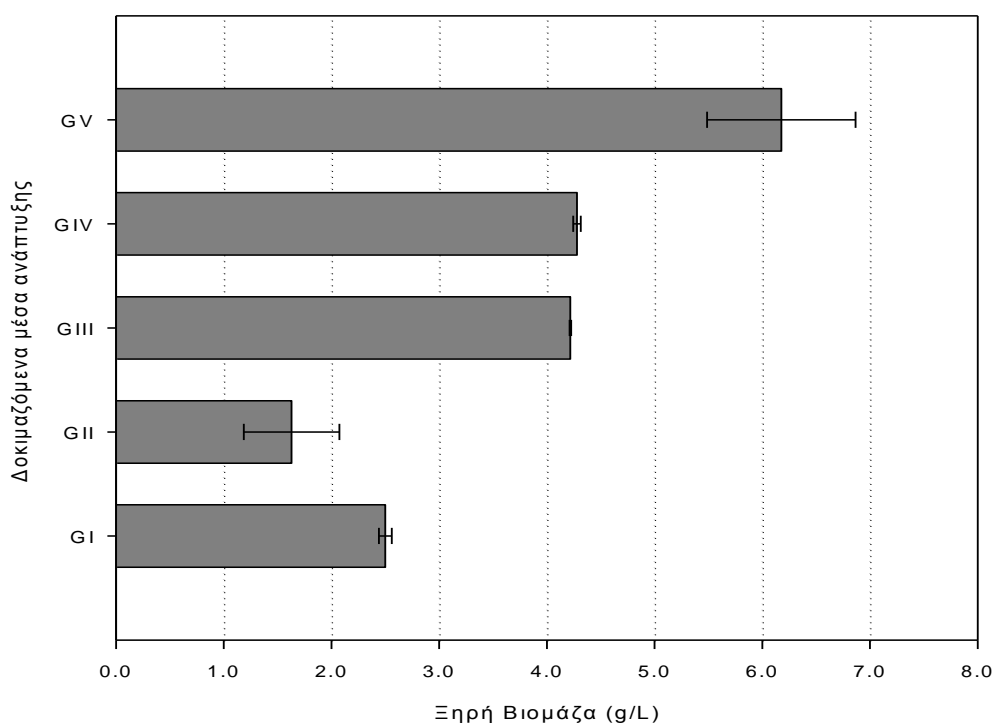
Πίνακας 4.1 Τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) σε h^{-1} για τα υποστρώματα της ομάδας των υδατανθράκων που δοκιμάστηκαν με την FF Biolog μικροσυστοιχεία για το *G. australe* ATHUM 4345.

Υδατάνθρακες	Μέγιστος Ειδικός Ρυθμός Ανάπτυξης (μ_{\max}) ^a (h^{-1})
L-αραβινόζη	0.022
D-αραβινόζη	0.020
D-σελλοβιόζη	0.031
D-φρουκτόζη	0.035
L-φουκόζη	0.034
D-γαλακτόζη	0.027
Γεντιοβιόζη	0.032
D-γλυκόζη	0.037
D-λακτόζη	0.034
Λακτουλόζη	0.032
Μαλτόζη	0.033
Μαλτοτριόζη	0.038
D-μαννόζη	0.027
D-μελιβιόζη	0.037
D-μελεζιτόζη	0.036
Παλατινόζη	0.037
D-ψικόζη	0.030
D-ραφφινόζη	0.030
D-ριβόζη	0.011
L-ραμνόζη	0.032
D-ταγκατόζη	0.029
D-τρεχαλόζη	0.038
Τουρανόζη	0.037
Σταχυόζη	0.038
L-σορβόζη	0.032
Σουκρόζη	0.037
D-ξυλόζη	0.024
Αδονιτόλη	0.020
D-αραβιτόλη	0.034
<i>i</i> -ερυθριτόλη	0.039
<i>m</i> -ινοσιτόλη	0.037
Μαλιτιτόλη	0.039
D-μαννιτόλη	0.035
D-σορβιτόλη	0.033
Ξυλιτόλη	0.032
α -μεθύλ-D-γλυκοζίτης	0.035
β -μεθύλ-D-γλυκοζίτης	0.036
α -μεθύλ-D-γαλακτοζίτης	0.031
β -μεθύλ-D-γαλακτοζίτης	0.033
D-γλυκοζαμίνη	0.036
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	0.028
N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη	0.027
N-ακετυλ-D-μαννοζαμίνη	0.037
Αρβουτίνη	0.023
Σαλικίνη	0.030
Αμυγδαλίνη	0.031
Σεντοεπτολοζάνη	0.030

^a ο υπολογισμός της τιμής μ_{\max} βασίστηκε στη διαφορά των αναγνώσεων (490-750) nm

4.2 Αξιολόγηση μέσων ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες

Πέντε μέσα ανάπτυξης με διαφορετική σύσταση (G_I , G_{II} , G_{III} , G_{IV} και G_V) λαμβανόμενα από τη διεθνή βιβλιογραφία αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345 σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου για περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση. Όπως διαπιστώνεται από το Γράφ. 4.4, το μέσο G_V ήταν αυτό που έδωσε σημαντικά την υψηλότερη παραγωγή ξηρής βιομάζας (6.18 ± 0.17 g/L).



Γράφημα 4.4 Αξιολόγηση 5 διαφορετικών μέσων ανάπτυξης G_I , G_{II} , G_{III} , G_{IV} και G_V για παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345 σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε περιστρεφόμενο επωαστήριο σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30 \pm 2^\circ\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε μέσο.

Οι Liu & Zhang (2006) ανέφεραν 8.51 g/L απόδοση ξηρής βιομάζας από το *G. lucidum* σε μέσο ανάπτυξης G_{II} σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες. Η τιμή αυτή είναι πολύ υψηλότερη (σχεδόν 5.5 φορές) σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας που ανακτήθηκε στα δικά μας

πειράματα για το *G. australe* χρησιμοποιώντας το ίδιο μέσο. Επίσης, οι Fang & Zhong (2002) ανέφεραν 14.1 g/L απόδοση ξηρής βιομάζας από το *G. lucidum* χρησιμοποιώντας ως μέσο ανάπτυξης το μέσο G_{III} , που πάλι αποκλίνει σημαντικά από την τιμή παραγόμενης βιομάζας που αναφέρεται στην παρούσα μελέτη για το *G. australe* αναπτυσσόμενο στο μέσο G_{III} . Η Roberts (2004) που χρησιμοποίησε το μέσο G_{IV} για την ανάπτυξη 3 διαφορετικών στελεχών *Ganoderma* sp. (H1, H2 και H3) ανέφερε τις τιμές ξηρής παραγόμενης βιομάζας 1.15, 1.90 και 1.10 g/L αντίστοιχα, που αποδείχτηκαν όμως χαμηλότερες σε σχέση με αυτή που ανακτήθηκε (4.30 g/L) από το *G. australe* στο ίδιο μέσο. Τέλος, οι Antonomova et al. (2006) για το μέσο G_V σε βυθισμένη καλλιέργεια του *G. lucidum* ανέφεραν παραγωγή ξηρής βιομάζας 11.35 g/L που είναι όμως σχεδόν διπλάσια από εκείνη που ανακτήθηκε για το *G. australe* ATHUM 4345 στο ίδιο μέσο στη παρούσα μελέτη. Συμπεραίνεται λοιπόν πως σε σχέση με τις σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές, αποκλίνουν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ως προς την παραγωγή βιομάζας, παρά την χρήση κοινών μέσων ανάπτυξης και καλλιεργητικών συνθηκών, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στο διαφορετικό στέλεχος Βασιδιομύκητα που χρησιμοποιήθηκε. Να αναφερθεί ότι για το συγκεκριμένο στέλεχος καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με τη παραγωγή βιομάζας σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια δεν είναι διαθέσιμη μέχρι σήμερα.

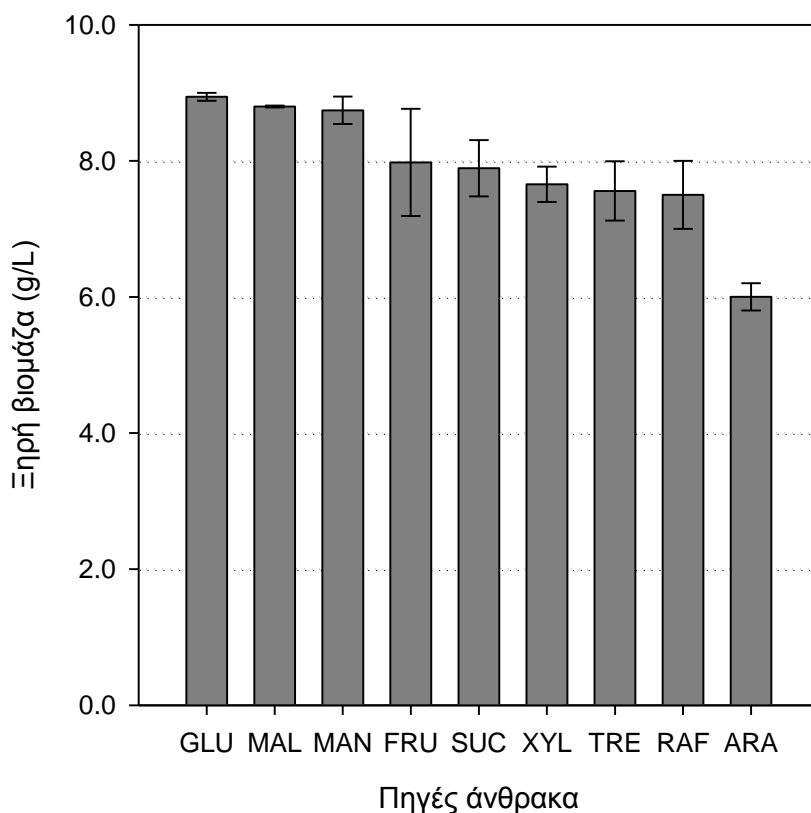
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το μέσο ανάπτυξης που επιλέχτηκε για περαιτέρω μελέτη για το *G. australe* ATHUM 4345 είναι το G_V (12.4 g/L γλυκόζη, 14.0 g/L αλεσμένη σόγια, 2.2 g/L KH_2PO_4 και 0.4g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) που οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τα άλλα μέσα που δοκιμάστηκαν.

4.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή βιομάζας

Οι μονοσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες που επιλέχτηκαν με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την FF Biolog μικροσυστοιχεία δοκιμάστηκαν ως πηγές άνθρακα σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες του *G. australe* ATHUM 4345. Όπως παρατηρείται και από το Γραφ. 4.5 υψηλότερη παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκε την έβδομη ημέρα καλλιέργειας με τη γλυκόζη (8.94±0.05 g/L). Ακολούθησε κατά σειρά χωρίς σημαντική διαφορά, η μαλτόζη και η μαννόζη με μέγιστη παραγωγή 8.80±0.01 g/L και 8.74±0.20 g/L, αντίστοιχα.

Η προτίμηση της γλυκόζης από το μικροοργανισμό αποδίδεται στην αποδοτική ενσωμάτωσή της απευθείας στο γλυκολυτικό και μετέπειτα στο αναπνευστικό μονοπάτι αμέσως μετά την φωσφορυλίωση της (Garraway & Evans 1984). Παράλληλα, η προτίμηση της

γλυκόζης έχει αναφερθεί και από άλλα είδη του γένους *Ganoderma* και συγκεκριμένα από τους Kim et al. (2006) για το *G.resinaceum* και από τους Elihasvilli et al. (2009), Lee et al. (1999), Sone et al. (1985), Xu et al. (2008), Yang et al. (2000) και Yang & Liau (1998a) για το *G. lucidum*.



Γράφημα 4.5 Μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας από την ανάπτυξη του *G. australe* σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες με το βασικό μέσο ανάπτυξης και διαφορετικές πηγές άνθρακα (GLU γλυκόζη, MAL μαλτόζη, MAN μαννόζη, FRU φρουκτόζη, SUC σουκρόζη, XYL ξυλόζη, TRE τρεχαλόζη, RAF ραφινόζη και ARA αραβινόζη) σε συγκέντρωση 12.4 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30\pm 2^\circ\text{C}$.

Από την άλλη, ο Griffin (1994) αναφέρει ότι η μαννόζη και η φρουκτόζη αποτελούν τα πλέον κοινά και εύκολα αφομοιώσιμα από τους μύκητες σάκχαρα πέρα από τη γλυκόζη. Εξάλλου, η μαννόζη αποτελεί ένα ισομερές της γλυκόζης που μετατρέπεται σε γλυκόζη κατά το μεταβολισμό (Mikeš et al. 1994). Στην παρούσα εργασία, η φρουκτόζη έδωσε σχεδόν 11% χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τη γλυκόζη στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας. Ακόμα, οι Lee et al. (2006), ανέφεραν καταλλήλοτερες πηγές άνθρακα κατά σειρά για τις υγρές

αναδεδυόμενες καλλιέργειες του *G. applanatum*, τη φρουκτόζη, τη γλυκόζη και μετά τη μαλτόζη. Αντίστοιχα, οι Tang & Zhong (2002) ανέφεραν για το *G. lucidum* ως καταλληλότερες πηγές άνθρακα από τις δοκιμαζόμενες στην παρούσα εργασία για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη, τη μαλτόζη και τη γλυκόζη, ενώ η σουκρόζη έδωσε τη χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας.

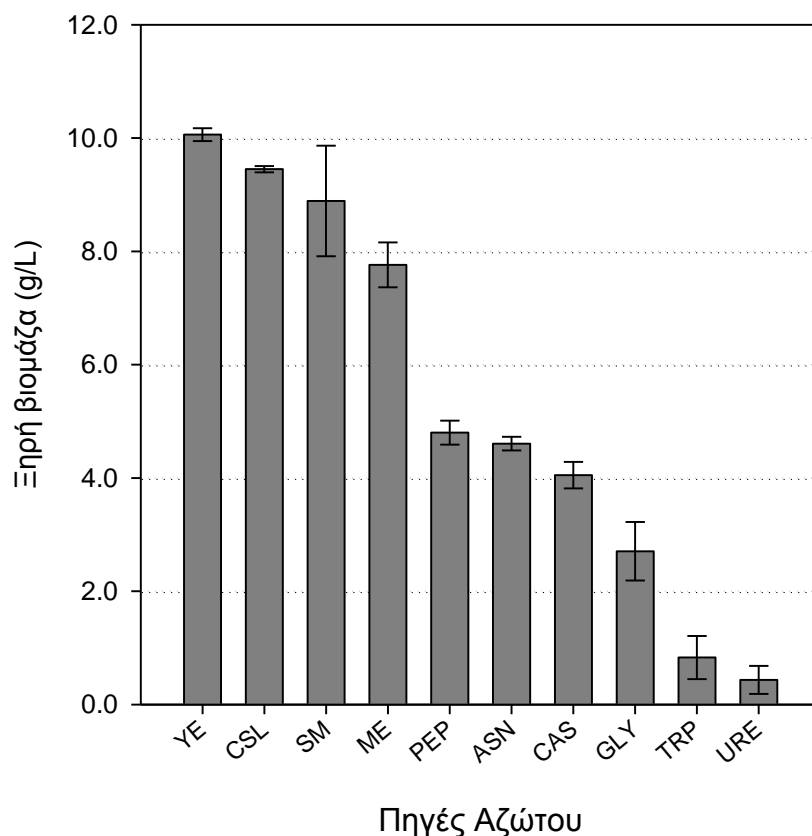
Να αναφερθεί επίσης, ότι η τρεχαλόζη και η ραφινόζη για τις οποίες είχαν σημειωθεί χαμηλότερες τιμές μιτοχονδριακής ενεργότητας με την FF Biolog ανάλυση σε σχέση με τις άλλες δοκιμαζόμενες πηγές άνθρακα σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες, έδωσαν χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας, γεγονός που επιβεβαιώνει τα προηγούμενα αποτελέσματα.

4.4 Επίδραση πηγών αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

Μετά από τη δοκιμή διαφορετικών πηγών αζώτου σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες του *G. australe* ATHUM 4345, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή βιομάζας ήταν χαμηλότερη για τα αμινοξέα και την ουρία (Γράφ. 4.6). Σε αντιπαράθεση, η παραγωγή βιομάζας ήταν σημαντικά υψηλότερη για τις σύνθετες πηγές αζώτου, όπως το YE, το CSL και η αλεσμένη σόγια (SM). Το γεγονός αυτό συνηγορεί με προηγούμενες μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι οι περισσότεροι Βασιδιομύκητες, μεταξύ των οποίων και τα είδη του γένους *Ganoderma* προτιμούν τις σύνθετες πηγές αζώτου, μιας και αυτές περιέχουν αμινοξέα που δεν μπορούν οι μύκητες από μόνοι τους να τα συνθέσουν (Fang & Zhong, 2002, Kim et al. 2006, Shih et al. 2006, Xu et al. 2008). Γενικότερα, το οργανικό άζωτο συνιστά μια σύνθετη πηγή αζώτου που αποτελείται από ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αυτά μεταφέρονται και αφομοιώνονται από το μέσο ανάπτυξης στο κύτταρο και απευθείας ενσωματώνονται σε πρωτεΐνες ή μετασχηματίζονται σε άλλα κυτταρικά αζωτούχα συστατικά (Mongi et al. 2005). Ανάμεσα στις οργανικές πηγές αζώτου, οι διαφορές που υπάρχουν όσον αφορά τη σύνθεση πρωτεϊνών και αμινοξέων ευθύνονται για τις διαφορές που παρατηρούνται σχετικά με της αποδόσεις βιομάζας.

Η υψηλότερη παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας (10.06 ± 0.11 g/L) σημειώθηκε την έβδομη μέρα της κύριας καλλιέργειας για το μέσο που περιείχε YE ως πηγή αζώτου, και ακολούθησε το μέσο με το CSL (9.45 ± 0.06 g/L) και το SM (8.89 ± 0.98 g/L). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι παραπάνω πηγές αζώτου είναι πλούσιες σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα, όπως γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ, προλίνη, αλανίνη και ασπαραγίνη (Amartey & Jeffries 1994) που αφομοιώνονται αποτελεσματικά από το είδος *G. australe*, όπως κίολας αποδείχτηκε από τις τιμές μιτοχονδριακής ενεργότητας που σημειώθηκαν με την FF

Βιολογ ανάλυση σε προηγούμενα πειράματα. Η θετική επίδραση του ΥΕ στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *G. australe* μάλλον αποδίδεται και στην υψηλή περιεκτικότητα που έχει σε υδατάνθρακες (4-13%), αμινοξέα και βιταμίνες.



Γράφημα 4.6 Μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας από την ανάπτυξη του *G. australe* σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες με το βασικό μέσο και διαφορετικές πηγές αζώτου (YE εκχύλισμα ζύμης, CSL εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, SM αλεσμένη σόγια, ME εκχύλισμα ζύμης, PEP πεπτόνη, ASN ασπαραγίνη, CAS υδρολυμένη καζεΐνη, GLY γλυκίνη, TRP τρυπτοφάνη και URE ουρία) σε συγκέντρωση 10 g/L εκτός από το CSL (30 g/L) και την URE (5 g/L). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30\pm 2^\circ\text{C}$.

Οι Kim et al. (2006) που αξιολόγησαν διαφορετικές οργανικές και ανόργανες πηγές αζώτου ως προς την παραγωγή βιομάζας από το *G.resinaceum* σε βυθισμένη καλλιέργεια διαπίστωσαν ότι η χρήση των οργανικών οδήγησε σε καλύτερες αποδόσεις και μάλιστα η πεπτόνη σόγιας, το YE και το CSL θεωρήθηκαν καταλληλότερα. Ομοίως, οι Chang M.Y. et al. (2006), που μελέτησαν τις συνθήκες ανάπτυξης του *G.lucidum* σε υγρές αναδευόμενες

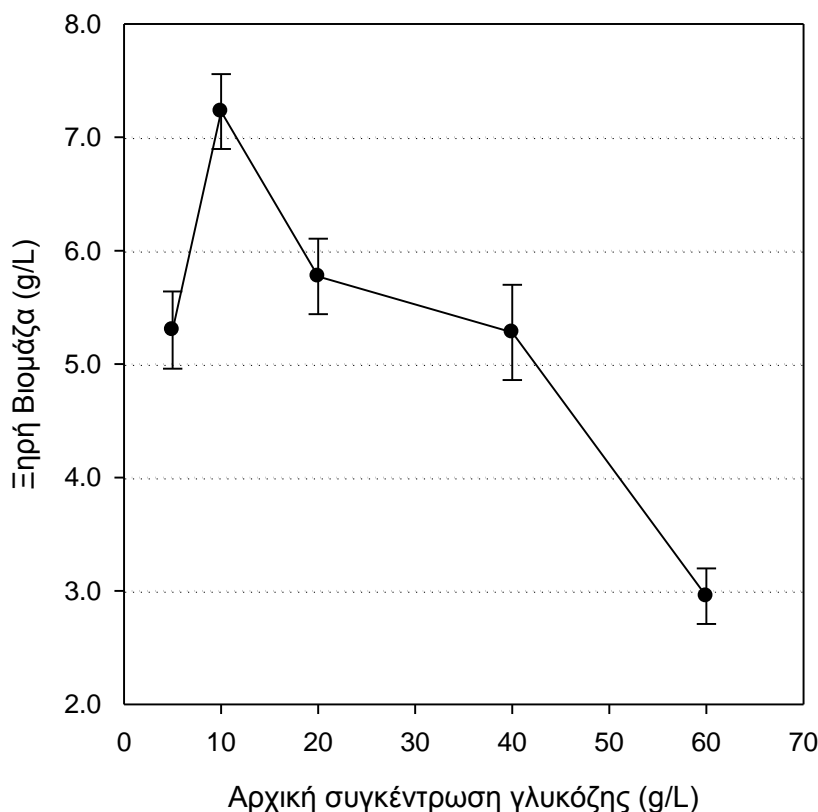
καλλιέργειες, απέδειξαν ότι το ΥΕ ευνοεί την παραγωγή βιομάζας. Η προτίμηση του ΥΕ σε σχέση με άλλες πηγές αζώτου έχει αναφερθεί και για άλλα είδη ανώτερων μυκήτων, π.χ. για το *Psathyrella atroumbonata* (Jonathan & Fasidi 2001), για το *Cordyceps militaris* (Park et al. 2001), για το *Mycena leptocephala* (Vahidi et al. 2004) καθώς και για το *P.nebrodensis* (Jia et al. 2007).

Από την άλλη, οι Xu et al. (2008) που βελτιστοποίησαν τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης με σκοπό την συμφέρουσα οικονομικά παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας από το *G.lucidum* SB97 σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες, ανέφεραν ότι πρώτα η πεπτόνη και μετά το ΥΕ αποδείχτηκαν καταλληλότερες πηγές αζώτου.

4.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

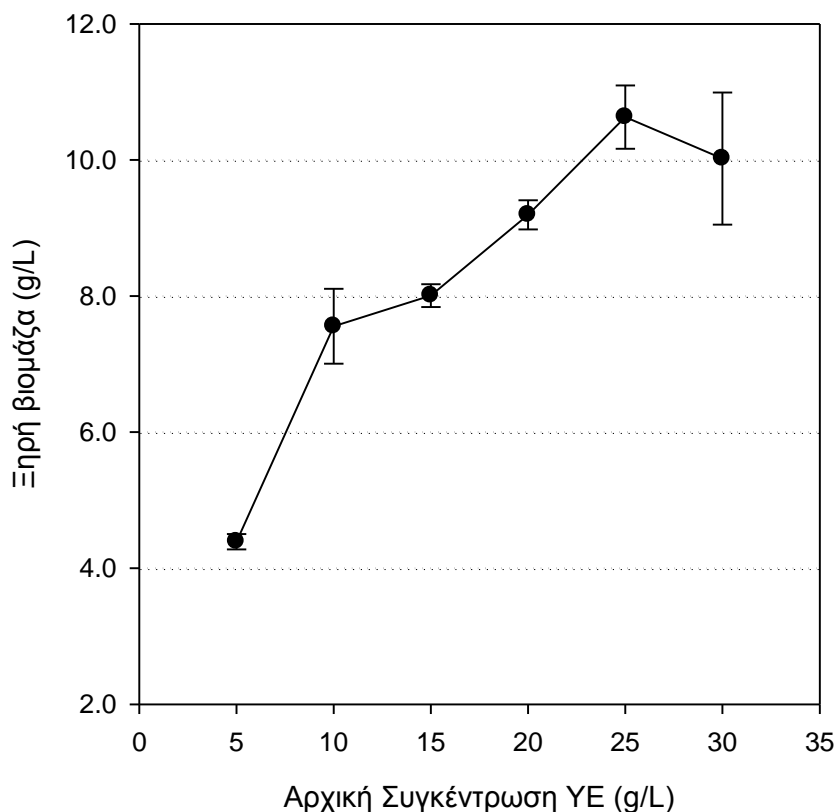
Μεταξύ των πηγών άνθρακα και αζώτου που αξιολογήθηκαν, η γλυκόζη και το ΥΕ που επιλέχτηκαν, μελετήθηκαν και ως προς την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσής τους στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345 σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Για την επίτευξη υψηλής παραγωγής βιομάζας, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του βασικού μέσου ανάπτυξης G_v στην παραγωγή βιομάζας, σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες. Διατηρώντας ως πηγή αζώτου το ΥΕ (10 g/L), η μέγιστη παραγόμενη ξηρή βιομάζα σε δοκιμαζόμενη συγκέντρωση γλυκόζης 5, 10, 20, 40 και 60 g/L που προσδιόριστηκε ήταν 5.30 ± 0.34 , 7.23 ± 0.33 , 5.77 ± 0.33 , 5.28 ± 0.42 και 2.95 ± 0.25 g/L, αντίστοιχα (Γράφ. 4.7), αποκαλύπτοντας πώς παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (> 10g/L) η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρεμποδιζόταν.

Τα αποτελέσματα αυτά σχετικά με το *G. australe* έρχονται σε αντίθεση με τις μελέτες των Fang & Zhong (2002), Tang & Zhong (2002) για το είδος *G.lucidum* και των Kim et al. (2006) σχετικά με το *G. resinaceum* που αναφέρουν ότι υψηλότερη παραγωγή βιομάζας πετυχαίνεται με αύξηση της χρησιμοποιούμενης αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα. Βέβαια, οι Fang & Zhong (2002) διατύπωσαν ότι σε συγκέντρωση πάνω από 50 g/L σακχάρου, η μυκηλιακή ανάπτυξη παρεμποδίζεται λόγω ανάπτυξης φαινομένων όσμωσης με αποτέλεσμα η παραγόμενη βιομάζα να ελαττώνεται.



Γράφημα 4.7 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης (5, 10, 20, 40 και 60 g/L) στην παραγωγή βιομάζας του *G. australe* ATHUM 4345 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση ΥΕ στο βασικό μέσο ανάπτυξης ήταν 10 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30\pm 2^\circ\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε δοκιμή

Τα αποτελέσματα από την μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του ΥΕ στο βασικό μέσο ανάπτυξης G_v , διατηρώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (10 g/L) παρουσιάζονται στο Γράφ. 4.8. Η μέγιστη παραγόμενη ξηρή βιομάζα σε δοκιμαζόμενη συγκέντρωση ΥΕ 5, 10, 15, 20, 25 και 30 g/L που προσδιόριστηκε ήταν 4.39 ± 0.11 , 7.60 ± 0.55 , 8.00 ± 0.17 , 9.20 ± 0.22 , 10.60 ± 0.47 και 10.02 ± 0.97 g/L, αντίστοιχα. Επομένως, διαπιστώνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης ΥΕ στο μέσο ανάπτυξης επιδρά θετικά στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *G. australe*, ενώ η άριστη συγκέντρωση φαίνεται να είναι τα 25 g/L.



Γράφημα 4.8 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης YE (5, 10, 15, 20, 25 και 30 g/L) στην παραγωγή βιομάζας του *G. australe* ATHUM 4345 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο βασικό μέσο ανάπτυξης ήταν 10 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε δοκιμή

Παρομοίως, οι Kim et al. (2006) σχετικά με το *G. resinaceum* βρήκαν ότι με αύξηση της συγκέντρωσης της πεπτόνης σόγιας που χρησιμοποίησαν ως πηγή αζώτου σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες, η παραγωγή βιομάζας αυξήθηκε. Η θετική επίδραση της αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης πηγής αζώτου στην μυκηλιακή ανάπτυξη έχει διατυπωθεί και για άλλους Βασιδιομύκητες, όπως για το *Oudemansiella radicata* (Ζου 2005), αλλά και για το *Cordyceps militaris* (Kim S.W. et al. 2003).

4.6 Συνδυαστική επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

Για την αριστοποίηση της σύστασης του μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345 σε βυθισμένες καλλιέργειες, προσδιορίστηκε η επιφάνεια απόκρισης της παραγόμενης βιομάζας ως συνάρτηση των επιλεγμένων μεταβλητών μέσω της RSM μεθοδολογίας.

Πίνακας 4.2. Κωδικοποιημένες και πραγματικές μεταβλητές για τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κεντρικό πειραματικό σχεδιασμό (CCD) αριστοποίησης για παραγωγή ξηρής βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345 και οι αντίστοιχες αποδόσεις ξηρής βιομάζας που προσδιορίστηκαν (GLU: γλυκόζη, YE: Εκχύλισμα ζύμης)

Πειραματική Συνθήκη	Κωδικοποιημένες τιμές των μεταβλητών ($X_1= \text{GLU}$, $X_2= \text{YE}$)		Πραγματικές τιμές (g/L) ($C_1= \text{GLU}$, $C_2= \text{YE}$)		Παραγωγή Βιομάζας (g/L) Y
	X_1	X_2	C_1	C_2	
	1	-1	-1	5.0	
2	1	-1	15.0	15.0	7.1
3	-1	1	5.0	35.0	6.9
4	1	1	15.0	35.0	11.3
5	0	0	10.0	25.0	11.1
6	0	0	10.0	25.0	11.8
7	0	0	10.0	25.0	10.5
8	-1.41	0	3.0	25.0	7.4
9	0	-1.41	10.0	11.0	6.1
10	1.41	0	17.0	25.0	11.2
11	0	1.41	10.0	39.0	10.0

Όπως προέκυψε από τα προηγούμενα πειράματα η γλυκόζη και το YE κρίθηκαν μεταξύ άλλων καταλληλότερες πηγές άνθρακα και αζώτου αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένας 3^2 κεντρικός πειραματικός σχεδιασμός με τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης και του YE ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Το εύρος των δοκιμαζόμενων συγκεντρώσεων για τη γλυκόζη ήταν από 3-17 g/L και για το YE από 11-39 g/L, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων. Στον Πιν. 4.2 παρουσιάζονται οι συνδυασμοί των κωδικοποιημένων τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και τα πειραματικά

αποτελέσματα από την ανάλυση. Τρεις επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν για το κεντρικό σημείο του σχεδίου, ενώ το σύνολο των συνδυασμένων πειραματικών συνθηκών ήταν 11.

Πίνακας 4.3 Ανάλυση της διασποράς (ANOVA) του μοντέλου που προβλέπει την παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345

	BE	AT	MT	F	P
Μεταβλητές	5	56.1	11.2	20.47	0.0024
Σφάλματα	5	2.7	0.5		
Σύνολο	10	58.9	5.9		

Συντελεστής Προσαρμογής $R^2=0.953$, Τυπικό Σφάλμα Εκτίμησης 0.74.

BE: Βαθμοί Ελευθερίας, AT: Άθροισμα Τετραγώνων, MT: Μέσοι Τετραγώνων

Πίνακας 4.4 Εκτιμώμενοι συντελεστοί παλινδρόμησης του δευτέρου βαθμού πολυωνυμικού μοντέλου

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Συντελεστές	Τυπικό Σφάλμα	t	p
Σταθερά	-8.4128	3.0566	-2.7523	0.0402
X_1	0.9147	0.3177	2.8795	0.0346
X_2	0.9396	0.1764	5.3258	0.0031
X_1^2	-0.0476	0.0126	-3.7636	0.0131
X_2^2	-0.0185	0.0032	-5.8552	0.0021
$X_1 X_2$	0.0130	0.0074	1.7531	0.1400

Η ορθότητα του μοντέλου δοκιμάστηκε με την ανάλυση της διασποράς (Πιν. 4.3 και 4.4). Η τιμή της F (20.47) που υπολογίστηκε αποδεικνύει ότι το μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης. Επίσης, η τιμή της P -πιθανότητας ήταν πολύ χαμηλή ($P=0.0024$), αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα των όρων του μοντέλου. Από την τιμή του συντελεστή μεταβλητότητας ($R^2=0.9534$), φαίνεται να υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών.

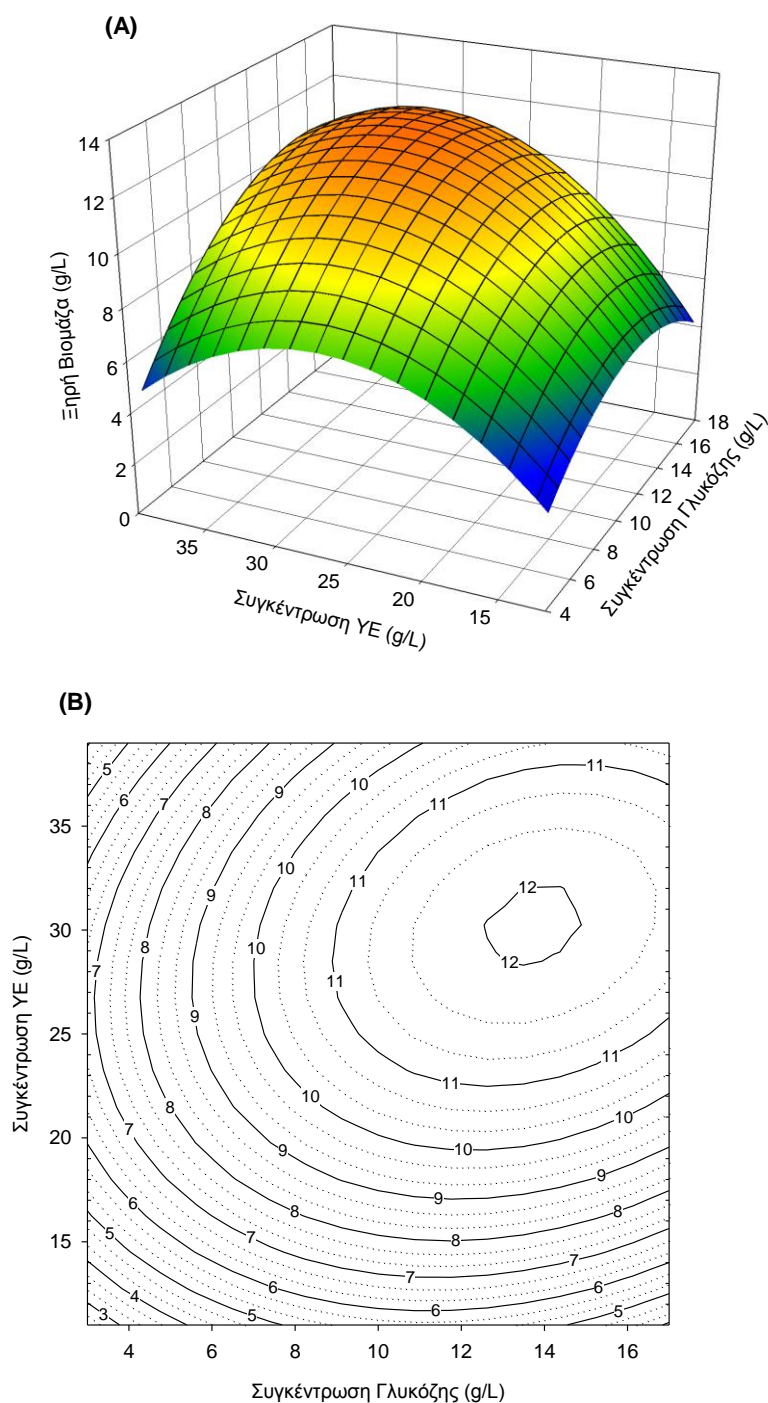
Το δευτέρο βαθμού πολυωνυμικό μοντέλο που προέκυψε και περιγράφει την επίδραση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και του ΥΕ στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* δίνεται από την εξίσωση (1):

$$Y = -8.4 + 0.92 \cdot X_1 + 0.94 \cdot X_2 + 0.013 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.048 \cdot X_1^2 - 0.019 \cdot X_2^2 \quad (1)$$

Η δοκιμασία Student's t-test πραγματοποιήθηκε για την εκτίμηση της σημαντικότητας των συντελεστών παλινδρόμησης. Οι συντελεστές παλινδρόμησης, οι τιμές t και p για τις πρώτου και δευτέρου βαθμού καθώς και τις συνδυασμένες επιδράσεις δίνονται στον Πιν. 4.4. Όπως διαπιστώνεται, οι συντελεστές για την ανεξάρτητη αλλά και για την δευτέρου βαθμού επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του ΥΕ, κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το δοκιμαζόμενο στέλεχος Βασιδιομύκητα ($p < 0.05$). Απεναντίας, η αλληλεπίδρασή τους δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική ($p > 0.05$).

Ακόμα, από το παραπάνω μοντέλο (1) και σε συνδυασμό με τα δεδομένα του Πιν. 4.4, διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση τόσο της γλυκόζης, όσο και του ΥΕ ασκεί σημαντική επίδραση ($P < 0.05$), ίδιου περίπου βαθμού στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe*, καθώς οι αντίστοιχοι συντελεστές παλινδρόμησης τους βρέθηκαν σχεδόν ίσοι. Οι θετικοί συντελεστές της συγκέντρωσης της γλυκόζης (X_1), του ΥΕ (X_2), καθώς και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης ($X_1 X_2$) φανερώσουν θετική επίδρασή στην αύξηση της βιομάζας. Αντιθέτως, οι δευτέρου βαθμοί όροι του μοντέλου (X_1^2, X_2^2), φαίνεται να ασκούν αρνητική επίδραση στην μυκηλιακή ανάπτυξη.

Η απορρέουσα ισοϋψής καμπύλη στην οποία φαίνεται η επίδραση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και του ΥΕ στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe*, παρουσιάζεται στο Γράφ. 4.9. Όπως είναι φανερό η σχηματιζόμενη επιφάνεια απόκρισης παρουσιάζει ένα μέγιστο σημείο. Το άριστο ζεύγος τιμών συγκεντρώσεων γλυκόζης και ΥΕ για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό βρέθηκε να είναι: 13.7 g/L γλυκόζη και 30g/L ΥΕ, με μέγιστη προβλεπόμενη παραγωγή ξηρής βιομάζας 11.8 g/L. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε την έβδομη ημέρα της κύριας καλλιέργειας. Η παραγωγικότητα έφτασε τα 0.07 g L⁻¹h⁻¹.



Γράφημα 4.9 (A) Επιφάνεια απόκρισης και **(B)** ισοϋψής καμπύλη που δείχνει την επίδραση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και του YE, καθώς και την συνδυαστική τους επίδραση στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* ATHUM 4345. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε πειραματική συνθήκη και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.7 Μελέτη της ανάπτυξης του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα 20 L

Οι άριστες συνθήκες που προέκυψαν για το *G. australe* ATHUM 4345 από τις μικρής κλίμακας υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες εφαρμόστηκαν σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου βυθισμένης καλλιέργειας όγκου 20 L (Εικ. 4.2). Στο Γράφ. 4.10 παρουσιάζεται η παραγωγή ξηρής βιομάζας και η συγκέντρωση της εναπομείνουσας γλυκόζης κατά τη μυκηλιακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα.



Εικόνα 4.2 Ανάπτυξη του *G. australe* ATHUM 4345 σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 L στο εργαστήριο

Όπως διαπιστώνεται, η παραγωγή βιομάζας έλαβε τη μέγιστη τιμή της 10.1 ± 0.4 g/L στις 112 h της καλλιέργειας. Η τιμή αυτή συμπίπτει με την αντίστοιχη που σημειώθηκε στις μικρής κλίμακας πειραματικές σειρές, αν και ο απαιτούμενος χρόνος για τη μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη στην περίπτωση της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα ήταν κατά 33.3% λιγότερος σε σχέση με αυτόν στην περίπτωση των υγρών αναδευόμενων καλλιεργειών σε φιάλες. Έτσι, ο ολικός ρυθμός ανάπτυξης (R_x) φαίνεται να αυξήθηκε σημαντικά προσεγγίζοντας τα $2.2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ έναντι της τιμής $1.4 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ για την καλλιέργεια σε φιάλες. Μάλιστα, οι Lee W. Y. et al. (2007) ανέφεραν τιμές (R_x) από 2.19 μέχρι 2.70 ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης σχετικά με τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. applanatum* σε βιοαντιδραστήρα. Ο πλέον σημαντικός παράγοντας για την σημαντική αύξηση της παραγωγικότητας όσον αφορά τη βιομάζα που προέκυψε από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα, σε

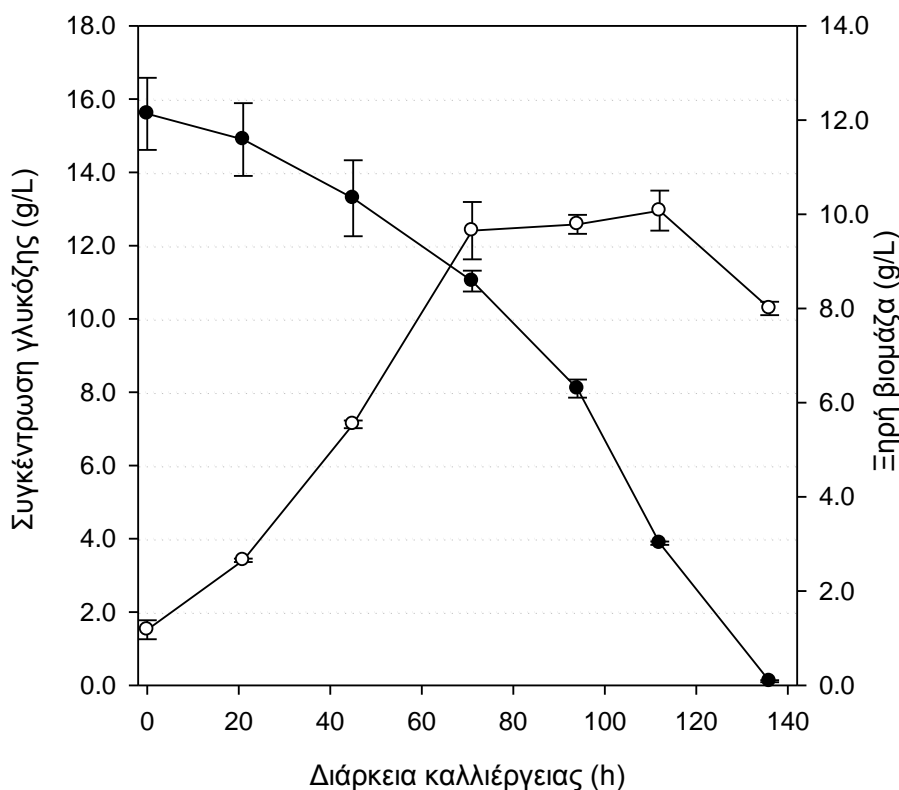
σχέση με τις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες σε φιάλες είναι οι διαφορετικές συνθήκες αερισμού. Στην διεργασία του βιοαντιδραστήρα η παροχή αερισμού ρυθμιζόταν ώστε το διαλυτό οξυγόνο να είναι πάνω από το 10% του κορεσμού του. Επιπλέον οι Mantzouridou et al. (2002) έχουν αναφέρει ότι ο αερισμός ευνοεί την μυκηλιακή ανάπτυξη καθώς και την συμπεριφορά των μικροβιακών κυττάρων αφού βελτιώνει τις συνθήκες μεταφοράς μάζας που σχετίζεται με τα υποστρώματα, τα προϊόντα και το οξυγόνο.



Εικόνα 4.3 Μυκηλιακά συσσωματώματα όπως διακρίνονται ύστερα από δειγματοληψία και διήθηση υπό κενό κατά την ανάπτυξη του *G. australe* ATHUM 4345 σε βιοαντιδραστήρα

Είναι ακόμα ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι το μυκήλιο που αναπτύχθηκε από την διεργασία στο βιοαντιδραστήρα είχε μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max}) $0.030 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, ενώ η ειδική αφομοίωση γλυκόζης υπολογίστηκε $0.088 \pm 0.001 \text{ mmol γλυκόζης} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW} \cdot \text{h}^{-1}$.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι θρεπτικές απαιτήσεις του συγκεκριμένου στελέχους του *G. australe* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα δεν έχουν έως σήμερα μελετηθεί από άλλους ερευνητές. Η τιμή $Y_{x/s}$ που ορίζεται ως παραγόμενη βιομάζα (g) ανά (g) σακχάρου που χρησιμοποιείται στο μέσο ανάπτυξης, βρέθηκε 0.2 για το *G. australe* σε βυθισμένη καλλιέργεια όπως έχουν αναφέρει οι Ellissetche et al. (2007), που είναι όμως 4 φορές μικρότερη από την τιμή $Y_{x/s}=0.73$ που υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Για λόγους σύγκρισης σχετικά με τη βυθισμένη καλλιέργεια άλλων ειδών του γένους *Ganoderma*, για το *G. resinaceum* η τιμή $Y_{x/s}$ βρέθηκε 0.5 (Kim et al. 2006), για το *G. applanatum* 0.44 (Lee W.Y. et al. 2007), ενώ για το *G. lucidum* κυμαινόταν από 0.22 έως 0.75 (Fang & Zhong 2002, Kim H.M. et al. 2005, Xu et al. 2008, Yang 2005).



Γράφημα 4.10 Παραγωγή ξηρής βιομάζας (○) και κατανάλωση γλυκόζης (●) κατά την ανάπτυξη του *G. australe* ATHUM 4345 σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 L. Η θερμοκρασία, η ανάδευση και η τιμή του pH ρυθμίστηκαν αυτόματα ($T=28^{\circ}\text{C}$, 160 rpm και $\text{pH}=6.0$) για 140h. Το μέσο ανάπτυξης περιείχε 13.7g/L γλυκόζη, 30g/L YE, 2.2 g/L KH_2PO_4 και 0.4 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Τέλος, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας, η κυτταρική μάζα συνίσταντο από διαφορετικής διαμέτρου, σφαιρικά με λεία επιφάνεια μυκηλιακά συσσωματώματα (Εικ. 4.3). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Lee et al. (1999), όταν σε βυθισμένη καλλιέργεια του *G. lucidum* σε βιοαντιδραστήρα δεν ρυθμιζόταν η τιμή του pH, παρατηρήθηκε αλλαγή στη μορφολογία της μυκηλιακής ανάπτυξης και συγκεκριμένα από μυκηλιακά συσσωματώματα που αρχικά σχηματίστηκαν επικράτησαν τελικά οι διασκορπισμένες υφές, γεγονός που δεν συνέβει όταν η τιμή του pH ρυθμίστηκε στο 6.0, οπότε για όλη την περίοδο της καλλιέργειας ο μικροοργανισμός αναπτυσσόταν με τη μορφή μόνο των μυκηλιακών συσσωματωμάτων. Πάντως κατά την ανάπτυξη του μελετώμενου στελέχους *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα, παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του ζωμού της

καλλιέργειας γεγονός που φαίνεται να αποδίδεται στην αύξηση της βιομάζας αλλά και στην παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών (Hwang et al. 2004). Το αποτέλεσμα όπως αναφέρεται, είναι να καθιστάται δυσχερής η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και οξυγόνου πέρα από τη ζώνη σάρωσης του αναδευτήρα, κάτι βέβαιο που δεν είναι τόσο έντονο όταν η ανάπτυξη γίνεται με μορφή μυκηλιακών συσσωματωμάτων σε σύγκριση με την περίπτωση της ανάπτυξης σε διασκορπισμένες υφές (Gibbs et al. 2000).

4.8 Χημική σύσταση του μυκηλίου του *G. australe* από την ανάπτυξή του σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας

Στον Πιν. 4.5 παρουσιάζεται η συγκέντρωση (%) των κύριων συστατικών που περιέχονται στο μυκήλιο (ATHUM 4345) από την καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας μετά το τέλος της διεργασίας, αφού προηγήθηκε φυγοκέντρηση και ψυχοξήρανση. Παράλληλα, τα δεδομένα αυτά συγκρίνονται με εκείνα από την αντίστοιχη ανάλυση του ξηρού καρποσώματος (ATHUM 4322), με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας στην βασική σύσταση του μακρομύκητα.

Σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ολικών διαιτητικών ινών βρέθηκε να περιέχει το μυκήλιο ($34.1 \pm 1.2\%$) σε σχέση με του αντίστοιχου καρποσώματος ($68.9 \pm 1.9\%$), όπως προσδιορίστηκε με μέθοδο που περιγράφεται στο ειδικό εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα K-TDFR 12/05 της Megazyme (Ireland), σε συμφωνία με την ενζυμική-βαρομετρική μέθοδο AOAC 991.43. Πάντως είναι γνωστό από άλλες μελέτες ότι τα καρποσώματα ειδών του γένους *Ganoderma* είναι πλούσιες από μόνα τους σε διαιτητικές ίνες. Για παράδειγμα, ο Cheung (1997b) ανέφερε ποσοστό ολικών διαιτητικών ινών 45.9% επί ξηρού για το καρπόσωμα του *G. lucidum*, όπως το προσδιόρισε με την ενζυματική AOAC μέθοδο, ενώ ο Stamets (2005b) ανέφερε για το *G. lucidum* ότι περιέχει 66.8% επί ξηρού ολικών διαιτητικών ινών και για το *G. oregonense* 72%. Είναι γνωστό παντός πως οι υδατάνθρακες των Βασιδιομυκήτων συνίστανται από πολυσακχαρίτες, όπως γλουκάνες, μόνο- και δισακχαρίτες, αλκοολικά σάκχαρα, γλυκογόνο και χιτίνη (Kalač 2009). Μάλιστα σύμφωνα με το Stamets (2005b) το ποσοστό υδατανθράκων για το καρπόσωμα του *G. lucidum* βρέθηκε 71.0% και του *G. oregonense* 72.8%, γεγονός που αποδεικνύει σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα του ίδιου ερευνητή ότι οι διαιτητικές ίνες επικρατούν έναντι των άλλων υδατανθράκων στα είδη του γένους *Ganoderma*. Επομένως, με βάση τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα δικαιολογείται το υψηλό ποσοστό ολικών διαιτητικών ινών που βρέθηκε για το καρπόσωμα του *G. australe* στην παρούσα μελέτη.

Η σημαντική μείωση όμως του περιεχομένου των ολικών διαιτητικών ινών που προέκυψε ύστερα από την βυθισμένη καλλιέργεια του Βασιδιομύκητα σε βιοαντιδραστήρα, σε σχέση με αυτό που περιέχει το φυσικό καρπόσωμα, έρχεται σε αντίθεση με σχετική μελέτη από τον Cheung (1997a), Comfortin et al. (2008) και Manu-Tawiah & Martin (1987), που αναφέρουν ότι το μυκήλιο πολλών εδώδιμων Βασιδιομυκήτων περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση ολικών διαιτητικών ινών σε σχέση με το αντίστοιχο καρπόσωμά τους. Βέβαια, καμία σχετική μελέτη για το μυκήλιο ειδών συγκεκριμένα του γένους *Ganoderma*, δεν είναι έως σήμερα διαθέσιμη.

Πίνακας 4.5 Χημική σύσταση του *G. australe* για το μυκήλιο (ATHUM 4345) και το καρπόσωμα (ATHUM 4322)

Συστατικά	Μυκήλιο	Καρπόσωμα
Διαιτητικές Ίνες (TDF) (%)	34.1 ± 1.2	68.9 ± 1.9
α-γλουκάνες (%)	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1
β-γλουκάνες (%)	8.3 ± 0.6	7.4 ± 0.7
Πρωτεΐνες (%)	35.9 ± 3.1	7.6 ± 0.7
Ολικό Λίπος (%)	11.5±0.2	2.8±0.3
Μη-πολικό λίπος (%)	2.2 ± 0.1	0.8 ± 0.2
Τέφρα (%)	10.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2

Οι φυσικοχημικές δοκιμές έγιναν σε 100 g βιομάζας (ξηρό μυκήλιο ή καρπόσωμα)

Σχετικά με τις περιεχόμενες ολικές γλουκάνες (α- και β-γλουκάνες), η μέτρηση των οποίων έγινε με ειδικό εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα K-YBGL της Megazyme (Ireland), το μυκήλιο φαίνεται να περιέχει υψηλότερο ποσοστό (9.5%) σε σχέση με το καρπόσωμα (8.1%). Το ποσοστό των ολικών γλουκανών στο μυκήλιο και στο καρπόσωμα του *G. australe* όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα αντιπροσωπεύει το 27.9% και 11.8% των ολικών διαιτητικών ινών, αντίστοιχα. Δεδομένου ότι οι ολικές διαιτητικές ίνες στα μανιτάρια συνίστανται από το άθροισμα των υδατανθράκων που είναι ανθεκτικοί στη πέψη, ο επικρατέστερος από των οποίων είναι η χιτίνη (Vetter 2007) και ότι οι γλουκάνες αποτελούν συστατικά του διαλυτού (SDF) και αδιάλυτου κλάσματος (IDF) (Proskey et al. 1988), συμπεραίνεται ότι μάλλον μεγαλύτερο ποσοστό χιτίνης περιέχεται στο καρπόσωμα.

Από τις δύο διαφορετικές δομές γλουκανών, φαίνεται ότι επικρατούν σημαντικά οι β-έναντι των α-γλουκανών τόσο στο μυκηλιακή μορφή του Βασιδιομύκητα όσο και στο φυσικό καρπόσωμα. Το ποσοστό των β-γλουκανών βρέθηκε υψηλότερο για το μυκήλιο $8.3 \pm 0.6\%$ σε σχέση με το αντίστοιχο του καρποσώματος ($7.4 \pm 0.7\%$). Επιπλέον, οι εξωπολυσακχαρίτες που παράχτηκαν και καταβυθίστηκαν κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα βρέθηκε να περιέχουν $0.19 \pm 0.01\%$ επί ξηρού α-γλουκάνες και σχεδόν τριπλάσια συγκέντρωση β-γλουκανών ($0.6 \pm 0.1\%$). Σε σύγκριση λοιπόν με το περιεχόμενο ολικών γλουκανών στο μυκήλιο, φαίνεται ότι στο εξωκυτταρικό υγρό ανακτήθηκε υποδωδεκαπλάσια συγκέντρωση.

Η βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να είχε ιδιαίτερη επίδραση στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο, αφού ενώ στο καρπόσωμα που αναλύθηκε το ποσοστό ολικής πρωτεΐνης βρέθηκε μόνο $7.6 \pm 0.1\%$, στο μυκήλιο ήταν σημαντικό μεγαλύτερο ($35.9 \pm 3.1\%$). Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο καρπόσωμα του *G. australe* βρέθηκε χαμηλότερο από αυτό που έχει αναφερθεί από τον Stamets (2005b) για άλλα είδη *Ganoderma* ($13.3-15.5\%$).

Το αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο που σημειώθηκε στο μυκήλιο σε σχέση με αυτό του καρποσώματος, έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Manu-Tawiah & Martin (1987) καθώς και των Confortin et al. (2008) σχετικά με το *P. ostreatus* και το *P. sajor-caju* αντίστοιχα, όπου αναφέρεται ότι στο καρπόσωμα συναντάται υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης σε σχέση με το μυκήλιο που προκύπτει υπό συνθήκες υγρής αναδευόμενης καλλιέργειας. Παρόλα αυτά για είδη του γένους *Ganoderma*, δεν είναι διαθέσιμη σήμερα καμία μελέτη στην οποία να περιγράφεται η επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας στο πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Πάντως, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι το ποσοστό της περιεχόμενης πρωτεΐνης στους Βασιδιομύκητες επηρεάζεται εκτός από το είδος και από πολλούς άλλους παράγοντες όπως το στάδιο ανάπτυξης, το τμήμα του καρποσώματος που αναλύεται, οι συνθήκες ανάπτυξης, οι γεωγραφική περιοχή και ο χρόνος συλλογής τους, αλλά και από τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού (Bernas et al. 2006, Flegg & Maw 1977, Ozcan & Akgül 1998).

Το εκχυλιζόμενο λίπος χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) όπως προσδιόριστηκε χρησιμοποιώντας τη διάταξη Soxhlet, βρέθηκε σε υψηλότερο ποσοστό στο μυκήλιο ($11.5 \pm 0.2\%$) σε σχέση με αυτό του καρποσώματος ($2.8 \pm 0.3\%$). Επιπλέον, όπως διαπιστώνεται το ποσοστό μη πολικού λίπους όπως προσδιορίστηκε μετά από εκχύλιση με τη διάταξη Soxhlet, χρησιμοποιώντας εξάνιο, φαίνεται ότι είναι και αυτό υψηλότερο για το μυκήλιο ($2.2 \pm 0.1\%$) σε σχέση με του καρποσώματος ($0.8 \pm 0.2\%$). Το ποσοστό μη πολικού λίπους

που βρέθηκε για το καρπόσωμα του συγκεκριμένου στελέχους του *P. ostreatus* βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών (0.4-12.6%) που έχει αναφερθεί και για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων (Barros et al. 2007a, Colak et al. 2009, Kostelc & Hendry 1981, Ouzouni et al. 2009, Pedneault et al. 2006, Sherief et al. 1993). Μάλιστα φαίνεται ότι το λίπος (%) που βρέθηκε για το καρπόσωμα του *G. australe* βρίσκεται στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτό άλλων ειδών *Ganoderma* που έχουν αναφερθεί, όπως του *G. lucidum* (3.48%) και του *G. oregonense* (2.52%) επί ξηρού (Stamets 2005b).

Το αυξημένο ποσοστό λίπους που σημειώθηκε στο μυκήλιο σε σχέση με αυτό του καρποσώματος, έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Manu-Tawiah & Martin (1987) καθώς και των Confortin et al. (2008) σχετικά με το *P. ostreatus* και το *P. sajor-caju* αντίστοιχα, όπου αναφέρεται ότι το μυκήλιο που προκύπτει υπό συνθήκες υγρής αναδεδυόμενης καλλιέργειας είναι πλουσιότερο σε σχέση με του φυσικού καρποσώματος. Μελέτες σχετικά με την περιεκτικότητα του μυκήλιου σε λίπος Βασιδιομυκήτων συγκεκριμένα του γένους *Ganoderma*, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα για να γίνει σύγκριση με τα παρόντα αποτελέσματα.

Το ποσοστό τέφρας (%) βρέθηκε στο καρπόσωμα σχεδόν το μισό ($4.8 \pm 0.2\%$), σε σχέση με του μυκηλίου ($10.9 \pm 0.7\%$), σε συμφωνία με άλλες μελέτες όπου το ποσοστό τέφρας συναντάται υψηλότερο στο μυκήλιο από ότι στο καρπόσωμα (Confortin et al. 2008, Manu-Tawiah & Martin 1987). Το ποσοστό τέφρας που βρέθηκε για το καρπόσωμα του *G. australe* βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών που έχει αναφερθεί για τους Βασιδιομύκητες (2.9-12% επί ξηρού) (Colak et al. 2009, Kalač et al. 2009, Ouzouni et al. 2009).

Τέλος, προσδιορίστηκε και η περιεχόμενη υγρασία (89.12%) για το μυκήλιο του *G. australe*, που έρχεται σε συμφωνία με τους Manzi et al. (2001) ότι τα φρέσκα μανιτάρια περιέχουν 82-95% νερό.

4.9 Επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων

Με βάση τα δεδομένα της προηγούμενης παραγράφου, το μη πολικό λιπαρό εκχύλισμα του μυκηλίου του *G. australe* που προέκυψε από την βυθισμένη καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα βρέθηκε κατά 50% περισσότερο σε σχέση με αυτό του αντίστοιχου φυσικού καρποσώματος. Ύστερα από χρωματογραφική ανάλυση με GC του προφίλ των λιπαρών οξέων του μη πολικού λιπαρού εκχυλίσματος από το μυκήλιο (ATHUM 4345) και το καρπόσωμα (ATHUM 4322) του *G. australe*, σημειώθηκε η παρουσία 31 διαφορετικών λιπαρών οξέων με μήκος ανθρακικής αλυσίδας να κυμαίνεται από 10 έως 22 άτομα άνθρακα (Πιν. 4.6).

Αυτό έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων για διάφορα είδη Βασιδιομυκήτων κυμαίνεται από 8 μέχρι 24 άτομα άνθρακα (Pedneault et al. 2007, Yilmaz et al. 2006). Τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα και για τις δύο δομές του *G. australe* είναι από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA) το λινελαϊκό (C18:2ω-6) και το ελαϊκό οξύ (C18:1ω-9), και από τα κορεσμένα (SFA) το παλμιτικό (C16:0) και το στεαρικό οξύ (C18:0). Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι και σε άλλα είδη Βασιδιομυκήτων, τα παραπάνω αναφερόμενα λιπαρά οξέα έχουν βρεθεί επικρατέστερα (Barros et al. 2007b, León-Guzmán et al. 1997, Ribeiro et al. 2009, Yilmaz et al. 2006).

Μεταξύ των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν, βρέθηκαν αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα, όπως το πενταδεκανοϊκό (C15:0), το επταδεκανοϊκό (C17:0) καθώς και το κύκλο-επταδεκανοϊκό οξύ (cyclo-C17:0). Η παρουσία τέτοιων λιπαρών οξέων έχει αναφερθεί ακόμα και από τους Stancher et al. (1992) καθώς και από τους Kavishree et al. (2008) για καρποσώματα διαφορετικών ειδών Βασιδιομυκήτων που συλλέχτηκαν από την Ιταλία και την Ινδία, αντίστοιχα. Μάλιστα, ενώ και τα τρία παραπάνω λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν στο καρπόσωμα, στο μυκήλιο δεν ανιχνεύτηκε ούτε το πενταδεκανοϊκό ούτε το κύκλο-επταδεκανοϊκό οξύ, γεγονός που ίσως αποδίδεται στην επίδραση που η βυθισμένη καλλιέργεια άσκησε στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Το επταδεκανοϊκό οξύ ανιχνεύτηκε παντως και στις δύο δομές σε μέσο ποσοστό 2% του συνόλου των λιπαρών οξέων.

Από την χρωματογραφική ανάλυση του προφίλ λιπαρών οξέων για το *G. australe* φαίνεται ότι το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ ανακτήθηκαν στις ίδιες περίπου συγκεντρώσεις (27.54 ± 0.27 και $26.55 \pm 0.27\%$, αντίστοιχα) σε σχέση με το σύνολο των λιπαρών οξέων στο καρπόσωμα του *G. australe*. Παρομοίως οι Martinez et al. (1991) ανέφεραν παρόμοια ποσοστά του λινολεϊκού και ελαϊκού οξέος στο προφίλ των λιπαρών οξέων του καρποσώματος του *G. australe*. Με τη βυθισμένη όμως καλλιέργεια του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα, τροποποιήθηκε η παραπάνω αναλογία αφού το λινελαϊκό οξύ επικράτησε σημαντικά ($53.99 \pm 0.52\%$), όπως παρατηρείται και από τον Πιν. 4.6.

Πίνακας 4.6 Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w) του μη πολικού λίπους του καρποσώματος και του μυκηλίου του *G. australe* (ATHUM 4322 και ATHUM 4345, αντίστοιχα)

Λιπαρά οξέα	Καρπόσωμα (<i>G. australe</i> ATHUM 4322)	Μυκήλιο (<i>G. australe</i> ATHUM 4345)
C10:0	0.31±0.01	-
C12:0	0.33±0.01	-
C14:0	2.11±0.01	-
C14:1	0.44±0.01	-
iso-C15:0	0.20±0.01 ^a	0.35±0.01 ^b
C15:0	1.37±0.01	-
C15:1ω-5	1.53±0.01 ^a	1.50±0.01 ^b
C16:0	12.64±0.04 ^a	18.24±0.05 ^b
iso-C16:0	1.37±0.01 ^a	0.44±0.01 ^b
C16:1ω-9 <i>cis</i>	2.23±0.01 ^a	3.04±0.01 ^b
cyclo-C17:0	0.44±0.01	-
C17:0	1.84±0.02 ^a	2.23±0.02 ^b
C17:1ω-7 <i>cis</i>	1.46±0.01	-
C18:0	4.69±0.05 ^a	3.83±0.04 ^b
C18:1ω-9 <i>trans</i>	-	0.24±0.01
C18:1ω-9 <i>cis</i>	26.55±0.27 ^a	8.61±0.09 ^b
C18:1ω-7 <i>cis</i>	1.93±0.01	-
C18:2ω-6 <i>trans</i>	0.20±0.01 ^a	0.57±0.01 ^b
C18:2ω-6 <i>cis</i>	27.54±0.27 ^a	53.99±0.52 ^b
C18:3ω-6 <i>cis</i>	1.97±0.02 ^a	0.68±0.01 ^b
C18:3ω-3 <i>cis</i>	3.23±0.03 ^a	0.53±0.01 ^b
C18:4ω-3 <i>cis</i>	0.11±0.01	-
C19:0	0.39±0.01 ^a	3.18±0.02 ^b
C20:0	0.34±0.01 ^a	1.19±0.02 ^b
C20:1ω-9 <i>cis</i>	1.71±0.02	-
C20:2ω-6 <i>cis</i>	0.20±0.01 ^a	0.17±0.01 ^b
C20:4ω-6 <i>cis</i>	2.03±0.04	-
C22:5ω-6 <i>cis</i>	1.75±0.01 ^a	1.05±0.01 ^b
C22:5ω-3 <i>cis</i>	-	0.11±0.01
C24:0	0.21±0.01	-
C22:6ω-3 <i>cis</i>	0.89±0.02 ^a	0.05±0.01 ^b
SFA (Σω:0)	26.25±0.13 ^a	29.46±0.15 ^b
MUFA (Σω:1)	35.84±0.32 ^a	13.39±0.11 ^b
PUFA (Σω:n)	37.91±0.40 ^a	57.15±0.55 ^b
PUFA/SFA	1.44±0.01 ^a	1.94±0.01 ^b
MUFA/SFA	1.37±0.01 ^a	0.45±0.10 ^b
Σω:3	4.23±0.05 ^a	0.69±0.01 ^b
Σω:6	33.68±0.34 ^a	56.47±0.54 ^b
ω-6/ω-3	7.96±0.01 ^a	82.44±0.01 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Από τα κύρια λιπαρά οξέα που συναντώνται στο προφίλ λιπαρών οξέων του *G. australe*, το στεαρικό και το παλμιτικό οξύ ανιχνεύτηκαν στα ίδια επίπεδα και για τις δύο δομές

του μύκητα, γεγονός που αποδεικνύει την απουσία της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας στην αναλογία αυτών των κύριων SFA.

Πίνακας 4.8 Προφίλ λιπαρών οξέων εκφρασμένο ως mg /100 g μη πολικών λιπιδίων του ξηρού καρποσώματος και του μυκηλίου του *G. australe* (ATHUM 4322 και ATHUM 4345, αντίστοιχα)

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>G. australe</i> ATHUM 4322)	Μυκήλιο (<i>G. australe</i> ATHUM 4345)
C10:0	0.24±0.01	-
C12:0	0.27±0.01	-
C14:0	1.67±0.01	-
C14:1	0.35±0.01	-
iso-C15:0	0.16±0.01 ^a	0.28±0.01 ^b
C15:0	1.08±0.01	-
C15:1ω-5	1.21±0.01 ^a	1.21±0.01 ^b
C16:0	10.01±0.03 ^a	14.74±0.04 ^b
iso-C16:0	1.08±0.01 ^a	0.35±0.01 ^b
C16:1ω-9 <i>cis</i>	1.77±0.01 ^a	2.45±0.01 ^b
cyclo-C17:0	0.35±0.01	-
C17:0	1.46±0.01 ^a	1.80±0.02 ^b
C17:1ω-7 <i>cis</i>	1.15±0.01	-
C18:0	3.71±0.04 ^a	3.10±0.03 ^b
C18:1ω-9 <i>trans</i>	-	0.20±0.01
C18:1ω-9 <i>cis</i>	21.03±0.21 ^a	6.96±0.07 ^b
C18:1ω-7 <i>cis</i>	1.53±0.01	-
C18:2ω-6 <i>trans</i>	0.16±0.01 ^a	0.46±0.01 ^b
C18:2ω-6 <i>cis</i>	21.80±0.21 ^a	43.60±0.42 ^b
C18:3ω-6 <i>cis</i>	1.56±0.01 ^a	0.55±0.01 ^b
C18:3ω-3 <i>cis</i>	2.55±0.02 ^a	0.42±0.01 ^b
C18:4ω-3 <i>cis</i>	0.09±0.01	-
C19:0	0.30±0.01 ^a	2.57±0.02 ^b
C20:0	0.27±0.01 ^a	0.96±0.01 ^b
C20:1ω-9 <i>cis</i>	1.36±0.02	-
C20:2ω-6 <i>cis</i>	0.16±0.01 ^a	0.14±0.01 ^b
C20:4ω-6 <i>cis</i>	1.60±0.03	-
C22:5ω-6 <i>cis</i>	1.39±0.01 ^a	0.85±0.01 ^b
C22:5ω-3 <i>cis</i>	-	0.08±0.01
C24:0	0.17±0.01	-
C22:6ω-3 <i>cis</i>	0.71±0.01 ^a	0.04±0.01 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση αφορά την παρουσία *trans* λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε αν και σε χαμηλό ποσοστό, C18:1ω-9 *trans* στο μυκήλιο, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ($P<0.05$) του C18:2ω-6 *cis*-9, *trans*-11 στο μυκήλιο σε σχέση με το καρπόσωμα, γεγονός που φανερώνει ότι η βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* ευνοεί την παραγωγή *trans* λιπαρών οξέων. Αντιθέτως, τα α - και γ -λινολενικά οξέα μειώθηκαν σημαντικά ($P<0.05$) στο μυκήλιο. Το DHA (C22:6ω-3 *cis*) ανιχνεύτηκε και στις δύο δομές, επικράτησε όμως συγκριτικά στο καρπόσωμα. Η παρουσία του DHA σε μικρές συγκεντρώσεις έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές για διάφορα είδη Βασιδιομυκήτων (Barros et al. 2008a, Ribeiro et al. 2009). Ακόμα το διατροφικά πολύτιμο αραχιδονικό οξύ (C20:4ω-6 *cis*) που βρέθηκε σε ποσοστό 2.03% του συνόλου των λιπαρών οξέων, δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στο μυκήλιο. Επίσης αξίζει να αναφερθεί όπως διακρίνεται και από τον Πιν. 4.6 ότι τα παρακάτω λιπαρά οξέα ενώ ανιχνεύτηκαν στο καρπόσωμα του *G. australe*, όταν αυτό αναπτύχθηκε σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα δεν σημειώθηκαν. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι: C12:0, C14:0, C14:1, C17:1ω-7 *cis*, C18:1ω-7 *cis*, C18:4ω-3 *cis*, C20:1ω-9 *cis* και C24:0. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα ποσοστά των λιπαρών οξέων έδειξαν σημαντικές διαφορές ($P<0.05$) μεταξύ του καρποσώματος και του μυκηλίου του *G. australe*, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στο διαφορετικό υλικό που αναλύθηκε (καρπόσωμα/μυκήλιο) αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν.

Το ποσοστό των UFA επί του συνόλου των λιπαρών οξέων, όπως προκύπτει και από τον Πιν. 4.6, είναι υψηλό για το καρπόσωμα του *G. australe* (73.75%). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με σχετικές μελέτες για διάφορα είδη ανώτερων Βασιδιομυκήτων που ανήκουν ταξονομικά στις οικογένειες Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Coprinaceae, και Tricholomataceae, μεταξύ των οποίων και Ganodermataceae, για τα οποία έχει αναφερθεί ότι τα UFA επικρατούν των SFA στο σύνολο των λιπαρών οξέων (Barros et al. 2007b, Diéz & Alvarez 2001, Kavishree et al. 2008, Mauger et al. 2003;, Pedneault et al. 2007, Ribeiro et al. 2009). Όπως μάλιστα έχει αναφερθεί και για άλλους νηματοειδείς μύκητες τα UFA βοηθούν τους Βασιδιομύκητες να προσαρμοστούν στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης (Dart & Stretton 1976), αλλά επίσης συμβάλλουν και στην αποδόμηση της λιγνίνης από αυτούς τους μικροοργανισμούς (Gutiérrez et al. 2002).

Με τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα δεν φαίνεται να επηρεάστηκε η αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα αφού ο λόγος UFA/SFA βρέθηκε 2.80 για το καρπόσωμα και 2.38 για το μυκήλιο (Πιν. 4.6). Το ποσοστό των UFA κυμάνθηκε από 70.5% (μυκήλιο) μέχρι 73.8% (καρπόσωμα), που έρχεται σε συμφωνία με τους

Martínez et al. (1991) που ανέφεραν ποσοστό UFA 80% του συνόλου των λιπαρών για το ίδιο είδος. Παρόλα αυτά, με τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα μειώθηκε σημαντικά ($P<0.05$) το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) αλλά αυξήθηκε σημαντικά ($P<0.05$) το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) σε σχέση με το καρπόσωμα του ίδιου στελέχους. Επίσης, αυξήθηκε σημαντικά ($P<0.05$) το ποσοστό των ω -6 λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το καρπόσωμα, αφού ο λόγος ω -6/ ω -3 βρέθηκε πάνω από 10 φορές μεγαλύτερος στο μυκήλιο.

Πίνακας 4.7. Αθροίσματα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA, PUFA, TFA, $\Sigma\omega$:3, $\Sigma\omega$:6) εκφρασμένα ως mg /100 g μη πολικών λιπιδίων του ξηρού καρποσώματος και του μυκηλίου του *G. australe* (ATHUM 4322 και ATHUM 4345, αντίστοιχα)

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>G. australe</i> ATHUM 4322)	Μυκήλιο (<i>G. australe</i> ATHUM 4345)
SFA ($\Sigma\omega$:0)	20.79±0.11 ^a	23.80±0.13 ^b
MUFA ($\Sigma\omega$:1)	28.39±0.25 ^a	10.81±0.08 ^b
PUFA ($\Sigma\omega$:n)	30.02±0.31 ^a	46.16±0.45 ^b
TFA	79.20±0.14 ^a	80.77±0.17 ^b
$\Sigma\omega$:3	3.35±0.04 ^a	0.55±0.01 ^b
$\Sigma\omega$:6	26.67±0.27 ^a	45.61±0.44 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι \pm SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Στον Πιν. 4.7 παρουσιάζονται τα αθροίσματα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA, PUFA, TFA, $\Sigma\omega$:3, $\Sigma\omega$:6) εκφρασμένα ως mg/100g των μη πολικών λιπιδίων και για τις δύο δομές του *G. australe* που προέκυψαν από διαφορετικό τρόπο καλλιέργειας, ενώ στον Πιν. 4.8 για κάθε λιπαρό οξύ ξεχωριστά.

Οι αποδόσεις των λιπαρών οξέων ανά μονάδα ξηρού βάρους καρποσώματος ή μυκηλίου του *G. australe*, που διατροφικά κρίνονται περισσότερο χρήσιμα σε σχέση με τα ποσοστά, παρουσιάζονται στον Πιν. 4.9 για τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για το μυκήλιο που προήλθε από τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα, και για το καρπόσωμα από την οποίο αυτό προήλθε, διαπιστώνεται ότι η διεργασία ανάπτυξης στον βιοαντιδραστήρα ασκεί σημαντική επίδραση στο ολικό ανακτούμενο λίπος αλλά και στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Σημαντικές διαφορές

παρατηρήθηκαν στα SFA και στα PUFA ανάμεσα στις δύο δομές του Βασιδιομύκητα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε 3 και 4 φορές αυξημένη ποσότητα SFA και PUFA αντίστοιχα στο μυκήλιο του *G. australe*, σε σχέση με το καρπόσωμά του.

Πίνακας 4.9 Προφίλ των επικρατέστερων λιπαρών οξέων εκφρασμένο ως mg /100 g ξηρού καρποσώματος και μυκηλίου του *G. australe* (ATHUM 4322 και ATHUM 4345, αντίστοιχα)

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>G. australe</i> ATHUM 4322)	Μυκήλιο (<i>G. australe</i> ATHUM 4345)
C16:0	0.08±0.01 ^a	0.32±0.01 ^b
C18:0	0.03±0.00 ^a	0.07±0.00 ^b
C18:1ω-9 <i>cis</i>	0.17±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a
C18:2ω-6 <i>cis</i>	0.17±0.01 ^a	0.96±0.01 ^b
SFA (Σω:0)	0.17±0.01 ^a	0.52±0.01 ^b
MUFA (Σω:1)	0.23±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a
PUFA (Σω:n)	0.24±0.01 ^a	1.02±0.01 ^b
Σω:3	0.03±0.00 ^a	0.01±0.00 ^b
Σω:6	0.21±0.01 ^a	1.00±0.01 ^b
TFA	0.63±0.01 ^a	1.78±0.01 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Επίσης, η βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα, φαίνεται να επηρέασε και τον λόγο ελαϊκό / λινελαϊκό οξύ (C18:1ω-9 *cis*/C18:2ω-6 *cis*), αφού διαπιστώθηκε ότι μειώθηκε κατά 6 περίπου φορές σε σχέση με του καρποσώματος. Ο λόγος ελαϊκό / λινελαϊκό οξύ αποτελεί γενικά ένα σημαντικό κριτήριο από ταξονομικής πλευράς και χρησιμοποιείται για την ταξονομική διαφοροποίηση μεταξύ ειδών του ίδιου γένους (Kavishree et al. 2008).

Είναι γνωστό πάντως ότι το προφίλ λιπαρών οξέων για όλους τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των μυκήτων, μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με την επίδραση περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως είναι η τιμή του pH, η σύσταση του μέσου ανάπτυξης, η θερμοκρασία και ο αερισμός (Erwin 1973). Επιπλέον το μηλικό ένζυμο (ME, NADP⁺εξαρτώμενο, EC 1. 1. 1. 40) θεωρείται ότι αποτελεί το ένζυμο-κλειδί ελέγχου για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων από τους μύκητες (Zhang et al. 2007). Η δραστηριότητα αυτού

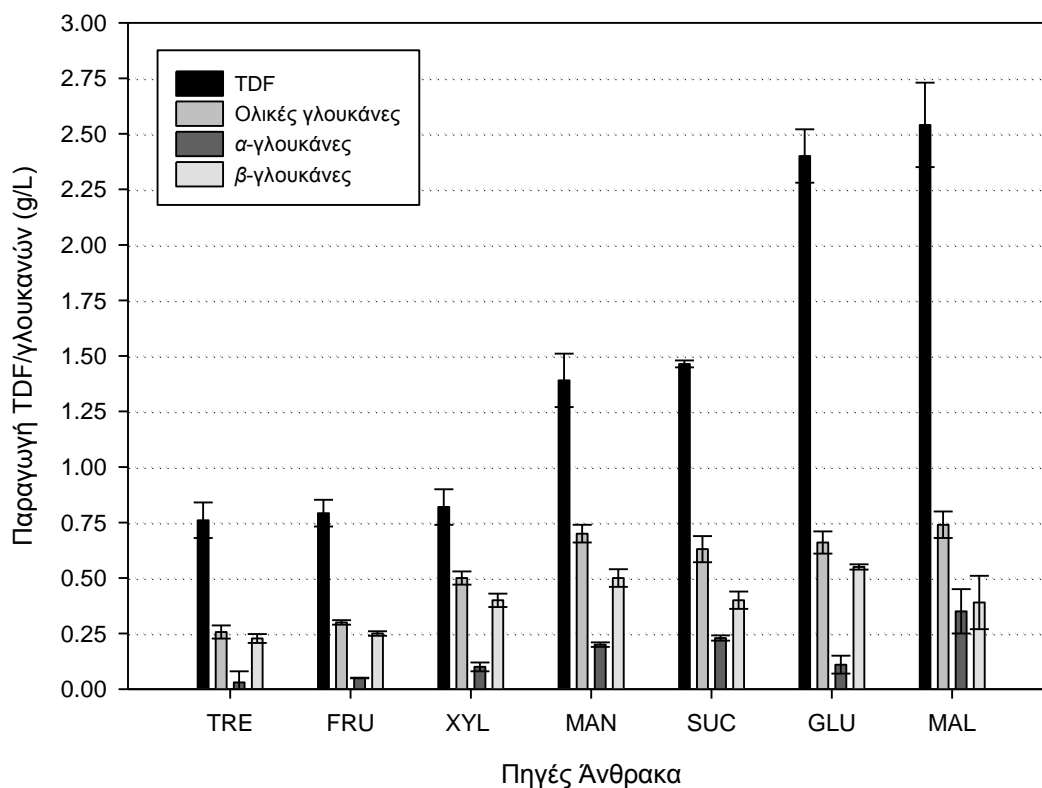
του ενζύμου έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται όταν χρησιμοποιούνται σύνθετες πηγές αζώτου, όπως είναι το ΥΕ που χρησιμοποιήθηκε στη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* στην παρούσα εργασία, όπως διαπιστώθηκε κατά την ανάπτυξη του ελαιογενούς μύκητα *Cunninghamella echinulata* (Cetic et al. 1999).

4.10 Επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή ολικών διαιτητικών ινών και γλουκανών

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στην παραγωγή ολικών διαιτητικών ινών και γλουκανών από το *G. australe* ATHUM 4345 σε βυθισμένες καλλιέργειες που έλαβαν χώρο σε φιάλες, μελετήθηκαν τα σάκχαρα γλυκόζη, μαλτόζη, μαννόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, ξυλόζη και τρεχαλόζη, τα οποία από τα προηγούμενα πειράματα αξιολόγησης σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες μικρής κλίμακας για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη, δώσαν υψηλή απόδοση ξηρής βιομάζας (>7.5 g/L), (βλ. παρ. 4.3).

Στο Γραφ. 4.11 παρουσιάζεται η απόδοση σε διαιτητικές ίνες και γλουκάνες εκφρασμένη σε g/L υγρής καλλιέργειας, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές μέγιστης παραγωγής βιομάζας που αντιστοιχεί για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα (βλ. παρ. 4.3). Η παραγωγή πολυσακχαριτών όπως εξάλλου και η μυκηλιακή ανάπτυξη φαίνεται να επηρεάζεται από τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης. Σημειώθηκε μάλιστα σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δοκιμαζόμενων πηγών άνθρακα ως προς την παραγωγή διαιτητικών ινών από το μελετώμενο στέλεχος Βασιδιομύκητα. Όπως διαπιστώνεται, η μαλτόζη και η γλυκόζη κρίνονται καταλληλότερες πηγές άνθρακα με απόδοση διαιτητικών ινών 2.54 ± 0.19 g/L και 2.4 ± 0.12 g/L, αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα των διαιτητικών ινών που παράχθηκε με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα τη μαλτόζη και τη γλυκόζη βρέθηκε 28.9% και 26.5% (w/w) επί ξηρού βάρους του μυκηλίου, αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα μάλιστα σάκχαρα έχουν αποδειχτεί καταλληλότερα για παραγωγή πολυσακχαριτών από είδη του γένους *Ganoderma* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες σύμφωνα με τα αποτελέσματα σχετικών μελετών (Elisashvili et al. 2009, Lee W.Y. et al. 2007). Το γεγονός ότι η γλυκόζη αποδείχθηκε κατάλληλη πηγή άνθρακα για την παραγωγή διαιτητικών ινών πιθανόν να οφείλεται στην αποδοτική ενσωμάτωσή της απευθείας στο γλυκολυτικό και αναπνευστικό μονοπάτι αμέσως μετά την φωσφορυλίωσή της (Garraway & Evans 1984). Επιπλέον, η μαλτόζη που είναι ουσιαστικά δισακχαρίτης της γλυκόζης, σε σχέση με τη γλυκόζη έδωσε υψηλότερες αποδόσεις

διαιτητικών ινών σε σχέση με αυτήν, που μάλλον αποδίδεται στην σχετική ευκολία της για πολυμερισμό και σχηματισμό πολυσακχαριτών (Hamedi et al. 2007).



Γράφημα 4.11 Μέγιστη παραγωγή διαιτητικών ινών (TDF) και ολικών γλουκανών (α -και β -γλουκανών) σε g/L σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας του *G. australe* ATHUM 4345, δοκιμάζοντας διαφορετικές πηγές άνθρακα (TRE: τρεχαλόζη, FRU: φρουκτόζη, XYL: ξυλόζη, MAN: μαννόζη, SUC: σουκρόζη, GLU: γλυκόζη και MAL: μαλτόζη). Το μέσο ανάπτυξης περιείχε YE (30 g/L), K_2HPO_4 (2.2 g/L) και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.4 g/L). Οι πηγές άνθρακα προστέθηκαν σε συγκέντρωση 13.7 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=30 \pm 2^\circ C$. Η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών εκφράζεται σε ξηρή βάση.

Σχετικά με το περιεχόμενο σε γλουκάνες, όπως φαίνεται από το ίδιο γράφημα η παραγωγή βιολογικά ενεργών β -γλουκανών από το *G. australe* βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη των α -γλουκανών για όλα τα δοκιμαζόμενα μέσα με διαφορετικές πηγές άνθρακα που ελέχθηκαν. Το υψηλότερο επίπεδο ολικών γλουκανών ανακτήθηκε με τη μαλτόζη ή τη μαννόζη ως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα με παραγωγή 0.74 ± 0.06 g/L και 0.70 ± 0.04 g/L, αντίστοιχα. Υψηλή παραγωγή ολικών γλουκανών σημειώθηκε και για το μέσο με τη

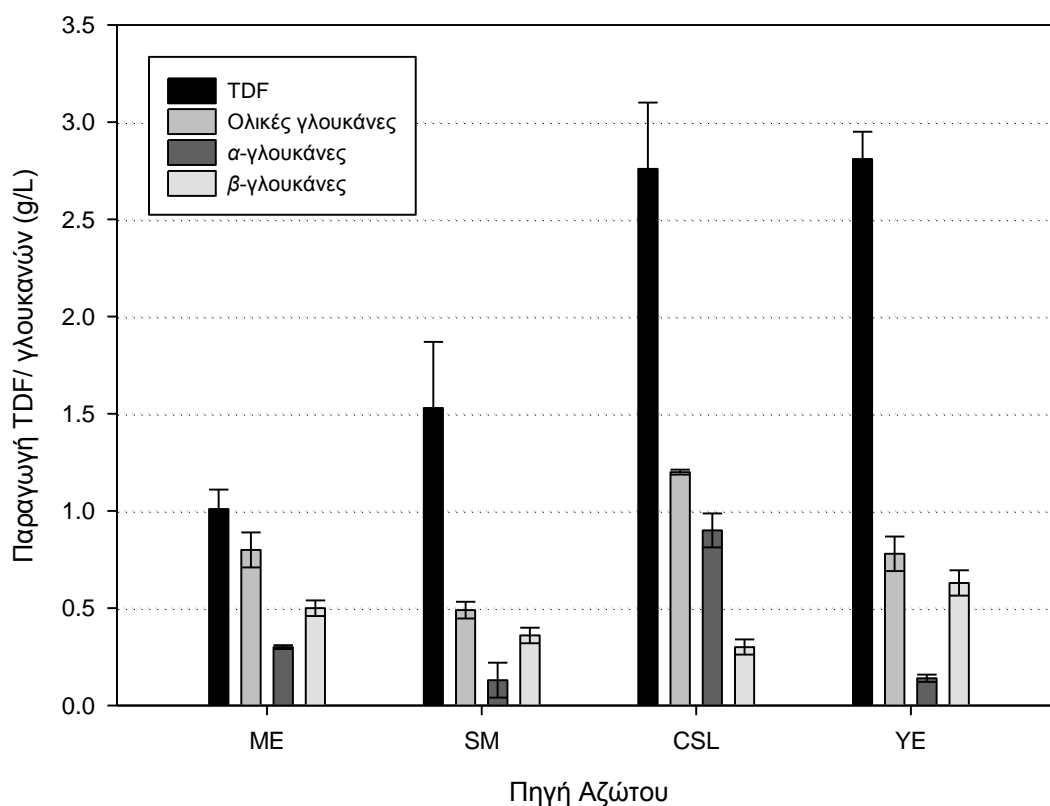
γλυκόζη (0.66 ± 0.05 g/L). Επίσης, να αναφερθεί ότι το (%) ποσοστό των διαιτητικών ινών που συνιστούν γλουκάνες υπολογίστηκε για τη μαλτόζη 29.1%, για τη γλυκόζη 27.5%, ενώ για τη μαννόζη 49.13%. Είναι ενδιαφέρον ότι με τη γλυκόζη ως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης, η απόδοση σε διατροφικά πολύτιμες β-γλουκάνες βρέθηκε κατά 9% και 29% υψηλότερη σε σχέση με το μέσο με τη μαννόζη και τη μαλτόζη, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μυκήλιο που προήλθε από τη διεργασία της βυθισμένης καλλιέργειας με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα τη μαλτόζη, τη μαννόζη ή τη γλυκόζη βρέθηκε να περιέχει 8.40%, 8.73% και 7.26% ολικές γλουκάνες (σε βάση % (w/w) του ξηρού βάρους), αντίστοιχα.

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής αζώτου στην παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών από το *G. australe* ATHUM 4345 σε βυθισμένες καλλιέργειες, μελετήθηκαν οι σύνθετες πηγές αζώτου CSL, αλεσμένη σόγια (SM), εκχύλισμα ζύμης (YE), και εκχύλισμα βύνης (ME) οι οποίες από τα προηγούμενα πειράματα αξιολόγησης για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη, δώσαν υψηλή απόδοση ξηρής βιομάζας (>7.5 g/L), (βλ. παρ. 4.4).

Στο Γραφ. 4.12 παρουσιάζεται η απόδοση διαιτητικών ινών εκφρασμένη σε g/L υγρής καλλιέργειας, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές μέγιστης παραγωγής βιομάζας (βλ. παρ. 4.4). Όπως διακρίνεται το YE και το CSL δώσαν τις υψηλότερες αποδόσεις διαιτητικών ινών 2.81 ± 0.14 g/L και 2.76 ± 0.34 g/L, αντίστοιχα με περιεκτικότητα 27.93 % και 29.20% (w/w) του ξηρού μυκηλίου, αντίστοιχα. Παρομοίως, το YE έχει αναφερθεί ως η καταλληλότερη πηγή αζώτου για την παραγωγή πολυσακχαριτών σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες ανώτερων μυκήτων σύμφωνα με μελέτες άλλων ερευνητών (Hamedi et al. 2007, Pokyhrrel & Ohga 2007). Γενικότερα, έχει αποδειχτεί ότι υψηλότερη παραγωγή πολυσακχαριτών σημειώνεται με τη χρήση οργανικών συστατικών ως πηγές αζώτου στο μέσο ανάπτυξης (Fan et al. 2007). Η θετική επίδραση του YE στην παραγωγή διαιτητικών ινών πιθανόν να αποδίδεται στο υψηλό περιεχόμενό του σε υδατάνθρακες (4-12%), πρωτεΐνες, αμινοξέα και βιταμίνες.

Παρόλα αυτά, σχετικά με το περιεχόμενο σε γλουκάνες, όπως διαπιστώνεται από το ίδιο γράφημα, το υψηλότερο επίπεδο ολικών γλουκανών ανακτήθηκε με χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου το CSL (1.2 ± 0.01 g/L) σε σχέση με το YE (0.78 ± 0.09 g/L). Είναι σαφές ότι η χρήση του CSL στο μέσο ανάπτυξης οδήγησε σε 35% υψηλότερη παραγωγή γλουκανών σε σχέση με την αντίστοιχη παραγωγή που σημειώθηκε με το YE ως χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου στη διεργασία ανάπτυξης σε βυθισμένες καλλιέργειες. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί πάντως, ότι η παραγωγή των διατροφικά πολύτιμων β-γλουκανών στην περίπτωση του μέσου με το YE βρέθηκε σχεδόν 2 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη που σημειώθηκε για το CSL.

Σε όλες τις περιπτώσεις με τις διαφορετικές πηγές αζώτου που ελέχθηκαν, το μυκήλιο περιείχε υψηλότερες συγκεντρώσεις β- σε σχέση με α- γλουκανών. Παραταύτα, η χρήση του CSL στο μέσο ανάπτυξης φαίνεται να αλλάξει την παραπάνω σχέση γλουκανών, ευνοώντας την παραγωγή α-γλουκανών. Συνολικά το μυκήλιο του *G. australe* βρέθηκε να περιέχει 12.69% και 7.80% ολικές γλουκάνες (σε βάση % (w/w) του ξηρού βάρους) με χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου στη βιοδιεργασία το CSL ή το YE, αντίστοιχα.



Γράφημα 4.12 Μέγιστη παραγωγή διαιτητικών ινών (TDF) και ολικών γλουκανών (α-και β-γλουκανών) σε g/L σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας του *G. australe* ATHUM 4345, δοκιμάζοντας διαφορετικές πηγές αζώτου (ME: εκχύλισμα βύνης, SM: αλεσμένη σόγια, CSL: εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού και YE: εκχύλισμα ζύμης). Το μέσο ανάπτυξης περιείχε γλυκόζη (13.7 g/L), K_2HPO_4 (2.2 g/L) και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.4 g/L). Οι πηγές αζώτου προστέθηκαν σε συγκέντρωση 30 g/L εκτός από το CSL (62.5 g/L). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28 \pm 2$ °C. Η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών εκφράζεται σε ξηρή βάση.

Από τα παραπάνω όπως γίνεται φανερό, η γλυκόζη από τα δοκιμαζόμενα σάκχαρα θα μπορούσε να επιλεχθεί ως καταλληλότερη πηγή άνθρακα για την ταυτόχρονα υψηλή παραγωγή

διαιτητικών ινών και γλουκανών από το *G. australe* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες. Λαμβάνοντας δε υπόψη την υψηλή βιολογική σημασία των β-γλουκανών, η καταλληλότερη πηγή αζώτου φαίνεται να είναι το ΥΕ καθώς ενθάρρυνε την παραγωγή διαιτητικών ινών, ενώ συγχρόνως οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή των β-γλουκανών από το μελετώμενο στέλεχος.

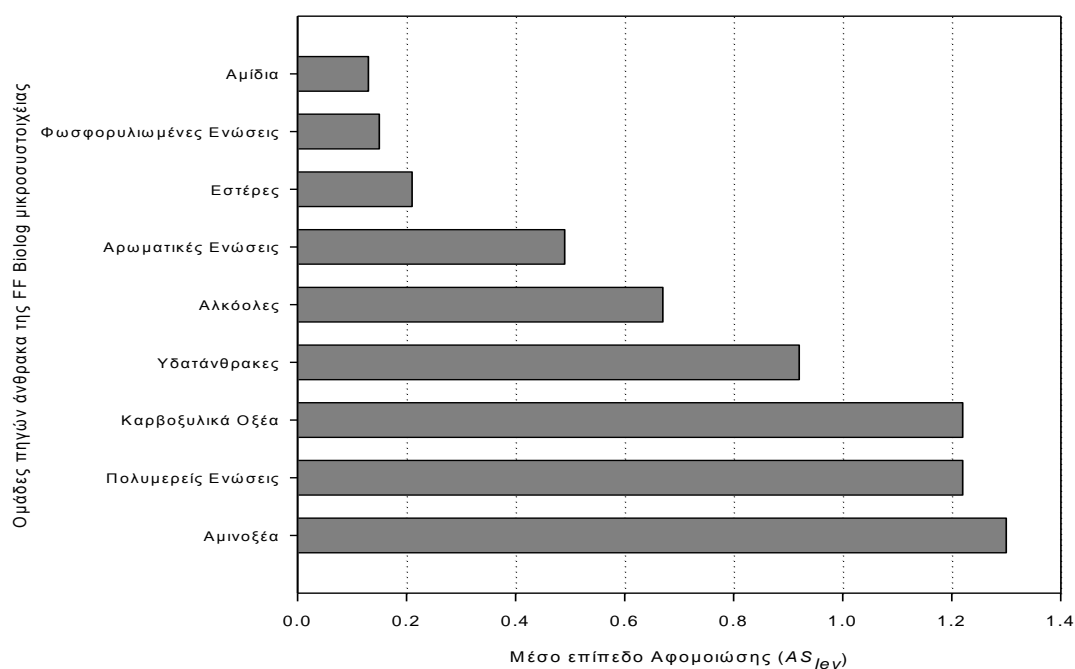
Αν συγκριθούν οι αποδόσεις των παραπάνω βιολογικά ενεργών πολυσακχαριτών που ανακτήθηκαν μεταξύ της βυθισμένης καλλιέργειας του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα (βλ. παρ. 4.8) και των φιαλών, δεδομένου ότι το μέσο ανάπτυξης έχει την ίδια σύσταση και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής των διαιτητικών ινών και των ολικών γλουκανών κατά περίπου 20% και για τα δύο συστατικά στον βιοαντιδραστήρα σε σχέση με την αντίστοιχη παραγωγή στις φιάλες (σύγκριση των αποδόσεων σε βάση % (w/w) του ξηρού μυκηλίου). Επομένως, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών ευνοήθηκε στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα όπου επικρατούν κατάλληλες συνθήκες αερισμού. Το οξυγόνο φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταβολική παραγωγή των πολυσακχαριτών. Μάλιστα, οι Lee et al. (2009) έχουν διατυπώσει πως η παραγωγή πολυσακχαριτών σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας από τον Ασκομύκητα *Cordyceps takaomontana* είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην παροχή αερισμού και μάλιστα υψηλός ρυθμός αερισμού (2 vvm) αποδείχτηκε ο καταλληλότερος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *P. ostreatus* ATHUM 4438

5.1 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με μικροσυστοιχεία FF Biolog

Με βάση την μεταβολική ανάλυση με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog για το *P. ostreatus* ATHUM 4438, υπολογίστηκε το μέσο επίπεδο αφομοίωσης (AS_{lev}) για κάθε χημική ομάδα πηγών άνθρακα που δοκιμάστηκε και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γραφ. 5.1. Όπως διαπιστώνεται για την ομάδα των αμινοξέων, των πολυμερών ενώσεων και το καρβοξυλικών οξέων το επίπεδο αφομοίωσής τους από τον μικροοργανισμό ήταν περίπου το ίδιο, ενώ οι υδατάνθρακες σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες υποστρωμάτων έδειξαν μεγαλύτερο επίπεδο αφομοίωσης.



Γράφημα 5.1 Μέσο επίπεδο αφομοίωσης (AS_{lev}) για κάθε χημική ομάδα πηγών άνθρακα που δοκιμάστηκε με την Biolog FF μικροσυστοιχεία για το *P. ostreatus* ATHUM 4438

Το προφίλ αφομοίωσης των 95 διαφορετικών πηγών άνθρακα για το *P. ostreatus* ATHUM 4438 φαίνεται στο Γραφ. 5.2, μετά από ανάλυση με την FF Biolog μικροσυστοιχεία. Οι πηγές άνθρακα που αφομοιώθηκαν καλύτερα από το συγκεκριμένο στέλεχος (τιμή κανονικοποιημένης μιτοχονδριακής ενεργότητας, $\bar{A} > 1.2$) είναι (18) υδατάνθρακες και συγκεκριμένα η D-σορβιτόλη ($\bar{A} = 2.02$), η μαλτόζη ($\bar{A} = 1.93$), ο β-μεθυλ-D-γλυκοζίτης ($\bar{A} = 1.77$), η

D-μελεζιτόζη ($\bar{A}=1.73$), η D-ραφινόζη ($\bar{A}=1.66$), η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη ($\bar{A}=1.65$), η D-γλυκόζη ($\bar{A}=1.60$), η τουρανόζη ($\bar{A}=1.58$), η σουκρόζη ($\bar{A}=1.55$), η γεντιοβιόζη ($\bar{A}=1.53$), η D-τρεχαλόζη ($\bar{A}=1.51$), η αδονιτόλη ($\bar{A}=1.49$), η σαλίσίνη ($\bar{A}=1.48$), η D-φρουκτόζη ($\bar{A}=1.44$), η D-μαννόζη ($\bar{A}=1.40$), η D-μαννιτόλη ($\bar{A}=1.41$), η D-ξυλόζη ($\bar{A}=1.22$) και η σταχυόζη ($\bar{A}=1.21$). Καρβοξυλικά οξέα (14) με υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα αποδείχτηκαν το σουσιναμικό ($\bar{A}=2.15$), το α -κετο γλουταρικό ($\bar{A}=2.04$), το γ -υδροξυ βουτυρικό ($\bar{A}=1.92$), το β -υδροξυ βουτυρικό ($\bar{A}=1.64$), το L-μηλικό ($\bar{A}=1.58$), το φουμαρικό ($\bar{A}=1.57$), το 2-κετο-D-γλουκονικό ($\bar{A}=1.57$), το D-γλουκορονικό ($\bar{A}=1.57$), το D-μηλικό ($\bar{A}=1.48$), το κινικό ($\bar{A}=1.43$), το D-σακχαρικό ($\bar{A}=1.41$), το ηλεκτρικό ($\bar{A}=1.36$), το γ -αμινο βουτυρικό ($\bar{A}=1.31$) και το γαλακτικό οξύ ($\bar{A}=1.23$). Από την ομάδα των αμινοξέων σημειώθηκε υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα για δέκα μέλη της και συγκεκριμένα για την L-ορνιθίνη ($\bar{A}=1.98$), την L-προλίνη ($\bar{A}=1.67$), την L-σερίνη ($\bar{A}=1.54$), το L-πυρογλουταμινικό οξύ ($\bar{A}=1.53$), την L-αλανίνη ($\bar{A}=1.52$), το L-γλουταμινικό οξύ ($\bar{A}=1.51$), την L-θρεονίνη ($\bar{A}=1.42$), το N-ακετυλ-L-γλουταμινικό οξύ ($\bar{A}=1.41$), το L-ασπαρτικό οξύ ($\bar{A}=1.30$) και την L-φαινυλανίνη ($\bar{A}=1.20$). Τέλος, για δύο πολυμερείς ενώσεις τη δεξτρίνη ($\bar{A}=2.38$) και το γλυκογόνο ($\bar{A}=1.73$), παρατηρήθηκε υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα από το μελετώμενο στέλεχος Βασιδιομύκητα.

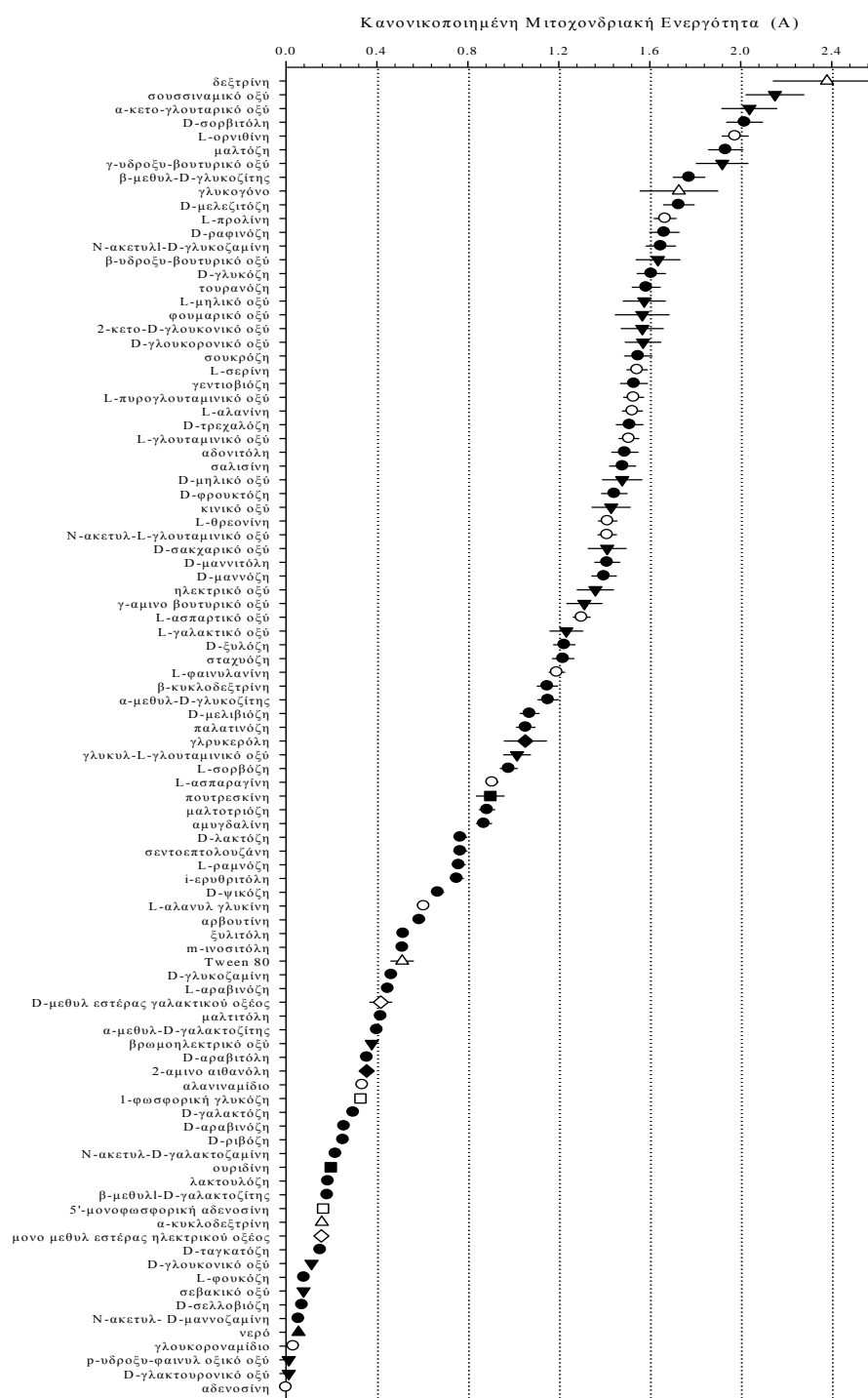
Όπως διαπιστώνεται από τις τιμές μιτοχονδριακής ενεργότητας ύστερα από την μεταβολική ανάλυση με τη χρήση της FF Biolog μικροσυστοιχείας, η υψηλή αφομοίωση των ενδιάμεσων μορίων του ΚΚΟ από το *P. ostreatus* αλλά και των μεταβολικών παραγώγων τους, όπως για παράδειγμα του α -κετο γλουταρικού, του μηλικού, του φουμαρικού του ηλεκτρικού, του γλουταμινικού οξέος, της ορνιθίνης, της προλίνης, της θρεονίνης, του ασπαρτικού και του γ -αμινο βουτυρικού οξέος, αποδεικνύουν την υψηλή μεταβολική ενεργότητα του ΚΚΟ κατά τη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη από τους Chakraborty et al. (2003), στην οποία αναφέρεται ότι οι μεταβολικοί κύκλοι της γλυκόλυσης και του ΚΚΟ αποτελούν τις σημαντικότερες οδούς καταβολισμού των υδατανθράκων κατά τη φάση ανάπτυξης των καρποσωμάτων του *P. ostreatus*.

Τα ένζυμα του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών (PPP) έχουν χαμηλότερες ειδικές ενεργότητες σε σχέση με τα ένζυμα των μονοπατιών της γλυκόλυσης και του ΚΚΟ. Επιπλέον, η υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα ($\bar{A}=1.31$) που σημειώθηκε για το γ -αμινο βουτυρικό οξύ (GABA) υποδηλώνει την δυνατότητα για μια λειτουργική GABA παράκαμψη. Το GABA αποτελεί έναν ενδιάμεσο που εμπλέκεται στην παράκαμψη συγκεκριμένων καθοριστικών βημάτων του κύκλου του ΚΚΟ (Balazs et al. 1970). Σε αυτήν την παρέκκλιση του

κύκλου του ΚΚΟ, το 2-κετογλουταρικό οξύ αμινοποιείται αναγωγικά προς σχηματισμό του γλουταμινικού αντί να αποκαρβοξυλιωθεί οξειδωτικά προς ηλεκτρικό οξύ. Αυτό συμβαίνει λόγω μερικού μπλοκαρίσματος του κύκλου του ΚΚΟ στο σύμπλοκο της αφυδρογονάσης του 2-κετογλουταρικού που είναι πολύ ευαίσθητο στην παρεμπόδιση από την υψηλή αναλογία NADH/NAD⁺ (Salminen & Streeter 1990). Όταν συμβαίνει μία τέτοια οξειδοαναγωγική παρεμπόδιση σε αναερόβιες συνθήκες, τότε βιοσυντίθεται το γλουταμινικό οξύ. Το γλουταμινικό οξύ που παράγεται έτσι αποκαρβοξυλιώνεται σε GABA από τη αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η τρανσαμίνωση του GABA σε ημιαλδεΐδη του ηλεκτρικού από την τρανσαμίνωση του 4-αμινοβουτυρικού και τελικά η ημιαλδεΐδη του ηλεκτρικού οξειδώνεται σε ηλεκτρικό από την NAD(P)H εξαρτώμενη αφυδρογονάση της ημιαλδεΐδης του ηλεκτρικού. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν η ημιαλδεΐδη του ηλεκτρικού οξέος να αναχθεί σε 4-υδροξυβουτυρικό οξύ από την NAD(P)H εξαρτώμενη αναγωγή της ημιαλδεΐδης του ηλεκτρικού. Αυτά τα μονοπάτια θεωρούνται πολύ σημαντικά ως δεξαμενές για το πλεονάζον NAD(P)H, που συμβαίνει όταν ο κύκλος ΚΚΟ παρεμποδίζεται (Salminen & Streeter, 1990).

Είναι ενδιαφέρον ακόμα να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του *P. ostreatus* έδειξε φτωχή ανάπτυξη στα υποστρώματα της γαλακτόζης ($\bar{A}=0.29$) και των β-γαλακτοζιτών, για παράδειγμα στη λακτόζη ($\bar{A}=0.76$), σε σχέση με τους α-γαλακτοζίτες, όπως στη μελιβιόζη και σταχυόζη. Επίσης, παρατηρήθηκε αδυναμία του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί στην σελλοβιόζη ($\bar{A}=0.07$). Η ανάπτυξη του Βασιδιομύκητα στη ξυλόζη και ξυλιτόλη φανερώνει ότι ο μικροοργανισμός μεταβολίζει τη ξυλόζη μέσω της αναγωγής της σε ξυλιτόλη από την αναγωγή της ξυλόζης, οξείδωση αυτής σε ξυλιτόλη, μετατροπής της σε ξυλουλόζη και είσοδο αυτής στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών (Panagiotou 2002).

Όπως φαίνεται από το προφίλ αφομοίωσης των διαφορετικών υποστρωμάτων για το *P. ostreatus*, για τα αλκοολικά σάκχαρα (πολυόλες), όπως για παράδειγμα η *i*-ερυθριτόλη ($\bar{A}=0.75$), η ξυλιτόλη ($\bar{A}=0.52$), η *m*-ινοσιτόλη ($\bar{A}=0.51$), η μαλτιτόλη ($\bar{A}=0.41$) και η D-αραβιτόλη ($\bar{A}=0.35$), η μιτοχονδριακή ενεργότητα ήταν χαμηλή. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην πολύπλοκη δομή τους, μιας και υδρολυτικά ένζυμα απαιτούνται για την μετατροπή τους σε απλά σάκχαρα, πριν εισέλθουν στα αναπνευστικά μονοπάτια προκειμένου να αφομοιωθούν (Leifa et al. 2007) από το μικροοργανισμό. Εξάριση φαίνεται να αποτελεί η D-σορβιτόλη καθώς και η D-μαννιτόλη για τα οποία η μιτοχονδριακή ενεργότητα βρέθηκε υψηλή.



Γράφημα 5.2 Προφίλ αφομοίωσης υποστρωμάτων με μικροσυστοιχεία FF Biolog για το *P. ostreatus* ATHUM 4438 στο οποίο δίνεται ο μέσος των τριπλών αναλύσεων για την (\bar{A}) του δοκιμαζόμενου υποστρώματος καθενός κελιού της μικροσυστοιχείας. Σύμβολα: (●) υδατάνθρακες, (▼) καρβοξυλικά οξέα, (○) αμινοξέα, (△) πολυμερείς ενώσεις, (◆) αλκοόλες, (■) αρωματικές ενώσεις, (□) εστέρες, (◇) φωσφορυλιωμένες ενώσεις και (▲) νερό

Ειδικά για τη μαννιτόλη, οι Guha & Banerjee (1971), οι Chandra & Purkayastha (1977) καθώς και οι Fasidi & Akwakawa (1996) έχουν αναφέρει ότι αποτελεί το πλέον κατάλληλο αλκοολικό σάκχαρο για την ανάπτυξη των Βασιδιομυκήτων. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο σχηματισμό φρουκτόζης μέσω οξειδωσης της και την επακόλουθη ενσωμάτωσή της στο αναπνευστικό μονοπάτι μετά την φωσφορυλίωση (Mahier & Cordes 1971). Εξάλλου η παρουσία του κύκλου της μαννιτόλης στο μεταβολισμό του *P. ostreatus* έχει αναφερθεί από τους Chakraborty et al. (2004). Επιπλέον, η δεξτρίνη αποδείχτηκε κατάλληλη για το *P. ostreatus* αφού η μιτοχονδριακή ενεργότητα βρέθηκε υψηλή, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με μελέτες από τους Jonathan & Fasidi (2001). Η προτίμηση της δεξτρίνης αλλά και της σορβιτόλης και μαννιτόλης από είδος του γένους *Pleurotus* (*P. florida*) έχει αναφερθεί και από τους Gbolagade et al. (2006b).

Στον Πιν. 5.1 δίνονται οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) εκφρασμένου σε h^{-1} για όλα τα υποστρώματα της ομάδας των υδατανθράκων που δοκιμάστηκαν με την FF Biolog μικροσυστοιχεία για το μελετώμενο στέλεχος του *P. ostreatus*.

Σάκχαρα εμπορικά διαθέσιμα και με μικρό κόστος επιλέχτηκαν για περεταίρω μελέτη και αξιολόγησή τους σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. ostreatus* ATHUM 4438. Συγκεκριμένα επιλέχτηκαν τα σάκχαρα μαλτόζη, D-ραφινόζη, D-γλυκόζη, σουκρόζη, D-τρεχαλόζη, D-φρουκτόζη, D-μαννόζη και D-ξυλόζη με τιμές (\bar{A}) 1.93, 1.66, 1.60, 1.55, 1.51, 1.44, 1.40 και 1.22, αντίστοιχα.

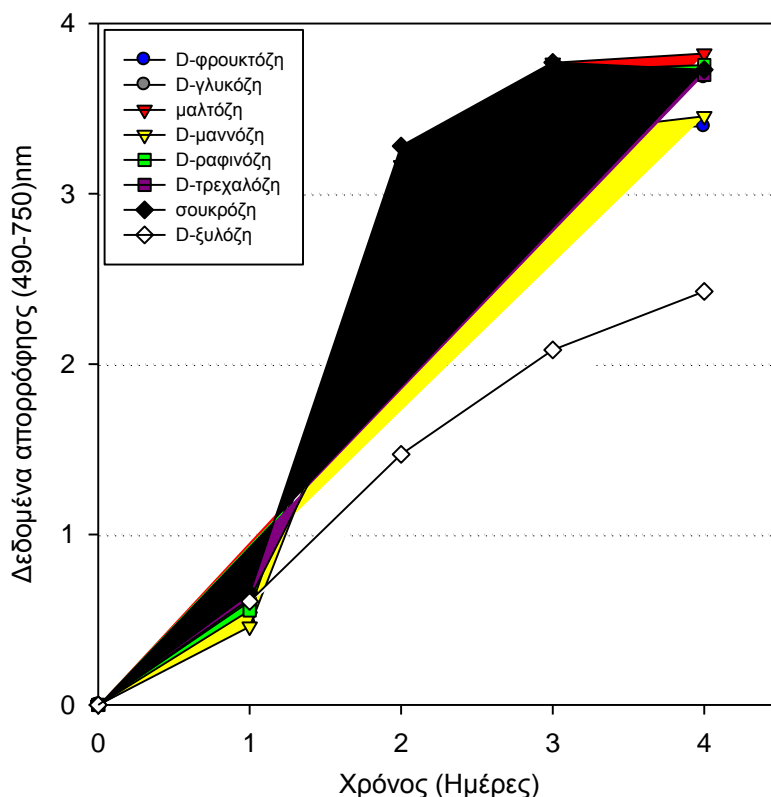
Η τιμή μ_{max} που προσδιορίστηκε ήταν για τη μαλτόζη ($0.057 h^{-1}$), την D-ραφινόζη ($0.056 h^{-1}$), την D-γλυκόζη ($0.052 h^{-1}$), τη σουκρόζη ($0.057 h^{-1}$), την D-τρεχαλόζη ($0.048 h^{-1}$), τη D-φρουκτόζη ($0.035 h^{-1}$), την D-μαννόζη ($0.050 h^{-1}$) και την D-ξυλόζη ($0.029 h^{-1}$). Για τα σάκχαρα που επιλέχτηκαν για περεταίρω μελέτη παρουσιάζονται οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης στο Γράφ. 5.3.

Η επιλογή των υδατανθράκων για περεταίρω μελέτη βασίζεται αφενός μεν στο υψηλό επίπεδο αφομοίωσης που παρατηρήθηκε από την ανάλυση τους σε σχέση και με τις άλλες δοκιμαζόμενες ομάδες υποστρωμάτων, και αφετέρου στο γεγονός ότι αποτελούν τις πιο διαδεδομένες και χρησιμοποιούμενες πηγές άνθρακα στις διεργασίες ζύμωσης του γένους *Pleurotus* (Confortin et al. 2008, Gern et al. 2008, Gbolagade et al. 2006b, Rosado et al. 2003, Wu et al. 2003).

Πίνακας 5.1 Τιμές μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) εκφρασμένου σε h^{-1} για τα υποστρώματα της ομάδας των υδατανθράκων που δοκιμάστηκαν με την FF Biolog μικροσυστοιχεία για το *P. ostreatus*

Υδατάνθρακες	Μέγιστος Ειδικός Ρυθμός Ανάπτυξης (μ_{\max}) ^a (h^{-1})
L-αραβινόζη	0.019
D-αραβινόζη	0.015
D-σελλοβιόζη	0.005
D-φρουκτόζη	0.052
L-φουκόζη	0.015
D-γαλακτόζη	0.027
γεντιοβιόζη	0.050
D-γλυκόζη	0.052
D-λακτόζη	0.030
λακτουλόζη	0.021
μαλτόζη	0.057
μαλτοτριόζη	0.039
D-μαννόζη	0.050
D-μελιβιόζη	0.037
D-μελεζιτόζη	0.056
παλατινόζη	0.045
D-ψικόζη	0.034
D-ραφινόζη	0.056
D-ριβόζη	0.009
L-ραμνόζη	0.044
D-ταγκατόζη	0.021
D-τρεχαλόζη	0.048
τουρανόζη	0.039
σταχυόζη	0.041
L-σορβόζη	0.042
σουκρόζη	0.057
D-ξυλόζη	0.029
αδονιτόλη	0.047
D-αραβιτόλη	0.035
i-ερυθριτόλη	0.038
m-ινοσιτόλη	0.036
μαλιτιτόλη	0.025
D-μαννιτόλη	0.039
D-σορβιτόλη	0.053
ξυλιτόλη	0.028
α -μεθύλ-D-γλυκοζίτης	0.044
β -μεθύλ-D-γλυκοζίτης	0.054
α -μεθύλ-D-γαλακτοζίτης	0.023
β -μεθύλ-D-γαλακτοζίτης	0.021
D-γλυκοζαμίνη	0.038
N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη	0.048
N-ακετυλι-D-γαλακτοζαμίνη	0.023
N-ακετυλ-D-μαννοζαμίνη	0.012
αρβουτίνη	0.037
σαλικίνη	0.047
αμυγδαλίνη	0.033
σεντοεπτοουλοζάνη	0.033

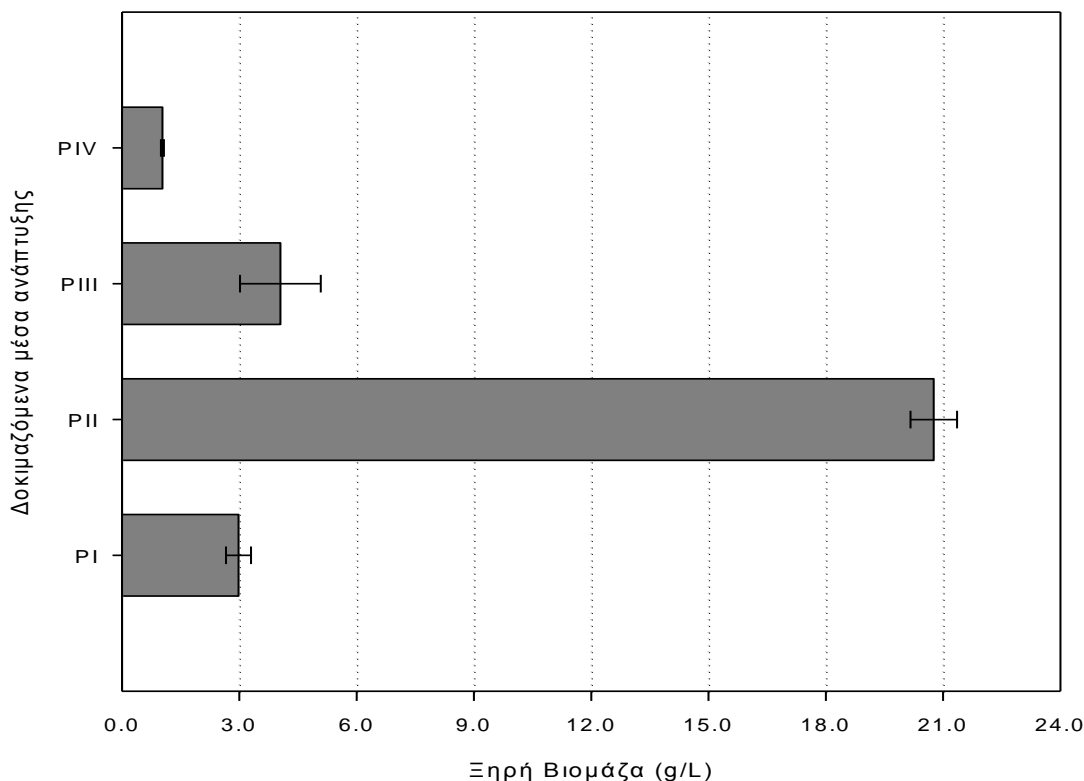
^a Ο υπολογισμός της τιμής μ_{\max} βασίστηκε στη διαφορά των αναγνώσεων (490-750) nm



Γράφημα 5.3 Καμπύλες ανάπτυξης για τα σάκχαρα D-γλυκόζη, D-ξυλόζη, μαλτόζη, D-φρουκτόζη, σουκρόζη, D-τρεχαλόζη, D-ραφινόζη και D-μαννόζη όπως προσδιόριστηκαν με βάση τα δεδομένα από την ανάλυση σε FF Biolog μικροσυστοιχεία [διαφορά των αναγνώσεων (490-750) nm] για το *P. ostreatus*

5.2 Αξιολόγηση μέσων ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες

Στο Γραφ. 5.4 παρουσιάζεται η μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 για τα 4 μέσα ανάπτυξης διαφορετικής σύστασης (P_I , P_{II} , P_{III} και P_{IV}) που ελήφθησαν από τη διεθνή βιβλιογραφία με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου για περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση. Όπως διαπιστώνεται, το μέσο P_{II} , έδωσε σημαντικά την υψηλότερη παραγωγή ξηρής βιομάζας (20.76 ± 0.60 g/L) σε σχέση με τα άλλα δοκιμαζόμενα μέσα.



Γράφημα 5.4 Αξιολόγηση 4 διαφορετικών μέσων ανάπτυξης P_I , P_{II} , P_{III} και P_{IV} για παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε περιστρεφόμενο επωαστήρα σε διπλές φιάλες, σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^\circ\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε μέσο.

Για συγκριτικούς σκοπούς, να αναφερθεί ότι οι Rosado et al. (2003) σημείωσαν τιμές μέγιστης παραγωγής ξηρής βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες με μέσο ανάπτυξης το P_{II} 22.8 g/L για το *P. ostreatus* "florida", και 16.8 g/L για το *P. ostreatoroseus*, παραπλήσιες με την αντίστοιχη τιμή βιομάζας που ανακτήθηκε από μελετώμενο στέλεχος *Pleurotus* στο ίδιο μέσο. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Gbolagade et al. (2006b), η μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *P. florida* με χρήση του μέσου P_{IV} βρέθηκε 3.3g/L, σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη τιμή που ανακτήθηκε από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 στο ίδιο μέσο στην παρούσα μελέτη.

Έτσι, βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, το μέσο ανάπτυξης που επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη για το *P. ostreatus* ATHUM 4438 είναι το P_{II} (60 g/L γλυκόζη, 1 g/L πεπτόνη, 2 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L K_2HPO_4 και 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) που οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τα άλλα μέσα που δοκιμάστηκαν.

5.3 Επίδραση πηγών άνθρακα στην παραγωγή βιομάζας

Οι 8 διαφορετικές πηγές άνθρακα που επιλέχθηκαν ύστερα από την ανάλυση με την FF Βιολογ μικροσυστοιχεία, αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* σε μικρής κλίμακας υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες. Οι μέγιστες τιμές παραγόμενης ξηρής βιομάζας σημειώθηκαν κατά σειρά για τη ξυλόζη (23.7 ± 0.5 g/L), τη γλυκόζη (21.1 ± 0.5 g/L) και την τρεχαλόζη (20.5 ± 0.8 g/L), όπως διαπιστώνεται και από το Γράφ. 5.5.

Σε όλες τις προηγούμενες σχετικές μελέτες αναφορικά με τις διεργασίες ζύμωσης για το *Pleurotus* sp. (Confortin et al. 2008, Elisashvilli et al. 2009, Gbolagade et al. 2006b, Gern 2008), η γλυκόζη έχει χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης. Στην παρούσα μελέτη όμως, φαίνεται η ξυλόζη να είναι η καταλληλότερη από άποψης μυκηλιακής ανάπτυξης, αν και η χρήση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα οδήγησε σε παραπλήσια υψηλή απόδοση. Εν τούτοις, και για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων (π.χ. *Cryptococcus flavus*), έχει αναφερθεί ότι μεταβολίζουν τη ξυλόζη (Mayr et al. 2003). Για λόγους σύγκρισης, οι Wu et al. (2003) σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. tuber-regium*, κρίναν τη φρουκτόζη καταλληλότερη σε σχέση με τη γλυκόζη από πλευράς παραγωγής μυκηλιακής βιομάζας, οι Jia et al. (2007), σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. nebrodensis* ανέφεραν τη μαλτόζη καταλληλότερη πηγή άνθρακα για μυκηλιακή ανάπτυξη, ενώ οι Wu et al. (2008) ανέκτησαν υψηλότερη παραγωγή βιομάζας με τη φρουκτόζη σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. citrinopileatus*.

Με τη ξυλόζη ως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα, το σημείο εισόδου (έναρξης) του μεταβολισμού είναι το μονοπάτι φωσφωρικών πεντοζών που συναντάται ουσιαστικά σε όλους τους κυτταρικούς οργανισμούς, το οποίο παρέχει την D-ριβόζη για τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, την 4-φωσφορική D-ερυθρόζη για τη σύνθεση των αρωματικών αμινοξέων και το NADPH για τις αναβολικές αντιδράσεις. Είναι γνωστό ότι το μονοπάτι φωσφωρικών πεντοζών περιλαμβάνει δύο φάσεις: την οξειδωτική κατά την οποία μετατρέπεται η εξόζη, D-γλυκόζη 6P σε πεντόζη D-ριβουλόζη 5P, μαζί με την παραγωγή CO₂ και NADPH, και την μη οξειδωτική φάση κατά την οποία μετατρέπεται η D-ριβουλόζη 5P σε D-ριβόζη 5P, D-ξυλουλόζη 5P, D-σεντοεπτουλόζη 7P, D-ερυθρόζη 4P, D-φρουκτόζη 6P και D-γλυκεραλδεΐδη 3P. Η D-ξυλόζη εισέρχεται μονοπάτι φωσφωρικών πεντοζών διαμέσω της D-ξυλουλόζης. Στους μύκητες και στους άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, αυτό απορρέει μέσω μιας αναγωγής και οξειδωσης σε δύο βήματα, στις οποίες μεσολαβούν η αναγωγή της ξυλόζης (*XYL1*, *Xyl1p*) και η αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (*XYL2*, *Xyl2p*), αντίστοιχα. Το μονοπάτι των φωσφωρικών

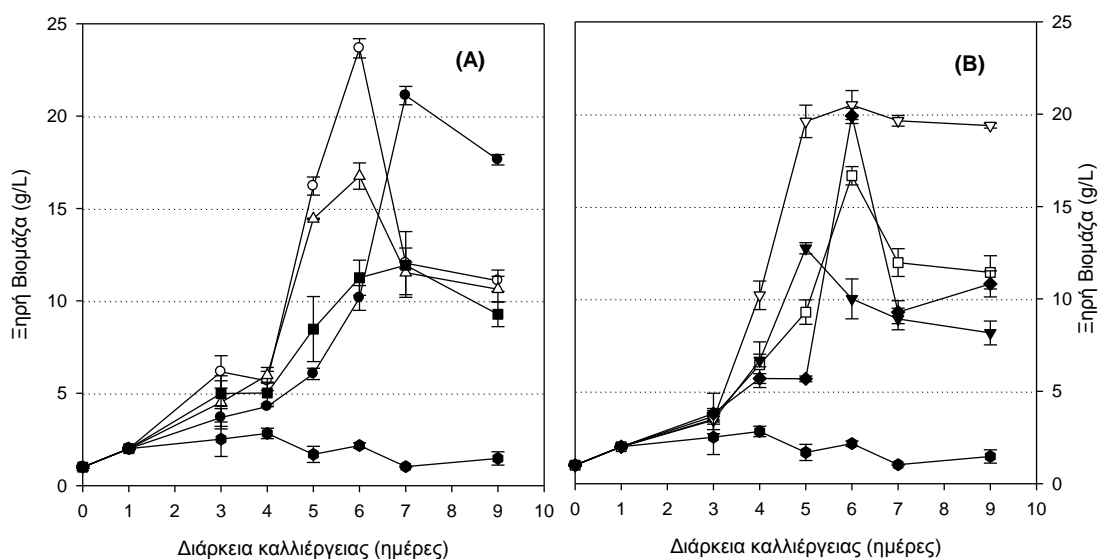
πεντοζών αποτελεί τον κυριότερο τρόπο παραγωγής του οξειδοαναγωγικού συμπαραγόνα NADPH και απαιτείται μια αντιστροφή της ροής από 6-φωσφορική φρουκτόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη και είσοδο στο μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών. Επιπλέον, η μετατροπή της ξυλόζης σε ξυλιτόλη απαιτεί την κατανάλωση ενός μορίου NADPH και έτσι αυξάνει την απαίτηση για αυτόν τον συμπαραγόνα. Οι πολυόλες ίσως διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο για την ισορροπία του κυτταρικού δυναμικού οξειδωαναγωγής, καθώς στη σύνθεση και στο καταβολισμό των πολυολών γενικώς εμπλέκονται οι συμπαραγοντες NADH και NADPH. Ειδικά για την περίπτωση της μαννιτόλης, τα παρόντα ένζυμα μπορούν να επιτρέψουν την αλληλομετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε μαννιτόλη (Diano et al. 2006, Hult & Gatenbeck 1978). Αυτή η αλληλομετατροπή, γνωστή ως κύκλος της μαννιτόλης είναι δυνατό να οδηγήσει στην παραγωγή NADPH με τη χρήση NADH και ATP. Ο αποτελεσματικός μεταβολισμός της μαννιτόλης από το *P. ostreatus*, όπως φάνηκε και από την ανάλυση με την FF Biolog μικροσυστοιχεία (Γράφ. 5.2) κατά την οποία η τιμή της μιτοχονδριακής ενεργότητας βρέθηκε υψηλή ($\bar{A}=1.41$) έρχεται λοιπόν σε συμφωνία με την παρουσία του κύκλου της μαννιτόλης στον μικροοργανισμό όπως προέκυψε με βάση τα παρόντα αποτελέσματα, και όπως έχει αναφερθεί και από τους Chakraborty et al. (2004) για το *P. ostreatus*. Πιθανόν σε αυτό το γεγονός να βασίζεται το υψηλό επίπεδο μεταβολισμού της ξυλόζης που σημειώθηκε για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό αφού οδηγεί σε μία αυξημένη παραγωγή του απαραίτητου για την βιομετατροπή NADPH.

Επιπροσθέτως, με τη ξυλόζη ως υπόστρωμα ανάπτυξης του *P. ostreatus*, απαιτείται έντονη αναπνευστική δραστηριότητα για να οξειδωθεί ξανά το NADH που έχει παραχθεί μέσω της αφυδρογονάσης της ξυλιτόλης (XDH) κατά την οξείδωση της ξυλιτόλης σε ξυλουλόζη. Έτσι, εξαιτίας του υψηλού επιπέδου ενεργητικότητας της αναπνοής, περισσότερη μυκηλιακή βιομάζα είναι δυνατό να παραχθεί από την ίδια αρχική συγκέντρωση σακχάρου σε σχέση με την αντίστοιχη από τη γλυκόζη, γεγονός που επαληθεύεται και στο Γραφ. 5.5. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τον μύκητα *Rhizopus oryzae* αναπτυσσόμενο σε γλυκόζη και ξυλόζη (Maas et al. 2008).

Η αποδοτική χρησιμοποίηση της γλυκόζης από το *P. ostreatus*, ως δεύτερη κατά σειρά καλύτερη πηγή άνθρακα πιθανό να σχετίζεται με την ευκολία με την οποία το σάκχαρο αυτό μεταβολίζεται για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας. Μάλιστα τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αντιπροσωπεύουν την πολυτιμότερη πηγή γλυκόζης και ξυλόζης με πολλές δυνατές εφαρμογές στη χημική παραγωγή (Nobre et al. 2002). Παρόλο που θα αναμενόταν με τη γλυκόζη ως

χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης, η παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας να έφτανε στη μέγιστη τιμή χρονικά νωρίτερα από ότι τα μέσα με δισακχαρίτες, στην παρούσα μελέτη φαίνεται οι δισακχαρίτες και συγκεκριμένα η μαλτόζη και η τρεχαλόζη να αφομοιώνονται νωρίτερα και με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τη γλυκόζη κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Γραφ.18). Παρόμοια παρατήρηση έχει αναφερθεί και για το μύκητα *Rhizoctonia solani* αναπτυσσόμενο σε μαλτόζη και σουκρόζη (Israel & Shah Ali 1964). Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να οφείλεται σε ένα εξειδικευμένο προφίλ κατανάλωσης των δισακχαριτών από το στέλεχος του *P. ostreatus*, μιας και η αποδοτική αφομοίωση των δισακχαριτών φαίνεται να σχετίζεται με τη χρήση κατάλληλων μεταφορέων των σακχάρων μέσα στο μεταβολικό μηχανισμό του μικροοργανισμού. Η εγκυρότητα αυτής της υποθέσης βασίζεται σε παρόμοια παρατήρηση που έχει αναφερθεί πρόσφατα για το μύκητα *Aspergillus oryzae*, ο οποίος χρησιμοποιεί περμεάσες μαλτόζης (*MALT*) για τη μεταφορά της εξωκυτταρικής μαλτόζης μέσα στο κύτταρο και μαλτάση (*MALS*) για την υδρόλυση της εσωκυτταρικής μαλτόζης σε γλυκόζη η οποία στη συνέχεια διοχετεύεται μέσω της γλυκόλυσης (Vongsangnak et al.,2009).

Όπως παρατηρείται και από το Γραφ. 5.5, η μυκηλιακή βιομάζα του *P. ostreatus* μειώνεται απότομα μετά τη μέγιστη τιμή της κατά την τελική φάση. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στην περίπτωση της ξυλόζης ή της μαλτόζης σε σχέση με της γλυκόζης. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο φαινόμενο της αυτόλυσης του μυκηλίου. Η αυτόλυση αναφέρεται ως ενζυμική αυτο-αποδόμηση των κυττάρων και των κυτταρικών τοιχωμάτων η οποία περιλαμβάνει την δραστηριότητα ενός μεγάλου πεδίου ενζύμων, που φέρουν ως αποτέλεσμα τον καταβολισμό των μακρομορίων μέσα στο κύτταρο. Πολλές αναφορές προτείνουν ένα είδος συσχέτισης μεταξύ της παραγωγής υδρολασών και του φαινομένου της αυτόλυσης στους νηματοειδείς μύκητες (Shin et al. 2009, White et al. 2002). Εκτός από την θεμελιώδη σημασία της αυτόλυσης στη διαφοροποίηση, στο δευτερογενή μεταβολισμό και στην παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών, παραμένει ένα ανεπαρκές αντιλαμβανόμενο φαινόμενο της βιολογίας των μικροοργανισμών (Pócsi et al. 2006, White et al. 2002). Μάλιστα, οι Wu et al. (2003) ανέφεραν την παρουσία του φαινομένου της αυτόλυσης σε σχετική μελέτη του *P. tuber-regium* σε υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες και μάλιστα, η ένταση του φαινομένου ήταν περιορισμένη για τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, γεγονός που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη.



Γράφημα 5.5 Ανάπτυξη του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες με το βασικό μέσο ανάπτυξης και ως πηγές άνθρακα **(A)** μονοσακχαρίτες και **(B)** ολιγοσακχαρίτες: (●) χωρίς πηγή άνθρακα, (●) γλυκόζη, (○) ξυλόζη, (△) μαννόζη, (■) φρουκτόζη, (□) σουκρόζη, (▼) ραφινόζη, (▽) τρεχαλόζη και (◆) μαλτόζη. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 60 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^{\circ}\text{C}$

Για την περίπτωση της ξυλόζης αξίζει να αναφερθεί, ότι ενώ έδωσε την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας (23.67 g/L) την πέμπτη ημέρα της κύριας καλλιέργειας, μετά την πάροδο άλλων δύο ημερών η παραγωγή μειώθηκε περίπου στο μισό (12.04 g/L) λόγω του φαινομένου της αυτόλυσης. Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η παραγωγή βιομάζας δεν επηρεάζεται μόνο από την χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα, αλλά μεταβάλλεται κιάλας με τη διάρκεια της καλλιέργειας. Άρα είναι φανερό ότι η επιλογή κατάλληλης περιόδου συλλογής της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής (Wu et al. 2003). Επομένως, στη συγκεκριμένη περίπτωση, η συλλογή της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη στο μέσο ανάπτυξης, δεν πρέπει να ξεπεράσει την έκτη μέρα για την αποφυγή της λύσης των κυττάρων.

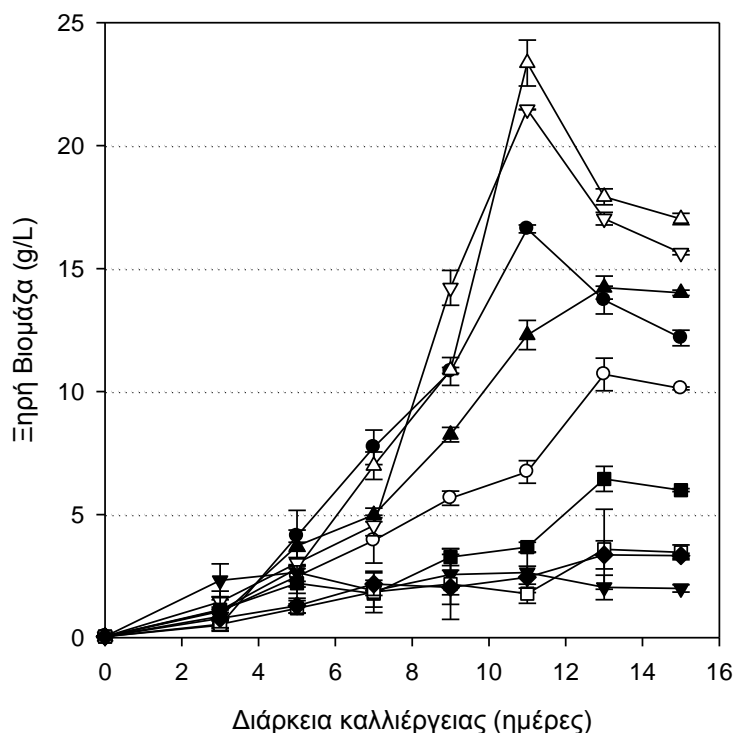
Οι Emri et al. (2006) ανέφεραν ότι η γλυκόζη από μόνη της ή οι διαδικασίες που στενά συνδέονται με τον πρώιμο μεταβολισμό της (π.χ. μεταφορά, φωσφορυλίωση) παρεμπόδισαν την αυτόλυση και την παραγωγή εξωκυτταρικής υδρολάσης σε βυθισμένες καλλιέργειες του *Emericella nidulans* (αναμ. *Aspergillus nidulans*). Η αναφορά αυτή ίσως να δικαιολογεί τη μειωμένη ένταση του φαινομένου της αυτόλυσης για τη γλυκόζη στην παρούσα μελέτη. Επίσης,

να σημειωθεί ότι η ένταση του φαινομένου της αυτόλυσης ήταν μειωμένη για την περίπτωση του μέσου με την τρεχαλόζη ως πηγή άνθρακα. Μάλιστα, οι François & Parrou (2001) αναφέρουν ότι η υψηλή συγκέντρωση τρεχαλόζης στο μέσο ανάπτυξης προστατεύει τα μικροβιακά κύτταρα από την αυτόλυση.

5.4 Επίδραση πηγών αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

Μετά από τον έλεγχο διαφορετικών πηγών αζώτου σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. ostreatus* ATHUM 4438 με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας, διαπιστώθηκε ότι οι σύνθετες οργανικές πηγές συνέβαλλαν σε υψηλότερη παραγωγή βιομάζας (Γράφ. 5.6). Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν ότι οι Βασιδιομύκητες προτιμούν τις σύνθετες οργανικές πηγές αζώτου, από τη στιγμή που συγκεκριμένα απαραίτητα για αυτά αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από τις ανόργανες πηγές αζώτου σε βυθισμένες καλλιέργειες (Elisashvili et al. 2009, Fan et al. 2007, Mikiashvili et al. 2006, Wu et al. 2008, Xu et al. 2008). Επιπροσθέτως, πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει οργανικές πηγές αζώτου για την παραγωγή βιοενεργών συστατικών από τα είδη του γένους *Pleurotus* (Alarcón & Águila 2006, Gern et al. 2008, Rosado et al. 2003).

Ανάμεσα στις σύνθετες οργανικές πηγές αζώτου που δοκιμάστηκαν, η χρήση CSL ή SM στο μέσο ανάπτυξης οδήγησαν σε σημαντικά υψηλή παραγωγή βιομάζας, και συγκεκριμένα 23.4 ± 0.9 g/L και 21.5 ± 0.01 g/L, αντίστοιχα. Και οι δύο παραπάνω πηγές είναι πλούσιες σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα, όπως προλίνη, σερίνη, αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, θρεονίνη, ασπαρτικό οξύ, φαινυλανίνη και ασπαραγίνη (Amartey & Jeffries 1994, Foda et al. 1973, Eggum et al. 1985), και αφομοιώθηκαν εξάλλου ικανοποιητικά από το *P. ostreatus* όπως αποδείχτηκε κιάλας από την FF Biolog ανάλυση (Γραφ. 5.2). Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη αξιολόγησης των πηγών αζώτου, φαίνεται να μην ενίσχυσαν την μυκηλιακή ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Βέβαια, η προτίμηση της τρυπτοφάνης από το *P. ostreatus* σε σχέση με τα άλλα δοκιμαζόμενα αμινοξέα πιθανόν να αποδίδεται στην ευκολία με την οποία αυτή μεταφέρεται επί της κυτταρικής μεμβράνης, παρατήρηση που έχει αναφερθεί και από τους Gbolagade et al. (2006b) για το *P. florida*.



Γράφημα 5.6 Ανάπτυξη του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες με το βασικό μέσο και διαφορετικές πηγές αζώτου: (●) εκχύλισμα ζύμης, (○) πεπτόνη, (▲) υδρολυμένη καζεΐνη, (△) εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, (▼) εκχύλισμα βύνης, (▽) αλεσμένη σόγια, (■) τρυπτοφάνη, (□) ασπαραγίνη και (◆) γλυκίνη. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση των αζωτούχων πηγών ήταν 10 g/L, εκτός από το CSL (30 g/L). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^\circ\text{C}$

Οι Fasidi & Olorunmaiye (1994), σε σχετική μελέτη με το *P. tuberregium* κατέληξαν ότι οι σύνθετες οργανικές πηγές αζώτου είναι καταλληλότερες για μυκηλιακή ανάπτυξη, και μάλιστα ανάμεσα στη πεπτόνη, το ΥΕ και την υδρολυμένη καζεΐνη, καλύτερες αποδόσεις έδωσε το ΥΕ, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη για το *P. ostreatus*. Επίσης, οι Jia et al. (2007), σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες του *P. nebrodensis* κρίναν καταλληλότερη πηγή αζώτου το ΥΕ, ενώ οι Wu et al. (2008) ανέφεραν τη σκόνη πεπτόνης ζύμης ως καλύτερη πηγή αζώτου για μυκηλιακή ανάπτυξη από το *P. citrinopileatus*. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το CSL επιλέχθηκε για τα περαιτέρω πειράματα αφού έδωσε την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο στέλεχος Βασιδιομύκητα. Η προτίμηση αυτής της

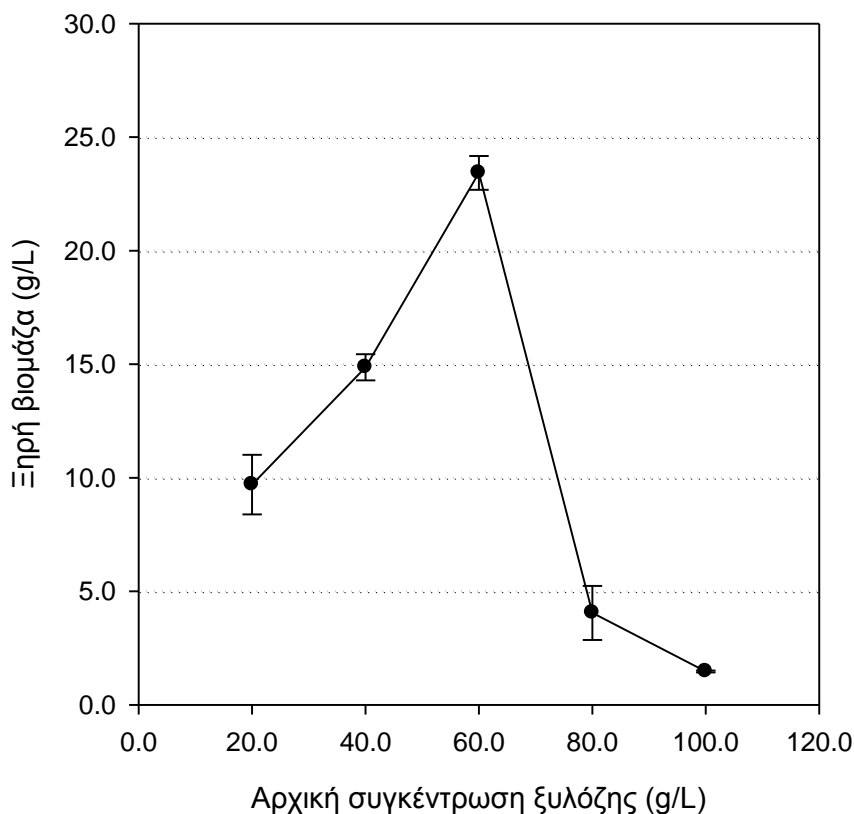
οικονομικά συμφέρουσας πηγής αζώτου από το *P. ostreatus* έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Gern et al. 2008).

5.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

Μεταξύ των πηγών άνθρακα και αζώτου που αξιολογήθηκαν, η ξυλόζη και το CSL που επιλέχτηκαν, μελετήθηκαν και ως προς την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσής τους στην παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

Για την επίτευξη υψηλής παραγωγής βιομάζας, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της συγκέντρωσης της ξυλόζης του βασικού μέσου ανάπτυξης P_{II} στην παραγωγή βιομάζας, σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες. Διατηρώντας ως πηγή αζώτου το CSL (30 g/L), η μέγιστη παραγόμενη ξηρή βιομάζα σε δοκιμαζόμενη συγκέντρωση ξυλόζης 20, 40, 60, 80 και 100 g/L που προσδιορίστηκε ήταν 9.70 ± 1.31 , 14.86 ± 0.57 , 23.43 ± 0.75 , 4.05 ± 1.20 και 1.47 ± 0.05 g/L, αντίστοιχα (Γράφ. 5.7), αποκαλύπτοντας πώς παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων ξυλόζης (> 60g/L) η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρεμποδίζονταν.

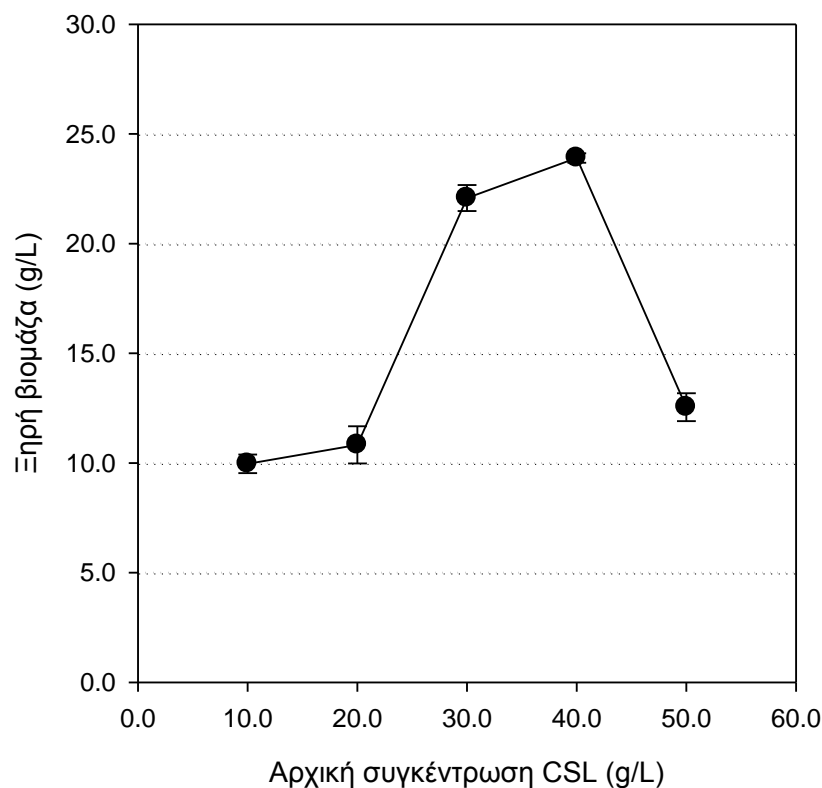
Παρομοίως, ο Zou et al. (2005) σε σχετική μελέτη για το μακρομύκητα με φαρμακολογικό ενδιαφέρον *Oudemansiella radicata*, ανέφερε ότι ενώ η αύξηση της αρχικά εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης σακχαρόζης από 10 σε 40 g/L, οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης βιομάζας σε βυθισμένες καλλιέργειες, για τιμές υψηλότερες αυτής της συγκέντρωσης σακχάρου, σημειώθηκε μείωση στην παραγωγή βιομάζας. Ομοίως, οι Kim et al. (2006), σημείωσαν ότι αρχική συγκέντρωση γλυκόζης μέχρι 70 g/L, προάγει την ανάπτυξη του *G. resinaceum* σε βυθισμένες καλλιέργειες ενώ πέρα από αυτήν, η παραγόμενη βιομάζα ελαττώνεται σημαντικά. Επίσης, οι Fang & Zhong (2002) ανέφεραν ότι υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκόζης από 50 g/L σε βυθισμένες καλλιέργειες του *G. lucidum* φέρει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στην παραγόμενη βιομάζα. Ένα τέτοιο φαινόμενο έχει επίσης παρατηρηθεί και σε καλλιέργειες άλλων μυκήτων εκτός Βασιδιομύκητων, όπως για παράδειγμα στο *Aspergillus niger* (Paragianni et al. 1999). Μάλιστα, οι Patel & Agnew (1988) ανέφεραν ότι με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων διαλυτών υποστρωμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται και τα σάκχαρα, η ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών παρεμποδίζεται εξαιτίας της ανεπιθύμητης ανάπτυξης οσμωτικών φαινομένων.



Γράφημα 5.7 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης ξυλόζης (20, 40, 60, 80 και 100 g/L) στην παραγωγή βιομάζας του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση CSL στο βασικό μέσο ανάπτυξης ήταν 30 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε δοκιμή.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του CSL στο βασικό μέσο ανάπτυξης P_{II} , διατηρώντας ως πηγή άνθρακα τη ξυλόζη (60 g/L) παρουσιάζονται στο Γράφ. 5.8. Από τις δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις του CSL (10, 20, 30, 40 και 50 g/L), υψηλότερη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε για 40 g/L, ενώ για υψηλότερη εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του CSL, παρατηρήθηκε 50% περίπου μείωση στην παραγόμενη βιομάζα υπό τις ίδιες συνθήκες. Προφανώς, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις CSL, η κυτταρική ανάπτυξη παρεμποδίζεται και έτσι η παραγόμενη βιομάζα ελαττώνεται. Το γεγονός αυτό πιθανόν να αποδίδεται στην παρουσία ορισμένων παρεμποδιστών ανάπτυξης που συναντώνται στο CSL, που σε υψηλή συγκέντρωση η παρεμποδιστική δράση μαλλον φαίνεται να υπερβαίνει την

θετική επίδραση που δείχνει το CSL. Παρόμοια υπόθεση έχουν διατυπώσει οι Fang & Zhong (2002) για την παρεμποδιστική δράση που παρατηρήθηκε σε υψηλή αρχική συγκέντρωση πεπτόνης στο μέσο ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας από το *G. lucidum* σε βυθισμένη καλλιέργεια.



Γράφημα 5.8 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης CSL (10, 20, 30, 40 και 50 g/L) στην παραγωγή βιομάζας του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε αναδευόμενες υγρές καλλιέργειες. Η χρησιμοποιούμενη αρχική συγκέντρωση ξυλόζης στο βασικό μέσο ανάπτυξης ήταν 60 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την μέση μέγιστη παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε για κάθε δοκιμή.

5.6 Συνδυαστική επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή βιομάζας

Η μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (RSM) αποτέλεσε το εργαλείο για την μελέτη της επίδρασης των συγκεντρώσεων της πηγής άνθρακα (ξυλόζη) και αζώτου (CSL) στην απόδοση μυκηλιακής βιομάζας από το *P. ostreatus*. Έτσι, ένας 3^2 κεντρικός πειραματικός

σχεδιασμός εφαρμόστηκε με τις συγκεντρώσεις της ξυλόζης και το CSL ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Το εύρος των δοκιμαζόμενων συγκεντρώσεων για τη ξυλόζη ήταν από 46-74 g/L και για το CSL από 19-61 g/L, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων. Οι συνδυασμοί των κωδικοποιημένων τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από την ανάλυση παρουσιάζονται στον Πιν. 5.2. Τρεις επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν για το κεντρικό σημείο του σχεδίου, ενώ το σύνολο των συνδυασμένων πειραματικών συνθηκών ήταν 11.

Πίνακας 5.2 Κωδικοποιημένες και πραγματικές μεταβλητές για τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον κεντρικό πειραματικό σχεδιασμό (CCD) αριστοποίησης για παραγωγή ξηρής βιομάζας από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 και οι αντίστοιχες αποδόσεις ξηρής βιομάζας που προσδιορίστηκαν (XYL: ξυλόζη, CSL: Εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού)

Πειραματική Συνθήκη	Κωδικοποιημένες τιμές των μεταβλητών ($X_1 = \text{XYL}, X_2 = \text{CSL}$)		Πραγματικές τιμές (g/L) ($C_1 = \text{XYL}, C_2 = \text{CSL}$)		Παραγωγή Βιομάζας (g/L)
	X_1	X_2	C_1	C_2	Y
	1	-1	-1	50.0	25.0
2	1	-1	70.0	25.0	5.0
3	-1	1	50.0	55.0	7.9
4	1	1	70.0	55.0	10.6
5	0	0	60.0	40.0	24.5
6	0	0	60.0	40.0	24.0
7	0	0	60.0	40.0	23.5
8	-1.41	0	46.0	40.0	18.6
9	0	-1.41	60.0	19.0	11.0
10	1.41	0	74.0	40.0	5.9
11	0	1.41	60.0	61.0	5.9

Η ορθότητα του μοντέλου δοκιμάστηκε με την ανάλυση της διασποράς (Πιν. 5.3 και 5.4). Η τιμή της F (37.95) που υπολογίστηκε, αποδεικνύει ότι το μοντέλο ήταν στατιστικά σημαντικό με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης. Επίσης, η τιμή της P -πιθανότητας ήταν πολύ χαμηλή ($P=0.0006$), αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα των όρων του μοντέλου. Από την τιμή

του συντελεστή μεταβλητότητας ($R^2=0.974$), φαίνεται να υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών.

Πίνακας 5.3 Ανάλυση της διασποράς (ANOVA) του μοντέλου που προβλέπει την παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* ATHUM 4438

	BE	AT	MT	F	P
Μεταβλητές	5	581.8	116.4	37.95	0.0006
Σφάλματα	5	15.3	3.1		
Σύνολο	10	597.1	59.7		

Συντελεστής Προσαρμογής $R^2=0.974$, Τυπικό Σφάλμα Εκτίμησης 1.75.

BE: Βαθμοί Ελευθερίας, AT: Άθροισμα Τετραγώνων, MT: Μέσοι Τετραγώνων

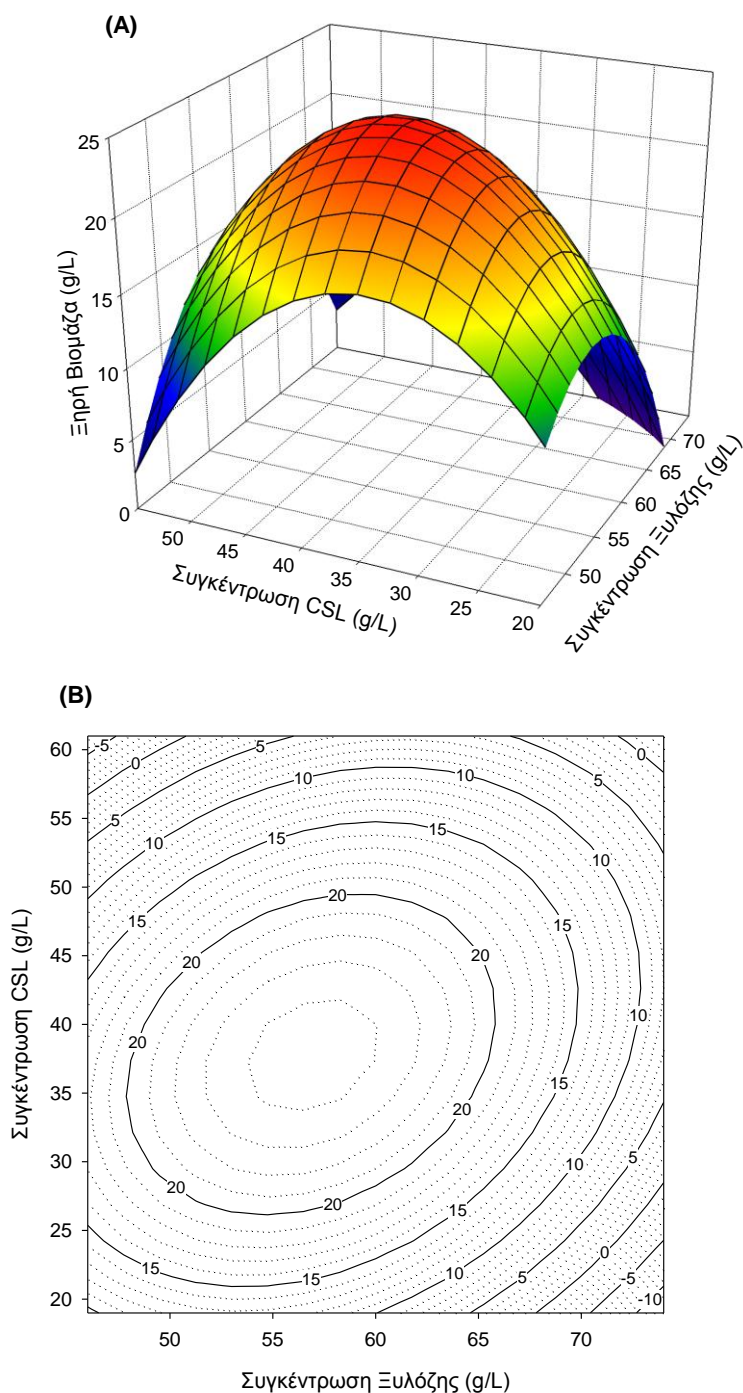
Το δεύτερο βαθμού πολυωνυμικό μοντέλο που προέκυψε και περιγράφει την επίδραση των συγκεντρώσεων της ξυλόζης και του CSL στην παραγωγή βιομάζας από *P. ostreatus* δίνεται από την εξίσωση (2):

$$Y = -172.4 + 6.0 \cdot X_1 + 1.4 \cdot X_2 + 0.023 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.061 \cdot X_1^2 - 0.036 \cdot X_2^2 \quad (2)$$

Η δοκιμασία Student's t-test πραγματοποιήθηκε για την εκτίμηση της σημαντικότητας των συντελεστών παλινδρόμησης. Οι συντελεστές παλινδρόμησης, οι τιμές t και p για τις πρώτου και δευτέρου βαθμού καθώς και τις συνδυασμένες επιδράσεις δίνονται στον Πιν. 5.4. Όπως διαπιστώνεται, όλοι οι συντελεστές του μοντέλου κρίθηκαν στατιστικά σημαντικοί ($p < 0.05$).

Από το παραπάνω μοντέλο (2) και σε συνδυασμό με τα δεδομένα του Πιν. 5.4 διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση της ξυλόζης ασκεί σημαντική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus*, καθώς παρουσίασε και υψηλότερο συντελεστή.

Η απορρέουσα ισοϋψής καμπύλη στην οποία φαίνεται η επίδραση των συγκεντρώσεων της ξυλόζης και του CSL στην παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus*, παρουσιάζεται στο Γράφ. 5.9. Όπως είναι φανερό η σχηματιζόμενη επιφάνεια απόκρισης παρουσιάζει ένα μέγιστο σημείο. Το άριστο ζεύγος τιμών συγκεντρώσεων ξυλόζης και CSL για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό βρέθηκε να είναι: 57 g/L ξυλόζη και 37 g/L CSL με μέγιστη προβλεπόμενη παραγωγή ξηρής βιομάζας 24.5 g/L.



Γράφημα 5.9 (A) Επιφάνεια απόκρισης και **(B)** ισοϋψής καμπύλη που δείχνει την επίδραση των συγκεντρώσεων της ξυλόζης και του CSL, καθώς και την συνδυαστική τους επίδραση στην παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* ATHUM 4438. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε πειραματική συνθήκη και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28\pm 2^{\circ}\text{C}$

Πίνακας 5.4 Εκτιμώμενοι συντελεστές παλινδρόμησης του δευτέρου βαθμού πολυωνυμικού μοντέλου

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Συντελεστές	Τυπικό Σφάλμα	t	P
Σταθερά	-172.4	31.6	-5.45	0.0028
X_1	6.0	0.9	6.48	0.0013
X_2	1.4	0.4	3.12	0.0263
X_1^2	-0.061	0.007	-8.10	0.0005
X_2^2	-0.036	0.003	-10.70	0.0001
$X_1 X_2$	0.023	0.006	3.95	0.0109

Η απορρέουσα ισοϋψής καμπύλη στην οποία φαίνεται η επίδραση των συγκεντρώσεων της ξυλόζης και του CSL στην παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus*, παρουσιάζεται στο Γράφ. 5.9. Όπως είναι φανερό η σχηματιζόμενη επιφάνεια απόκρισης παρουσιάζει ένα μέγιστο σημείο. Το άριστο ζεύγος τιμών συγκεντρώσεων ξυλόζης και CSL για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό βρέθηκε να είναι: 57 g/L ξυλόζη και 37 g/L CSL με μέγιστη προβλεπόμενη παραγωγή ξηρής βιομάζας 24.5 g/L.

5.7 Μελέτη της ανάπτυξης του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα

Η ανάπτυξη του *P. ostreatus* μελετήθηκε σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας λειτουργικού όγκου εργασίας 17-L στις άριστες συνθήκες ανάπτυξης που προέκυψαν από τις μικρής κλίμακας πειραματικές συνθήκες (Εικ. 5.1α). Στο Γράφ. 5.10 παρουσιάζεται η παραγωγή ξηρής βιομάζας και η συγκέντρωση της εναπομείνουσας ξυλόζης κατά την μυκηλιακή ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα. Όπως διαπιστώνεται η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (39.2 ± 0.6) g/L επιτεύχθηκε μετά από 68h καλλιέργειας. Το μυκήλιο υπολογίστηκε ότι αναπτύχθηκε με μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{max}) 0.051 h^{-1} ενώ η ειδική αφομοίωση της ξυλόζης βρέθηκε $0.181 \text{ mmol ξυλόζης g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βρέθηκε υψηλότερος σε σχέση με αναφορές από άλλες μελέτες (Gern et al. 2008, Marquez-Rocha et al. 1999) για τον ίδιο μικροοργανισμό αναπτυσσόμενο σε γλυκόζη (0.04 h^{-1}). Επίσης, η τιμή $Y_{x/s}$ που ορίζεται ως παραγόμενη βιομάζα (g) ανά (g) σακχάρου που χρησιμοποιείται στο μέσο ανάπτυξης, υπολογίστηκε για την παρούσα μελέτη 0.98, που είναι υψηλότερη από αυτήν που έχει έως τώρα αναφερθεί. Για

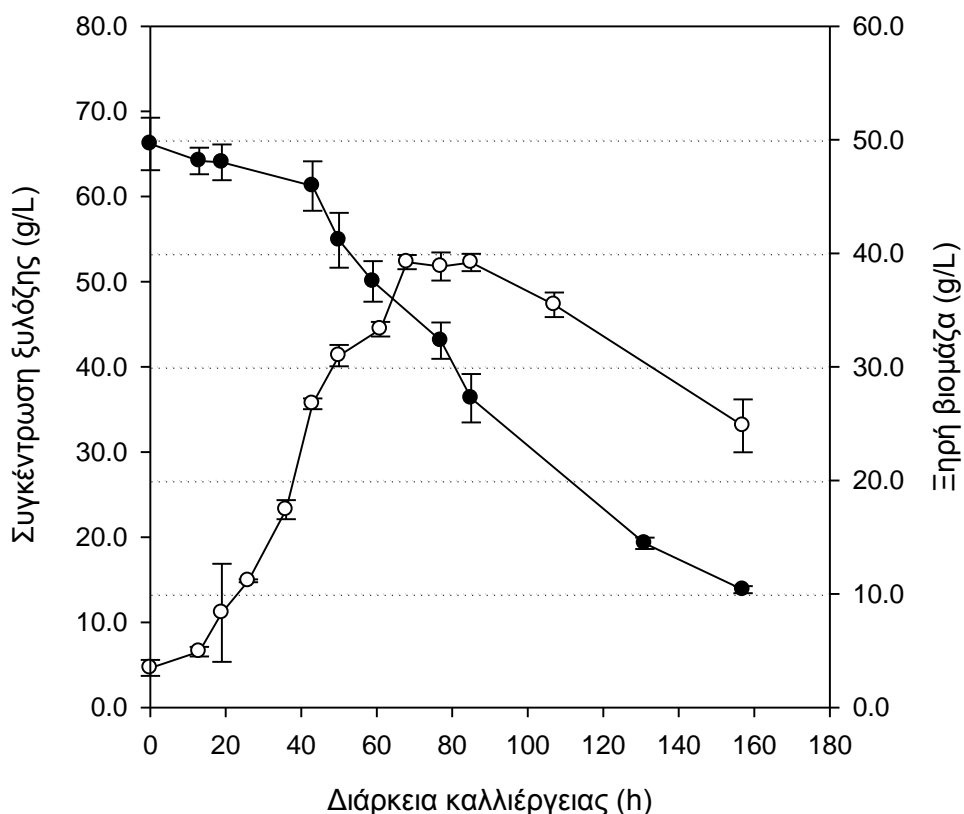
παράδειγμα, οι Marquez-Rocha et al. (1999) και οι Gern et al. (2008) ανέφεραν τιμή $Y_{x/s}$ 0.51 και 0.75, αντίστοιχα για τον ίδιο μικροοργανισμό. Οι Rosaso et al. (2003) ανέφεραν για το *P. ostreatus* "florida" $Y_{x/s}$ 0.38 και για το *P. ostreatoroseus* 0.28, ενώ οι Kim et al. (2002a) για το *P. sacor-caju* ανέφεραν $Y_{x/s}$ 0.36. Ακόμα, οι Confortin et al. (2008) που μελέτησαν το *P. sacor-caju* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 5L, ανέκτησαν 8.18 g/L ξηρή βιομάζα με αρκετά υψηλή τιμή $Y_{x/s}$ (0.81) αλλά παραγωγικότητα ($0.085 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), πολύ χαμηλότερη από αυτήν που σημειώθηκε στην παρούσα μελέτη ($0.58 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).



Εικόνα 5.1. Ανάπτυξη του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε βιοαντιδραστήρα 20L

Η βιομάζα που ανακτήθηκε από την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας ήταν σχεδόν διπλάσια σε σχέση με αυτήν που ανακτήθηκε στις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες μικρής κλίμακας (24.5 g/L), ενώ ο χρόνος που απαιτήθηκε για την μέγιστη παραγωγή ήταν σχεδόν ο μισός, όταν στα προηγούμενα πειράματα μικρής κλίμακας απαιτούνταν τουλάχιστον 144 h. Σημαντικός παράγοντας για την αυξημένη κατά 1.6 φορές παραγωγή βιομάζας που προέκυψε από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες σε φλάσκες είναι οι διαφορετικές συνθήκες αερισμού. Στην διεργασία του βιοαντιδραστήρα η παροχή αερισμού ρυθμιζόταν ώστε το διαλυτό οξυγόνο να είναι πάνω από το 10% του κορεσμού του. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι ο αερισμός ευνοεί την μυκηλιακή ανάπτυξη καθώς και τη συμπεριφορά των

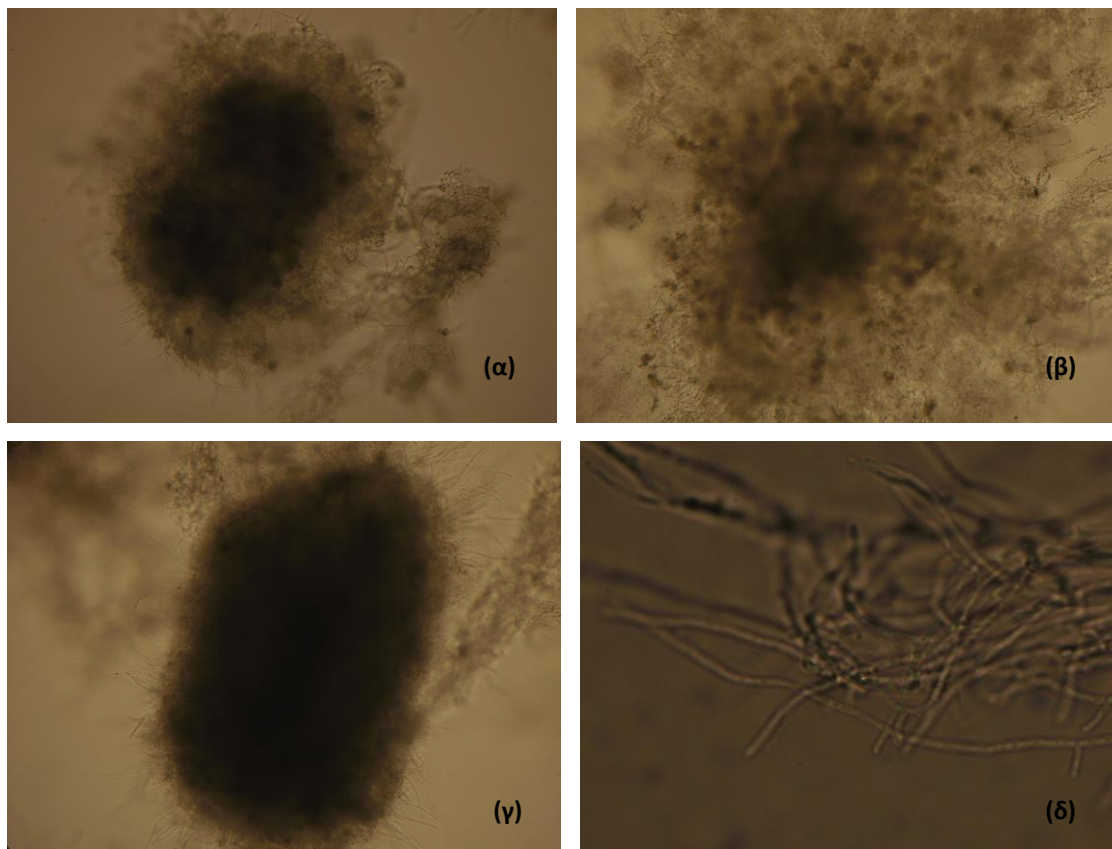
μικροβιακών κυττάρων αφού βελτιώνει τις συνθήκες μεταφοράς μάζας που σχετίζεται με τα υποστρώματα, τα προϊόντα και το οξυγόνο (Mantzouridou et al. 2002).



Γράφημα 5.10. Παραγωγή ξηρής βιομάζας (○) και κατανάλωση ξυλόζης (●) κατά την ανάπτυξη του *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας 20 L. Η θερμοκρασία, η ανάδευση και η τιμή του pH ρυθμίστηκαν αυτόματα ($T=28^{\circ}\text{C}$, 160 rpm και $\text{pH}=6.0$) για 160h. Το μέσο ανάπτυξης περιείχε 57g/L ξυλόζη, 37g/L CSL, 1 g/L K_2HPO_4 και 0.2g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Στο τέλος της ανάπτυξης του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα παρατηρήθηκε έντονη αύξηση του ιξώδους του ζωμού καλλιέργειας. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Gern et al. 2008) και αποδίδεται στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και μάλιστα είναι δυνατό να προκαλέσει δυσχερείς συνθήκες για τη μεταφορά οξυγόνου και σακχάρου στα κύτταρα. Οι Burns et al. (1994) μάλιστα παρατήρησαν ότι προς το τέλος της καλλιέργειας του *P. ostreatus var florida* η παραγωγή βιομάζας περιορίστηκε, ακόμα και με την

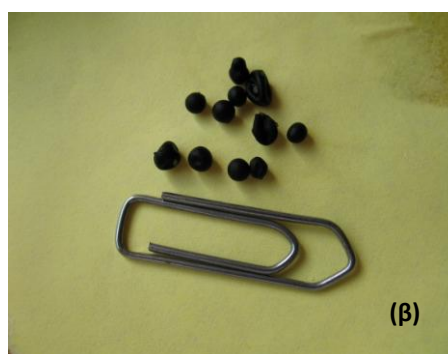
παρουσία γλυκόζης στο μέσο, πιθανόν λόγω της ανάπτυξης ενός πολυμερούς στρώματος περιφερειακά των κυττάρων.



Εικόνα 5.2 Διαφοροποιημένα μυκηλιακά συσσωματώματα **(α,β,γ)** και υφές **(δ)** του *P. ostreatus* ATHUM4438 που προέκυψαν κατά την ανάπτυξή του στο βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας, μετά από παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40 x).

Ακόμα να σημειωθεί ότι μετά τις περίπου 90h καλλιέργειας του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα, τα μυκηλιακά συσσωματώματα διαφοροποιήθηκαν, αφού έλαβαν σκούρο μαύρο χρώμα και γίναν πιο τραχιά, γεγονός που δεν είχε παρατηρηθεί στις υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες σε φιάλες (Εικ. 5.2, 5.3α, β). Συγκεκριμένα, η παρατήρηση των μυκηλιακών συσσωματωμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο αποκάλυψε σκουρόχρωμους μικροϊνώδεις σχηματισμούς στο εσωτερικό τους (Εικ. 5.2). Η μαύρη χρωστική που παράχτηκε είναι μελανίνη, και έχει μάλιστα αναφερθεί ξανά για το μυκήλιο και το καρπόσωμα του *Pleurotus cystidiosus* (Selvakumar et al. 2008, Petersen et al. 1997, Zervakis 1998). Ο ρόλος της μελανίνης είναι μεγάλης λειτουργικής και φυσιολογικής σημασίας για τους μύκητες.

Ειδικότερα, μία μεγάλη μοριακού βάρους μαύρη χρωστική διατάσσεται σε μια δομή στρώματος μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης του αππρεσσόριου (*appressorium*) του μύκητα, και εκτός από τον προστατευτικό ρόλο που προσδίδει αυτή στο μύκητα εναντίον περιβαλλοντικών παραγόντων στρες (ακτινοβολίες UV, υψηλές θερμοκρασίες, κ.α.), καθίσταται απόλυτα αναγκαία για την παθογόνο δράση του μύκητα στον ξενιστή (Howard & Ferrari 1989). Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι η επαγωγή της παραγωγής μελανίνης από το *P. ostreatus* σημειώθηκε όταν ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε, και συγκεκριμένα στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι και άλλοι ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι στις βυθισμένες καλλιέργειες των Βασιδιομυκήτων, με την εξάντληση της παρεχόμενης πηγής άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης, τα μυκηλιακά συσσωματώματα λαμβάνουν σκούρο χρώμα και μετά διασπώνται (Maziero et al. 1999).



Εικόνα 5.3. Διαφοροποιημένα μυκηλιακά συσσωματώματα **(α)** όπως διακρίνονται στο δοχείο του βιοαντιδραστήρα, **(β)** μακροσκοπικά και **(γ)** συλλεγόμενη βιομάζα από την ανάπτυξή του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα

5.8 Χημική σύσταση του μυκηλίου του *P. ostreatus* από την ανάπτυξή του σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας

Στον Πιν. 5.5 παρουσιάζεται το ποσοστό συγκέντρωσης των κύριων συστατικών στα 100g μυκηλίου που προέκυψε από την καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας μετά το τέλος της διεργασίας, αφού προηγήθηκε φυγοκέντρηση και ψυχοξήρανση. Παράλληλα, τα δεδομένα αυτά συγκρίνονται με εκείνα από την αντίστοιχη ανάλυση του ξηρού καρποσώματος από την οποία το συγκεκριμένο στέλεχος προήλθε, με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας στην βασική σύσταση του Βασιδιομύκητα.

Σχετικά με το περιεχόμενο ολικών διαιτητικών ινών, φαίνεται ότι το ποσοστό διαιτητικών ινών είναι σημαντικά μεγαλύτερο για το μυκήλιο $62.5 \pm 0.9\%$ σε σχέση με το αντίστοιχο που βρέθηκε για το καρπόσωμα ($44.1 \pm 1.9\%$), όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ειδικό εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα K-TDFR 12/05 της Megazyme (Ireland), σε συμφωνία με την ενζυμική-βαρομετρική μέθοδο AOAC 991.43.

Το ποσοστό διαιτητικών ινών που σημειώθηκε για το καρπόσωμα είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με το αντίστοιχο που έχει προσδιοριστεί από τους Manzi et al. (2001) για τα καρποσώματα του ίδιου είδους (47.3%). Οι ίδιοι ερευνητές για τα καρποσώματα του *P. eryngii* ανέφεραν ποσοστό διαιτητικών ινών 34.6%. Επιπροσθέτως, οι Synytsya et al. (2008a) προσδιόρισαν τις περιεχόμενες διαιτητικές ίνες σε 4 διαφορετικά στελέχη των *P. ostreatus* και *P. eryngii* και ανέφεραν ότι κυμαίνονται από 34.5 μέχρι 63.1% στους πύλους και από 38.9 μέχρι 64.8% στους στύπους των καρποσωμάτων. Αξίζει να αναφερθεί βεβαίως, ότι η ξηρά ουσία των Βασιδιομυκήτων είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, που σύμφωνα με τα έως σήμερα δημοσιευμένα δεδομένα συνιστούν και το επικρατέστερο συστατικό τους. Οι υδατάνθρακες των Βασιδιομυκήτων συνίστανται από πολυσακχαρίτες, όπως γλυκάνες, μόνο- και δισακχαρίτες, αλκοολικά σάκχαρα, γλυκογόνο και χιτίνη (Kalač 2009). Μάλιστα σύμφωνα με τους Matilla et al. (2002b) το ποσοστό υδατανθράκων για το καρπόσωμα του *P. ostreatus* κυμαίνεται από 46.6 μέχρι 81.8%. Ο Stamets (2005b) ενδεικτικά για τα ξηρά καρποσώματα του *P. ostreatus* ανέφερε ότι περιέχουν 56.5 % υδατάνθρακες από τις οποίες το 33.4% είναι διαιτητικές ίνες.

Πίνακας 5.5 Χημική σύσταση του μυκήλιου και του καρπόσωματος του *P. ostreatus* ATHUM 4438

Συστατικά	Μυκήλιο	Καρπόσωμα ^a
Διαιτητικές Ίνες (TDF) (%)	62.5 ± 0.9	44.1 ± 1.9
α-γλουκάνες (%)	2.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1
β-γλουκάνες (%)	11.4 ± 0.6	29.9 ± 1.6
Πρωτεΐνες (%)	16.7 ± 0.1	42.5 ± 0.9
Ολικό Λίπος (%)	11.5±0.2	2.8±0.3
Μη-πολικό λίπος (%)	4.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Τέφρα (%)	6.7 ± 0.2	10.4 ± 0.7

^a Αντιστοιχεί στο καρπόσωμα του *P. ostreatus* ATHUM 4438. Οι φυσικοχημικές δοκιμές έγιναν σε 100 g βιομάζας (ξηρό μυκήλιο ή καρπόσωμα)

Σχετικά με το περιεχόμενο διαιτητικών ινών σε μυκηλιακή δομή για είδη του γένους *Pleurotus*, έχει αναφερθεί μία μόνο μελέτη από τους Wu et al. (2004), για το είδος *P. tuber-regium* για το οποίο η μέγιστη περιεκτικότητα σε διαιτητικών ινών που σημειώθηκε ήταν 49.5% υπό συνθήκες λόγου C:N 6:1. Αυξημένο ποσοστό διαιτητικών ινών του μυκήλιου σε σχέση με αυτό του καρπόσωματος έχει επίσης αναφερθεί από τους Confortin et al. (2008) για το *P. sajor-caju*, με το μυκήλιο να περιέχει 46.5%, έναντι του 35.8% που σημειώθηκε για το αντίστοιχο καρπόσωμα. Βέβαια, οι ίδιοι παρατήρησαν ότι το συνολικό ποσοστό υδατανθράκων ήταν στα ίδια επίπεδα (περίπου 55.4%) και για τις δύο δομές.

Είναι λοιπόν φανερό, ότι το υψηλό ποσοστό διαιτητικών ινών (62.5%) που σημειώθηκε για το μυκήλιο που προέκυψε από την υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του μελετώμενου στελέχους του *P. ostreatus*, αποτελεί σημαντικό κίνητρο για την δυνατή χρήση του ως διατροφικό συμπλήρωμα, γεγονός που το οφείλει στην υγρή βυθισμένη καλλιέργεια που εφαρμόστηκε για την ανάπτυξή του.

Είναι γνωστό ότι οι ολικές διαιτητικές ίνες στα μανιτάρια ουσιαστικά συνίστανται από το άθροισμα των ανθεκτικών στη πέψη υδατανθράκων, το επικρατέστερο από τα οποία είναι η χιτίνη (Vetter 2007). Οι γλουκάνες όμως, αποτελούν συστατικά των διαλυτών και αδιάλυτων διαιτητικών ινών (Prosky et al. 1988). Έτσι, σχετικά με τις περιεχόμενες ολικές γλουκάνες (α και β-γλουκάνες), η μέτρηση των οποίων έγινε με ειδικό εμπορικό διαγνωστικό σκεύασμα K-YBGL της Megazyme (Ireland), όπως παρουσιάζεται και στον Πιν. 5.5, το καρπόσωμα φαίνεται να

περιέχει σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση (30.9%) σε σχέση με αυτήν που ανακτήθηκε για το μυκήλιο (14.0%). Η μεγάλη διαφορά που παρατηρείται οφείλεται κατά κύριο λόγο στις περιεχόμενες β-γλουκάνες, το ποσοστό των οποίων φτάνει τα $29.9 \pm 1.6\%$ για το καρπόσωμα, έναντι του $11.4 \pm 0.6\%$ που σημειώθηκε για το μυκήλιο που προέκυψε από την βυθισμένη καλλιέργεια του μελετώμενου στελέχους Βασιδιομύκητα. Το ποσοστό των ολικών γλουκανών στο μυκήλιο και στο καρπόσωμα του *P. ostreatus* αντιπροσωπεύει το 22.4% και 70.1% των διαιτητικών ινών, αντίστοιχα. Το υπόλοιπο των περιεχόμενων διαιτητικών ινών συνίσταται από τους άλλους άπεπτους υδατάνθρακες και κυρίως σε μεγαλύτερο ποσοστό από χιτίνη (Vetter 2007). Ο Cheung (1997a) μάλιστα ανίχνευσε και ημικυτταρίνη και πηκτινικά συστατικά σε διάφορα είδη εδώδιμων Βασιδιομυκήτων. Άρα συμπεραίνεται ότι στις διαιτητικές ίνες της μυκηλιακής δομής του *P. ostreatus* επικρατεί η χιτίνη έναντι των γλουκανών, σε αντίθεση με τις αντίστοιχες του καρποσώματος που κυριαρχούν οι γλουκάνες.

Οι Manzi & Pizzoferato (2000) ανέφεραν πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις β-γλουκανών οι οποίες κυμαίνονταν από 0.21 έως 0.53% επί ξηρού για τα καρποσώματα διαφορετικών ειδών του γένους *Pleurotus*. Οι Synytsya et al. (2008a) ανέφεραν ποσοστά α-γλουκανών: 3.4-7.9% στους πύλους και 3.0-7.6% στους στύπους, και ποσοστά β-γλουκανών 27.4-39.2% στους πύλους και 35.0-50.0% στους στύπους καρποσωμάτων για 4 διαφορετικά στελέχη του *P. ostreatus*. Σχετικά με τους εξωπολυσακχαρίτες που παράχτηκαν κατά τη βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα, μετά την ανάλυσή τους όπως περιγράφεται στην παρ. 2.6.8, βρέθηκε ότι περιέχουν $0.35 \pm 0.01\%$ επί ξηρού α-γλουκάνες και δεκαπλάσιο σχεδόν ποσοστό β-γλουκάνες ($3.32 \pm 0.12\%$). Μάλιστα, σε σύγκριση με το μυκήλιο, το περιεχόμενο ολικών γλουκανών στο εξωκυτταρικό υγρό ανακτήθηκε σε υποτετραπλάσια συγκέντρωση.

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των καρποσωμάτων του μελετώμενου Βασιδιομύκητα βρέθηκε υψηλότερο ($42.5 \pm 0.9\%$) σε σχέση με το αντίστοιχο του μυκηλίου ($16.7 \pm 0.1\%$), όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Kheldahl. Σε σύγκριση με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των καρποσωμάτων όπως προέκυψε από τα δεδομένα αυτής της εργασίας, οι Ouzouni et al. (2009) σε μελέτη σχετικά με τη βασική σύσταση άγριων εδώδιμων Βασιδιομυκήτων ελληνικής προέλευσης, ανέφεραν γενικότερα χαμηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, που κυμαίνονταν από 21.6 έως 34.8% επί ξηρού για τα καρποσώματα. Ο Stamets (2005b) ενδεικτικά για τα ξηρά καρποσώματα του *P. ostreatus* και του *P. pulmonarius* ανέφερε πρωτεϊνικό περιεχόμενο 27.3% και 19.2%, αντίστοιχα. Οι Bonatti et al. (2004), που ανέλυσαν τη σύσταση του καρποσώματος

του *P. sajor-caju* αναπτυσσόμενο σε διάφορα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, ανέφεραν χαμηλότερα πρωτεϊνικά περιεχόμενα που κυμαίνονταν από 13% μέχρι 18% επί ξηρού, ενώ οι Mshandete & Cuff (2007) ανέφεραν για το καρπόσωμα του *P. flabellatus* ότι περιέχει 21.0% πρωτεΐνη επί ξηρού.

Το αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο που σημειώθηκε στο καρπόσωμα σε σχέση με αυτό του μυκήλιου, έχει παρατηρηθεί και από τους Manu-Tawiah & Martin (1987), οι οποίοι στην μελέτη τους αναφέρουν πρωτεϊνικό περιεχόμενο 36% για το καρπόσωμα έναντι 25.7% για το μυκήλιο που προέκυψε από υγρή καλλιέργεια του *P. ostreatus* χρησιμοποιώντας πηγή άνθρακα γλυκόζη (45g/L). Παρομοίως, οι Confortin et al. (2008) σχετικά με το *P. sajor-caju* βρήκαν ελαφρώς αυξημένο πρωτεϊνικό περιεχόμενο στο καρπόσωμα (36.4%) σε σχέση με το μυκήλιο (32.1%) επί ξηρού. Γενικότερα, είναι γνωστό πάντως, ότι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των Βασιδιομυκήτων επηρεάζεται εκτός από το είδος και από πολλούς άλλους παράγοντες όπως το στάδιο ανάπτυξης, το τμήμα του καρποσώματος που αναλύεται, οι συνθήκες ανάπτυξης, οι γεωγραφική περιοχή και ο χρόνος συλλογής τους, αλλά και από τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού (Bernas et al. 2006, Flegg & Maw 1977, Ozcan & Akgül 1998).

Σχετικά με το περιεχόμενο σε ολικό λίπος, όπως προσδιορίστηκε μετά από εκχύλιση με τη διάταξη Soxhlet, χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v), διαπιστώθηκε ότι το μυκήλιο περιείχε σχεδόν τετραπλάσια συγκέντρωση ($11.5\pm 0.2\%$) σε σχέση με του αντίστοιχου καρποσώματος ($2.8\pm 0.3\%$). Το ποσοστό ολικού λίπους που σημειώθηκε για το μυκήλιο του *P. ostreatus* (11.5%) είναι στα ίδια επίπεδα με αυτό που προσδιορίστηκε για το μυκήλιο του ίδιου είδους ύστερα από υγρή καλλιέργειά του σε συνθετικό μέσο από τους Manu-Tawiah & Martin (1987). Τα αποτελέσματα συμπίπτουν και με τους Confortin et al. (2008) που ανέφεραν για το μυκήλιο του *P. sajor-caju* αναπτυσσόμενο σε υγρή καλλιέργεια υψηλότερο ποσοστό λίπους (10.2%) έναντι του αντίστοιχου του καρποσώματος (2.3%), και μάλιστα η διαφορά που βρέθηκε ανάμεσα στις δύο διαφορετικές δομές σχεδόν συμπίπτει με την αντίστοιχη που προέκυψε από τα παρόντα δεδομένα.

Το ποσοστό μη πολικού λίπους όπως προσδιορίστηκε μετά από εκχύλιση με τη διάταξη Soxhlet, χρησιμοποιώντας εξάνιο, φαίνεται ότι είναι και αυτό υψηλότερο για το μυκήλιο ($4.2\pm 0.2\%$) σε σχέση με του καρποσώματος ($1.4\pm 0.2\%$). Το ποσοστό μη πολικού λίπους που βρέθηκε για το καρπόσωμα του συγκεκριμένου στελέχους του *P. ostreatus* βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών (0.4-12.6%) που έχει αναφερθεί για διαφορετικά είδη Βασιδιομυκήτων (Barros et al. 2007a, Colak et al. 2009, Kostelc & Hendry 1981, Ouzouni et al. 2009, Pedneault et al. 2006,

Sherief et al. 1993). Μάλιστα, οι Gbolagade et al., (2006a) έχουν αναφέρει για τα είδη *P. atroumbonata* και *P. florida*, ποσοστά μη πολικού λίπους 5.2% και 1.2% επί ξηρού. Πάντως, ο Lösel (1998) έχει αναφέρει ότι πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν το περιεχόμενο λίπους στους μύκητες.

Το ποσοστό τέφρας (%) βρέθηκε για το μυκήλιο χαμηλότερο ($6.7 \pm 0.2\%$), σε σχέση με αυτό του καρποσώματος ($10.4 \pm 0.7\%$). Το αυξημένο ποσοστό τέφρας στο μυκήλιο σε σχέση με το αντίστοιχο του καρποσώματος έχει αναφερθεί ακόμα από τους Confortin et al. (2008) για το *P. sajor-caju*, καθώς και από τους Manu-Tawiah & Martin (1987) για το *P. ostreatus*. Το ποσοστό τέφρας που βρέθηκε για το καρπόσωμα βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών που έχει αναφερθεί για τους Βασιδιομύκητες (2.9-12% επί ξηρού) (Colak et al. 2009, Kalač et al. 2009, Ouzouni et al. 2009). Μάλιστα ειδικά για το καρπόσωμα του *P. ostreatus*, οι Matilla et al. (2002b) έχουν αναφέρει ποσοστό τέφρας 8.0%, ενώ οι Manu-Tawiah & Martin (1987) 10.1%.

Τέλος, η περιεχόμενη υγρασία για το μυκήλιο του *P. ostreatus* (89.12%) έρχεται σε συμφωνία με τους Manzi et al. (2001) ότι τα φρέσκα μανιτάρια περιέχουν 82-95% νερό.

5.9 Επίδραση της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων

Όπως διαπιστώθηκε από τα προηγούμενα αποτελέσματα, η βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να άσκησε σημαντική επίδραση στο μη πολικό κλάσμα του λίπους, αφού παρατηρήθηκε μεγαλύτερη από 50% αύξησή του στο μυκήλιο σε σχέση με αυτό που περιέχεται στο φυσικό καρπόσωμα αυτού του είδους. Σκοπός των σχετικών πειραμάτων που διεξάχθηκαν ήταν η μελέτη της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* στο προφίλ των λιπαρών οξέων του μη πολικού λίπους που ανακτήθηκε. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση μέσω GC του λίπους και για το καρπόσωμα και για το μυκήλιο, ώστε να συγκριθούν τα προφίλ.

Από την ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων για το καρπόσωμα και το μυκήλιο του *P. ostreatus*, ανιχνεύτηκαν 28 και 20 διαφορετικά λιπαρά οξέα, αντίστοιχα (Πιν. 5.6). Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας κυμαίνονταν από 10-22 και από 10-24 άτομα άνθρακα για το καρπόσωμα και το μυκήλιο, αντίστοιχα, που βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών (8-24) για το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας διαφορετικών ειδών Βασιδιομυκήτων που έχει αναφερθεί (Yilmaz et al. 2006). Μάλιστα, ο Pedneault et al. (2007) ανέφερε για το μη πολικό εκχύλισμα του

λίπους λιπαρά οξέα από 12 έως 24 άτομα άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα τους για το *P. ostreatus* και το *P. cornucopiae var. citrino-pileatus*.

Όπως διαπιστώνεται στο προφίλ και των δύο δομών του Βασιδιομύκητα επικρατούν τα εξής 4 λιπαρά οξέα: το λινελαϊκό (C18:2ω-6), το ελαϊκό (C18:1ω-9), το παλμιτικό (C16:0) και το στεαρικό οξύ (C18:0). Παρομοίως, και για άλλα είδη ανώτερων Βασιδιομυκήτων, τα παραπάνω λιπαρά οξέα είναι αυτά που επικρατούν του συνόλου (Barros et al. 2007b, León-Guzmán et al. 1997, Ribeiro et al. 2009, Yilmaz et al. 2006). Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν, βρέθηκαν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα ανιχνεύτηκαν στο καρπόσωμα του *P. ostreatus*, όπως για παράδειγμα το πενταδεκανοϊκό (C15:0), το επταδεκανοϊκό (C17:0) και το κύκλο-επταδεκανοϊκό οξύ (cyclo-C17:0), τα οποία μάλιστα έχουν αναφερθεί για το ίδιο είδος και από τους Pedneault et al. (2007). Με εξαίρεση το επταδεκανοϊκό οξύ, τα άλλα δύο δεν ανιχνεύτηκαν στο μυκήλιο.

Το λινελαϊκό οξύ αποδείχτηκε το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο καρπόσωμα του *P. ostreatus*, αφού το ποσοστό του προσέγγισε το 55.51±0.54% του συνόλου των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, η βυθισμένη καλλιέργεια του συγκεκριμένου Βασιδιομύκητα στο βιοαντιδραστήρα, φαίνεται να διαφοροποίησε τις σχετικές αναλογίες των λιπαρών οξέων, αφού στο μυκήλιο επικράτησαν το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ σε περίπου ίσα ποσοστά, και συγκεκριμένα 37.53±0.38% και 34.13±0.1% του συνόλου των λιπαρών οξέων, αντίστοιχα.

Πάντως το προφίλ των λιπαρών οξέων του καρποσώματος του μελετώμενου στελέχους του *P. ostreatus* σχεδόν συμπίπτει με το αντίστοιχο για το ίδιο είδος που έχει αναφερθεί, σύμφωνα με το οποίο φαίνεται ότι το λινελαϊκό, ελαϊκό και παλμιτικό οξύ επικράτησαν, σε συνολικό ποσοστό 83.1–95.9%, ανάλογα της εφαρμοζόμενης θερμοκρασίας ανάπτυξης (Pedneault et al. 2007). Μάλιστα το ποσοστό του λινελαϊκού οξέως βρέθηκε κατά 3.5 φορές μεγαλύτερο στο καρπόσωμα σε σχέση με το μυκήλιο. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Hadar & Cohen-Arazi (1986), που σύγκριναν τη χημική σύσταση του αναπτυγμένου μυκηλίου του *P. ostreatus* σε υγρή αναδευόμενη καλλιέργεια σε σχέση με του φυσικά απαντώμενου καρποσώματος.

Πίνακας 5.6 Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w) του μη πολικού λίπους του καρποσώματος και του μυκηλίου του *P. ostreatus* ATHUM 4438

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)	Μυκήλιο (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)
C10:0	0.41±0.01 ^a	0.21±0.01 ^b
C11:0	-	0.09±0.01
C12:0	0.10±0.01 ^a	0.08±0.01 ^b
C14:0	0.69±0.01 ^a	0.76±0.01 ^b
C14:1	0.16±0.01	-
iso-C15:0	0.17±0.01	-
C15:0	2.22±0.01	-
C15:1ω-5	0.68±0.01 ^a	0.43±0.01 ^b
C16:0	15.42±0.05 ^a	34.13±0.10 ^b
iso-C16:0	0.62±0.01 ^a	2.42±0.01 ^b
C16:1ω-9 <i>cis</i>	0.48±0.01 ^a	0.21±0.01 ^b
cyclo-C17:0	0.24±0.01	-
C17:0	0.67±0.01 ^a	0.12±0.01 ^b
C17:1ω-7 <i>cis</i>	0.76±0.01	-
C18:0	2.37±0.03 ^a	5.74±0.06 ^b
C18:1ω-9 <i>cis</i>	14.11±0.14 ^a	37.53±0.38 ^b
C18:1ω-7 <i>cis</i>	0.96±0.01	-
C18:2ω-6 <i>cis</i>	55.51±0.54 ^a	15.98±0.16 ^b
C18:3ω-6 <i>cis</i>	0.38±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b
C18:3ω-3 <i>cis</i>	0.91±0.01 ^a	0.17±0.01 ^b
C18:4ω-3 <i>cis</i>	0.08±0.01	-
C19:0	0.31±0.01 ^a	0.55±0.01 ^b
C20:0	0.15±0.01 ^a	0.51±0.01 ^b
C20:1ω-9 <i>cis</i>	0.79±0.01	-
C20:2ω-6 <i>cis</i>	0.13±0.01	-
C20:4ω-6 <i>cis</i>	0.55±0.01 ^a	0.03±0.01 ^b
C20:5ω-3 <i>cis</i>	-	0.24±0.01
C22:5ω-6 <i>cis</i>	0.62±0.01 ^a	0.56±0.01 ^b
C24:0	0.17±0.01	-
C22:6ω-3 <i>cis</i>	0.37±0.01	-
C24:1ω-9 <i>cis</i>	-	0.02±0.01
SFA (Σω:0)	23.52±0.09 ^a	44.61±0.19 ^b
MUFA (Σω:1)	17.94±0.17 ^a	38.18±0.37 ^b
PUFA (Σω:n)	58.54±0.57 ^a	17.21±0.17 ^b
PUFA/SFA	2.49±0.01 ^a	0.39±0.01 ^b
MUFA/SFA	0.76±0.01 ^a	0.86±0.01 ^b
Σω:3	1.37±0.02 ^a	0.41±0.01 ^b
Σω:6	57.18±0.56 ^a	16.80±0.16 ^b
ω-6/ω-3	41.86±0.01 ^a	40.77±0.10 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά, ($P<0.05$)

Ακόμα, η βυθισμένη καλλιέργεια του Βασιδιομύκητα στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να επηρέασαν και τις συγκεντρώσεις του α - και γ - λινολενικού οξέος, αφού στο μυκήλιο μειώθηκε σημαντικά ($P<0.05$) η συγκέντρωσή τους σε σχέση με το καρπόσωμα. Επίσης το EPA (C20:5 ω -3 *cis*) αν και δεν ανιχνεύτηκε στο καρπόσωμα, ανακτήθηκε στο μυκήλιο, σε αντίθεση με το DHA (C22:6 ω -3 *cis*) που δεν ανιχνεύτηκε στο μυκήλιο, παρά την παρουσία του στο αντίστοιχο καρπόσωμα. Πάντως, χαμηλές συγκεντρώσεις των παραπάνω λιπαρών οξέων έχουν αναφερθεί και για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων (Barros et al. 2008, Ribeiro et al. 2009). Επιπροσθέτως, ανιχνεύτηκε και στις δύο δομές του *P. ostreatus* το διατροφικά πολύτιμο αραχιδονικό οξύ (C20:4 ω -6 *cis*), το οποίο όμως μειώθηκε σημαντικά ($P<0.05$) με τη βυθισμένη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

Πίνακας 5.7. Αθροίσματα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA, PUFA, TFA, $\Sigma\omega$:3, $\Sigma\omega$:6) εκφρασμένα ως mg /100 g μη πολικών λιπιδίων και του ξηρού καρποσώματος και του μυκηλίου του *P. ostreatus* (ATHUM 4438)

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)	Μυκήλιο (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)
SFA ($\Sigma\omega$:0)	17.86 \pm 0.07 ^a	38.63 \pm 0.17 ^b
MUFA ($\Sigma\omega$:1)	13.62 \pm 0.13 ^a	33.07 \pm 0.33 ^b
PUFA ($\Sigma\omega$:n)	44.00 \pm 0.44 ^a	14.90 \pm 0.14 ^b
TFA	75.48 \pm 0.23 ^a	86.60 \pm 0.15 ^b
$\Sigma\omega$:3	1.00 \pm 0.01 ^a	0.36 \pm 0.01 ^b
$\Sigma\omega$:6	43.41 \pm 0.42 ^a	14.54 \pm 0.14 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι \pm SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Επίσης αξίζει να αναφερθεί όπως διακρίνεται και από τον Πιν. 5.6 ότι τα παρακάτω λιπαρά οξέα ενώ ανιχνεύτηκαν στο καρπόσωμα του *P. ostreatus*, όταν αυτό αναπτύχθηκε σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα δεν ανιχνεύτηκαν. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι τα: C14:1, iso-C15:0, C17:1 ω -7 *cis*, C18:1 ω -7 *cis*, C18:4 ω -3 *cis*, C20:1 ω -9 *cis*, C20:2 ω -6 *cis* και C24:0.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα επηρέασε τα ποσοστά των λιπαρών οξέων τα οποία ανιχνεύτηκαν στο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμα, αφού σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ($P<0.05$) μεταξύ των

ποσοστών των λιπαρών οξέων μεταξύ των δύο δομών. Το γεγονός αυτό πιθανόν να αποδίδεται στο διαφορετικό υλικό που αναλύθηκε (καρπόσωμα/μυκήλιο) αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν.

Το στέλεχος ATHUM 4438 του *P. ostreatus* που μελετήθηκε, όπως φαίνεται και από το προφίλ των λιπαρών οξέων για το καρπόσωμά του, είναι πλούσιο σε UFA, αφού το ποσοστό τους βρέθηκε 76.48 % του συνόλου των λιπαρών οξέων (Πιν. 15). Εξάλλου είναι γνωστό ότι τα UFA επικρατούν σε σχέση με τα SFA σε πολλά είδη ανώτερων Βασιδιομυκήτων που ανήκουν ταξονομικά σε διάφορες οικογένειες, μεταξύ των οποίων η οικογένεια Tricholomataceae, που ανήκει και το γένος *Pleurotus* (Barros et al. 2007b, Diéz & Alvarez 2001, Kavishree et al. 2008, Mauger et al. 2003, Ribeiro et al. 2009). Μάλιστα συγκεκριμένα οι Pedneault et al. (2007) ανέφεραν ότι τα UFA για το είδος *P. ostreatus* κυμαίνονται από 77.1-81.1% του συνόλου των λιπαρών οξέων ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης του Βασιδιομύκητα. Οι Βασιδιομύκητες προσαρμόζονται πάντως εύκολα στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξής τους λόγω του υψηλού περιεχόμενου τους σε UFA, ενώ παράλληλα έχει διαπιστωθεί ότι τα UFA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της λιγνίνης από αυτούς τους μύκητες (Dart & Stretton 1976, Gutiérrez et al. 2002).

Η βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα επέφερε 50% σχεδόν αύξηση στο ποσοστό των SFA, σε σχέση το αντίστοιχο ποσοστό που περιέχεται στο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμά του. Το αποτέλεσμα είναι η σημαντική μείωση των UFA που περιέχονται στο μυκήλιο σε σχέση με του καρποσώματος. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ενώ για το καρπόσωμα το ποσοστό των UFA ανήλθε στα 76.48%, στο μυκήλιο το αντίστοιχο ποσοστό βρέθηκε 55.39%, με συνέπεια ο λόγος UFA/SFA από 3.20 που σημειώθηκε στο καρπόσωμα, να μειωθεί στην τιμή 1.24 στο μυκήλιο. Η παρατηρούμενη αύξηση των SFA και μείωση των UFA στο μυκήλιο σε σχέση με του καρποσώματος, έχει αναφερθεί και από τους Hadar & Cohen-Arazi (1986) για το ίδιο είδος. Για λόγους σύγκρισης με τη βιβλιογραφία, οι Kavishree et al. (2008) ανέφεραν τιμές του λόγου UFA/SFA 2.98 και 2.69 για τα καρποσώματα των *P. djamon* και *P. sajor-caju*, αντίστοιχα, που είναι λίγο μικρότεροι από τον αντίστοιχο λόγο που προέκυψε για το καρπόσωμα του μελετώμενου στελέχους του *P. ostreatus*. Επιπλέον, όπως γίνεται φανερό από τους λόγους PUFA/SFA και MUFA/SFA που παρουσιάζονται στον Πιν. 15, το καρπόσωμα του *P. ostreatus* περιείχε σημαντικά ($P < 0.05$) υψηλότερο ποσοστό PUFA που το οφείλει βεβαίως στην κύρια παρουσία του λινελαϊκού οξέος,

σε αντίθεση με το μυκήλιο που περιέχει σημαντικό υψηλότερο ποσοστό MUFA λόγω της υψηλής αναλογίας του ελαϊκού οξέος στο σύνολο των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν.

Πίνακας 5.8 Προφίλ λιπαρών οξέων εκφρασμένο ως mg/100 g μη πολικών λιπιδίων του ξηρού καρποσώματος και του μυκηλίου του *P. ostreatus* ATHUM 4438

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)	Μυκήλιο (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)
C10:0	0.31±0.01 ^a	0.18±0.01 ^b
C11:0	-	0.08±0.01
C12:0	0.08±0.01 ^a	0.07±0.01 ^b
C14:0	0.52±0.01 ^a	0.66±0.01 ^b
C14:1	0.12±0.01	-
iso-C15:0	0.13±0.01	-
C15:0	1.69±0.01	-
C15:1ω-5	0.52±0.01 ^a	0.37±0.01 ^b
C16:0	11.70±0.03 ^a	29.56±0.09 ^b
iso-C16:0	0.47±0.01 ^a	2.10±0.01 ^b
C16:1ω-9 <i>cis</i>	0.36±0.01 ^a	0.18±0.01 ^b
cyclo-C17:0	0.18±0.01 ^a	-
C17:0	0.51±0.01 ^a	0.10±0.01 ^b
C17:1ω-7 <i>cis</i>	0.58±0.01	-
C18:0	1.80±0.02 ^a	4.97±0.05 ^b
C18:1ω-9 <i>cis</i>	10.71±0.11 ^a	32.50±0.33 ^b
C18:1ω-7 <i>cis</i>	0.73±0.01	-
C18:2ω-6 <i>cis</i>	42.14±0.40 ^a	13.83±0.13 ^b
C18:3ω-6 <i>cis</i>	0.29±0.01 ^a	0.19±0.01 ^b
C18:3ω-3 <i>cis</i>	0.69±0.01 ^a	0.15±0.01 ^b
C18:4ω-3 <i>cis</i>	0.06±0.01	-
C19:0	0.24±0.01 ^a	0.48±0.01 ^b
C20:0	0.11±0.01 ^a	0.44±0.01 ^b
C20:1ω-9 <i>cis</i>	0.60±0.01	-
C20:2ω-6 <i>cis</i>	0.09±0.01	-
C20:4ω-6 <i>cis</i>	0.42±0.01 ^a	0.03±0.01 ^b
C20:5ω-3 <i>cis</i>	-	0.21±0.01
C22:5ω-6 <i>cis</i>	0.47±0.01 ^a	0.49±0.01 ^b
C24:0	0.13±0.01 ^a	-
C22:6ω-3 <i>cis</i>	0.28±0.01 ^a	-
C24:1ω-9 <i>cis</i>	-	0.02±0.01

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά ($P<0.05$)

Στον Πιν. 5.7 παρουσιάζονται τα αθροίσματα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA, PUFA, TFA, Σω:3, Σω:6) εκφρασμένα ως mg/100g των μη πολικών λιπιδίων και για τις δύο δομές του *P.*

ostreatus, ενώ στον Πιν. 5.8 για κάθε λιπαρό οξύ ξεχωριστά. Το σύνολο των περιεχόμενων λιπαρών οξέων στο μυκήλιο του *P. ostreatus* φαίνεται να αυξήθηκαν σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με του καρποσώματος, προφανώς λόγω του αυξανόμενου ποσού λίπους που ανακτήθηκε με τη βυθισμένη καλλιέργεια του Βασιδιομύκητα στο βιοαντιδραστήρα.

Πίνακας 5.9 Προφίλ των επικρατέστερων λιπαρών οξέων εκφρασμένο ως mg /100 g ξηρού καρποσώματος και μυκηλίου του *P. ostreatus* ATHUM 4438

Λιπαρά Οξέα	Καρπόσωμα (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)	Μυκήλιο (<i>P. ostreatus</i> ATHUM 4438)
C16:0	0.16±0.01 ^a	1.24±0.01 ^b
C18:0	0.03±0.00 ^a	0.21±0.01 ^b
C18:1ω-9 <i>cis</i>	0.15±0.01 ^a	1.36±0.01 ^b
C18:2ω-6 <i>cis</i>	0.59±0.01 ^a	0.58±0.01 ^a
SFA (Σω:0)	0.25±0.01 ^a	1.62±0.01 ^b
MUFA (Σω:1)	0.19±0.01 ^a	1.39±0.01 ^b
PUFA (Σω:n)	0.62±0.01 ^a	0.63±0.01 ^a
Σω:3	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
Σω:6	0.61±0.01 ^a	0.61±0.01 ^a
TFA	1.06±0.01 ^a	3.64±0.03 ^b

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι ±SD, n=3

Οι μέσοι της ίδιας σειράς του πίνακα που φέρουν διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά, ($P < 0.05$)

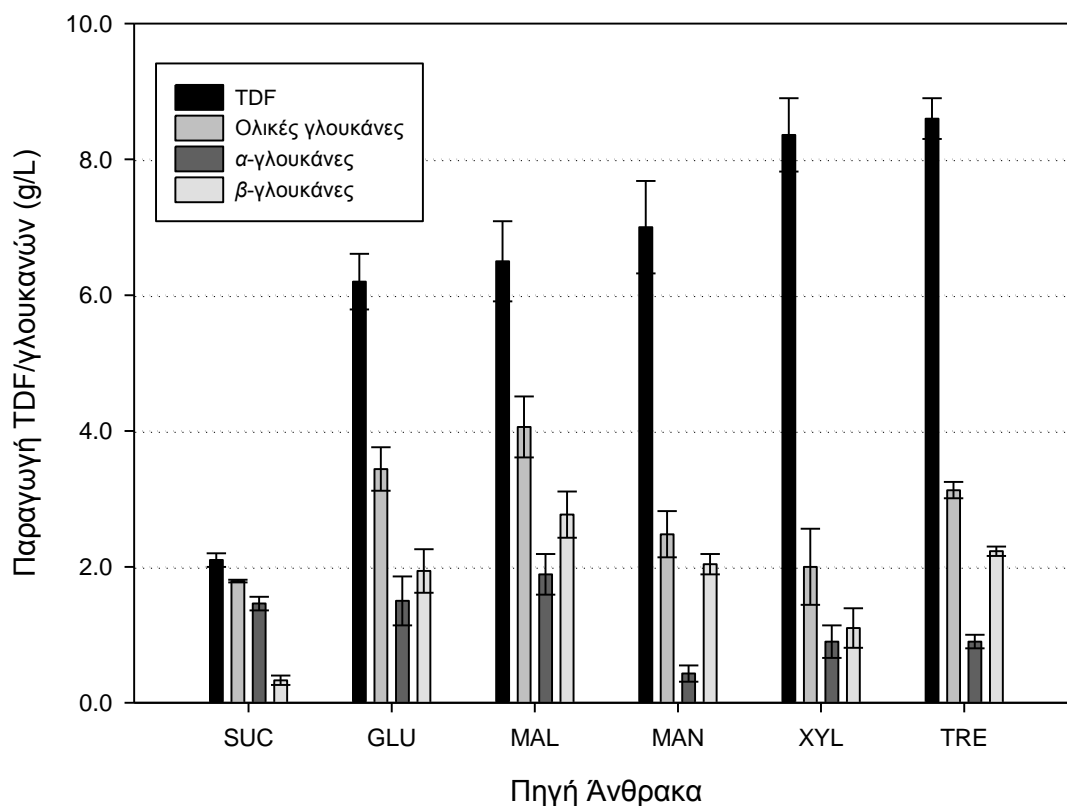
Στον Πιν. 5.9 παρουσιάζονται τα mg λιπαρών οξέων ανά 100 g ξηρής βιομάζας του καρποσώματος και του μυκηλίου του *P. ostreatus*, καθώς από διατροφικής απόψεως τα λιπαρά οξέα εκφρασμένα ανά g βιομάζας (μυκηλίου ή καρποσώματος) παρέχουν πιο χρήσιμες πληροφορίες. Συγκρίνοντας τους δύο διαφορετικούς τρόπους ανάπτυξης του *P. ostreatus*, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η διεργασία βυθισμένης καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα άσκησε σημαντική επίδραση στο συνολικό περιεχόμενο λίπος αλλά και στο προφίλ των λιπαρών οξέων που ανακτήθηκαν από την καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα (φυσικά απαντώμενο καρπόσωμα). Αξιοσημείωτες διαφορές παρατηρήθηκαν στις σχετικές ποσότητες των SFA και MUFA ανάμεσα στο καρπόσωμα και στο μυκήλιο του *P. ostreatus*. Συγκεκριμένα, οι ποσότητες SFA και MUFA αυξήθηκαν ανά 100 g ξηρής βιομάζας περισσότερο από 6 και 7 φορές αντίστοιχα στο μυκήλιο.

Η χρήση της διεργασίας βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να επηρέασε και τον λόγο ελαϊκό / λινολεϊκό οξύ (C18:1ω-9 *cis*/C18:2ω-6 *cis*) που είναι χρήσιμος για την ταξονομική διαφοροποίηση ειδών στο ίδιο γένος (Kavishree et al. 2008), καθώς αυξήθηκε σημαντικά (περίπου κατά 9 φορές) σε σχέση με τον αντίστοιχο που υπολογίστηκε για το καρπόσωμα.

5.10 Επίδραση των πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής άνθρακα στη παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε βυθισμένες καλλιέργειες που έλαβαν χώρο σε φιάλες, μελετήθηκαν τα σάκχαρα ξυλόζη, γλυκόζη, τρεχαλόζη, μαλτόζη, μαννόζη και σακχαρόζη τα οποία από τα προηγούμενα πειράματα αξιολόγησης σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες μικρής κλίμακας για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη, είχαν σαν αποτέλεσμα την υψηλότερη απόδοση ξηρής βιομάζας (>15 g/L) (βλ. παρ. 5.3).

Στο Γραφ. 5.11 παρουσιάζεται η απόδοση σε διαιτητικές ίνες και γλουκάνες εκφρασμένη σε g/L υγρής καλλιέργειας, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές μέγιστης παραγωγής βιομάζας που αντιστοιχεί για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα (βλ. παρ. 5.3). Όπως διαπιστώνεται, καταλληλότερες πηγές άνθρακα κρίνονται η τρεχαλόζη και η ξυλόζη με παραγωγή διαιτητικών ινών 8.6 ± 0.30 g/L και 8.36 ± 0.54 g/L, αντίστοιχα. Γενικότερα, έχει αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες ότι η χρήση πολυμερών σακχάρων (δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες) σε σχέση με μονοσακχαρίτες ως πηγές άνθρακα σε βυθισμένες καλλιέργειες των ανώτερων μυκήτων προωθεί την παραγωγή πολυσακχαριτών, γεγονός που πιθανόν να αποδίδεται στην ευκολία τους για πολυμερισμό (Fan et al. 2007). Για συγκριτικούς ρόλους, να αναφερθεί ότι η γλυκόζη και η φρουκτόζη κρίθηκαν καταλληλότερες πηγές άνθρακα για άριστη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *P. florida* (Burns et al. 1994) και το *P. citrinopileatus* (Wu et al. 2008), αντίστοιχα. Σε αντιδιαστολή, οι Jia et al. (2007) ανέφεραν τη μαλτόζη ως καταλληλότερη πηγή άνθρακα για ταυτόχρονη μέγιστη παραγωγή βιομάζας και εξωπολυσακχαριτών από το *P. nebrodensis* σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα είδη του γένους *Pleurotus* αξιοποιούν αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα σακχάρων για μέγιστη παραγωγή πολυσακχαριτών. Το ποσοστό διαιτητικών ινών στο μυκήλιο που παράχτηκε με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα την τρεχαλόζη ή τη ξυλόζη βρέθηκε 41.30% και 35.23%, (σε βάση % (w/w) του ξηρού μυκηλίου), αντίστοιχα.



Γράφημα 5.11 Μέγιστη παραγωγή διαιτητικών ινών (TDF) και ολικών γλουκανών (α -και β -γλουκανών) σε g/L σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* ATHUM 4438 δοκιμάζοντας διαφορετικές πηγές άνθρακα (TRE: τρεχαλόζη, MAN: μαννόζη, MAL: μαλτόζη, GLU: γλυκόζη, XYL: ξυλόζη και SUC: σουκρόζη). Το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε περιείχε CSL (37 g/L), K_2HPO_4 (1.0 g/L) και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g/L). Οι πηγές άνθρακα προστέθηκαν σε συγκέντρωση 57 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και σε συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28 \pm 2$ °C. Η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών εκφράζεται σε ξηρή βάση

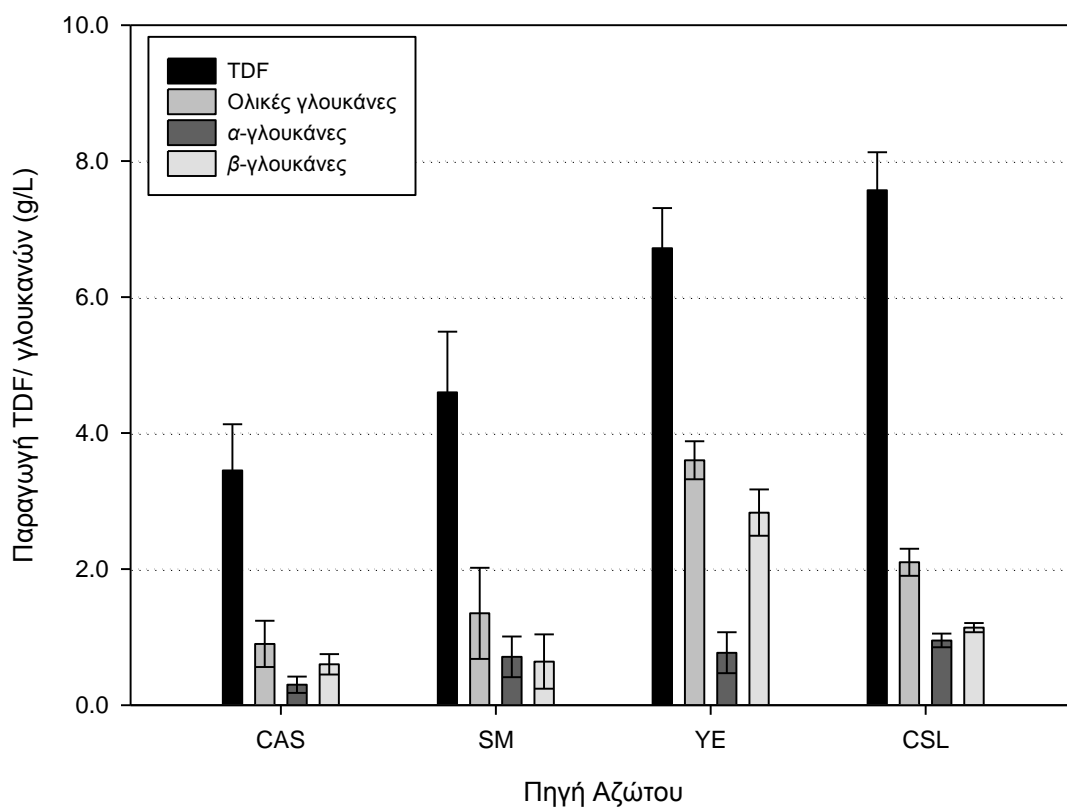
Στο ίδιο γράφημα παρουσιάζεται η παραγωγή σε ολικές, α -και β -γλουκάνες εκφρασμένες σε g/L υγρής καλλιέργειας του μελετώμενου Βασιδιομύκητα για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα. Όπως διαπιστώνεται υψηλότερη παραγωγή ολικών γλουκανών παρατηρήθηκε για το μέσο ανάπτυξης με τη μαλτόζη με απόδοση 4.06 ± 0.45 g/L, ενώ ακολουθεί κατά σειρά το μέσο με τη γλυκόζη (3.44 ± 0.45 g/L). Έτσι, ενώ η ξυλόζη και η τρεχαλόζη φάνηκε να ενθαρρύνουν την παραγωγή διαιτητικών ινών όπως διαπιστώθηκε προηγουμένως, η παραγωγή ολικών γλουκανών βρέθηκε κατά 51% και 24% χαμηλότερη αντίστοιχα για τα παραπάνω σάκχαρα, σε σχέση με αυτή χρησιμοποιώντας μαλτόζη στο μέσο

ανάπτυξης. Ίσως, η ξυλόζη και η τρεχαλόζη να προάγουν την παραγωγή χιτίνης εις βάρος της παραγωγής γλουκανών, βασιζόμενοι στο ότι οι διαιτητικές ίνες συνιστώνται από μη-εύπεπτους υδατάνθρακες, και κυρίως χιτίνη (Vetter 2007). Το ποσοστό δε των ολικών γλουκανών επί του συνόλου των διαιτητικών ινών για την περίπτωση της μαλτόζης, της γλυκόζης και της τρεχαλόζης βρέθηκε 61.94%, 55.40% και 37.01%, αντίστοιχα. Παράλληλα, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι σε όλα τα δοκιμαζόμενα μέσα με εξαίρεση αυτό που περιείχε ως πηγή άνθρακα τη σουκρόζη, παράχτηκε αναλογικά υψηλότερη συγκέντρωση β-γλουκανών σε σχέση με τις α-γλουκάνες. Από την συγκεκριμένη μελέτη ακόμα, συμπεραίνεται πάντως ότι η μαλτόζη σε σχέση με τα άλλα δοκιμαζόμενα σάκχαρα κρίνεται καταλληλότερη για μέγιστη παραγωγή των διατροφικά πολύτιμων β-γλουκανών (2.77 ± 0.34 g/L). Αξίζει να αναφερθεί ότι το μυκήλιο που προήλθε από τη διεργασία της βυθισμένης καλλιέργειας με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα τη μαλτόζη, τη γλυκόζη ή την τρεχαλόζη βρέθηκε να περιέχει 20.40%, 16.29% και 15.26% ολικές γλουκάνες (σε βάση % (w/w) του ξηρού βάρους), αντίστοιχα.

Για την μελέτη της επίδρασης της πηγής αζώτου στην παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών από το στέλεχος ATHUM 4438 του *P. ostreatus* σε βυθισμένες καλλιέργειες, μελετήθηκαν οι σύνθετες πηγές αζώτου CSL, SM, YE, και CAS οι οποίες από τα προηγούμενα πειράματα αξιολόγησης σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες μικρής κλίμακας για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη, έδωσαν υψηλότερη απόδοση ξηρής βιομάζας (>15 g/L) (βλ. παρ. 5.4).

Στο Γραφ. 5.12 παρουσιάζεται η απόδοση σε διαιτητικές ίνες εκφρασμένη σε g/L υγρής καλλιέργειας, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές μέγιστης παραγωγής βιομάζας που αντιστοιχεί για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή αζώτου (βλ. παρ. 5.4). Όπως διακρίνεται, καταλληλότερη πηγή αζώτου για παραγωγή διαιτητικών ινών από το μελετώμενο στέλεχος Βασιδιομύκητα κρίνεται το CSL με απόδοση 7.57 ± 0.56 g/L και ακολουθεί κατά σειρά το YE με αντίστοιχη απόδοση 6.52 ± 0.59 g/L. Παρομοίως, οι Kim et al. (2006) στην μελέτη τους πρότειναν το CSL για μέγιστη παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από το *G. resinaceum* σε συνθήκες υγρής βυθισμένης καλλιέργειας. Ωστόσο, καλύτερες πηγές αζώτου για μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη και παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από άλλα είδη του γένους *Pleurotus* (*P. citrinopileatus* και *P. nebrodensis*) αποδείχτηκαν η σκόνη ζύμης με πεπτόνη (yeast peptone powder) και το YE αντίστοιχα (Jia et al. 2007, Wu et al. 2008). Γενικότερα, η προτίμηση σύνθετων πηγών αζώτου για μυκηλιακή ανάπτυξη και παραγωγή πολυσακχαριτών φανερώνουν την παρουσία πρωτεολυτικού μηχανισμού για την υδρόλυση πρωτεϊνών κατά τη διεργασία ζύμωσης των ανώτερων μυκήτων, καθώς είναι γνωστό ότι συγκεκριμένα απαραίτητα αμινοξέα δεν είναι

δυνατό να συντεθούν από απλές ανόργανες πηγές αζώτου (Hwang et al. 2004). Αξιοσημείωτο είναι ότι το μυκήλιο που προήλθε από τη διεργασία της βυθισμένης καλλιέργειας με χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου το YE ή το CSL περιείχε 39.25% και 32.40% διαιτητικές ίνες (σε βάση % (w/w) του ξηρού βάρους), αντίστοιχα.



Γράφημα 5.12 Μέγιστη παραγωγή διαιτητικών ινών (TDF) και ολικών γλουκανών (α-και β-γλουκανών) σε g/L σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* ATHUM 4438 δοκιμάζοντας διαφορετικές πηγές αζώτου (CSL: εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού, YE: εκχύλισμα ζύμης, SM: αλεσμένη σόγια και CAS: υδρολυμένη καζεΐνη). Το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε περιείχε ξυλόζη (57 g/L), K_2HPO_4 (1.0 g/L) και $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g/L). Οι πηγές αζώτου προστέθηκαν σε συγκέντρωση 17g/L, εκτός από το CSL (37g/L). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστήριο, σε διπλές φιάλες για κάθε δοκιμαζόμενη πηγή άνθρακα και υπό συνθήκες σκότους, ανάδευσης (220 rpm) και θερμοκρασίας $T=28 \pm 2^\circ C$. Η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών εκφράζεται σε ξηρή βάση

Σχετικά με το περιεχόμενο σε ολικές, α-και β- γλουκάνες εκφρασμένες σε g/L υγρής καλλιέργειας όπως διαπιστώνεται από το ίδιο γράφημα, σημαντικά υψηλότερη παραγωγή

ολικών γλουκανών παρατηρήθηκε για το ΥΕ με απόδοση 3.6 ± 0.28 g/L και μάλιστα οι β-γλουκάνες φάνηκε να υπερέχουν κατά 72% σε σχέση με τις α-γλουκάνες. Μάλιστα η χρήση του ΥΕ, είχε ως αποτέλεσμα σχεδόν διπλάσια παραγωγή ολικών γλουκανών σε σύγκριση με αυτή που σημειώθηκε για το CSL. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει ότι το ΥΕ ενθάρρυνε περισσότερο την παραγωγή γλουκανών παρά τη συσσώρευση χιτίνης. Σε σχέση και με τις άλλες αζωτούχες πηγές που δοκιμάστηκαν, το ΥΕ συνέβαλλε στο μέγιστο επίπεδο παραγωγής των βιολογικά ενεργών β-γλουκανών (2.83 ± 0.34 g/L). Σε σύγκριση μάλιστα με το CSL το οποίο έδωσε υψηλότερη παραγωγή διαιτητικών ινών όπως αναφέρθηκε, η χρήση του ΥΕ στο μέσο ανάπτυξης οδήγησε σε σχεδόν 60% υψηλότερη παραγωγή β-γλουκανών, αποδεικνύοντας έτσι την ωφέλιμη επίδραση που έχει αυτή η αζωτούχα πηγή στην παραγωγή των χρήσιμων αυτών πολυσακχαριτών από ιατροφαρμακευτική άποψη. Το μυκήλιο του *P. ostreatus* βρέθηκε να περιέχει 21.40% και 8.98% ολικές γλουκάνες (σε βάση % (w/w) του ξηρού βάρους) με χρησιμοποιούμενη πηγή αζώτου στη βιοδιεργασία το ΥΕ και το CSL, αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω, η μαλτόζη και το ΥΕ τελικά κρίνονται οι καταλληλότερες πηγές άνθρακα και αζώτου μεταξύ αυτών που δοκιμάστηκαν, για υψηλή παραγωγή διαιτητικών ινών αλλά και των βιολογικά ενεργών β-γλουκανών από το *P. ostreatus* ATHUM 4438 σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας.

Τέλος, αν συγκριθούν οι αποδόσεις των παραπάνω βιολογικά ενεργών πολυσακχαριτών που ανακτήθηκαν μεταξύ της βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα (βλ. παρ. 5.8), και των φιαλών, δεδομένου ότι το μέσο ανάπτυξης έχει την ίδια σύσταση και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής των διαιτητικών ινών και των ολικών γλουκανών περίπου κατά 40.5% και 35.8 % αντίστοιχα στο βιοαντιδραστήρα σε σχέση με την αντίστοιχη παραγωγή στις φιάλες (σύγκριση των αποδόσεων σε βάση % (w/w) του ξηρού μυκηλίου). Είναι πιθανόν οι ελεγχόμενες συνθήκες που επικρατούν στο βιοαντιδραστήρα σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες αερισμού να ευθύνονται για την υψηλότερη παραγωγή αυτών των βιοενεργών πολυσακχαριτών από το *P. ostreatus*. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από τους Lee et al. (2009) που διαπίστωσαν ότι ο αερισμός αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ελέγχου για υψηλή παραγωγή πολυσακχαριτών από τον Ασκομύκητα *Cordyceps takaomontana*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ *G. australe* ATHUM 4345

6.1 Χρωματογραφικός Έλεγχος του προφίλ μεταβολιτών

Η ξηρή βιομάζα (36 g) που προέκυψε από την καλλιέργεια του *G. australe* ATHUM 4345 στο βιοαντιδραστήρα 20L εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc)-κυκλοεξάνιο (c-Hex) (1:3, v/v), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.1.2. Το λαμβανόμενο εκχύλισμα (LGT) υποβλήθηκε σε διαδικασία εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και προσδιορίστηκε το βάρος του (345.8 mg). Όπως συμπεραίνεται το εκχύλισμα που προέκυψε με τις συγκεκριμένες συνθήκες εκχύλισης που εφαρμόστηκαν, αναλογεί περίπου στο 1.0 % της ξηρής βιομάζας.

Στη συνέχεια, το LGT εκχύλισμα ελέγχθηκε σε χρωματογραφική πλάκα λεπτής στιβάδας (TLC) κανονικής φάσεως με παρατήρησή της σε λάμπα (UV) υπεριώδους ακτινοβολίας (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και εμφάνισή της μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 6.1). Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της πλάκας ήταν EtOAc / c-Hex, ενώ προστέθηκε στο σύστημα και 0.1% τριφθοροξικό οξύ (TFA).

EtOAc / c-Hex (1:3)



Εικόνα 6.1 Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για το LGT εκχύλισμα

Όπως διαπιστώθηκε από την παρατήρηση του χρωματογραφήματος TLC, το εκχύλισμα φαίνεται να είναι μείγμα πολλών ουσιών. Μάλιστα, διαπιστώνεται ότι είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα και παράγωγά τους, αφού σημειώθηκε κυρίως η παρουσία μορίων που δεν απορροφάνε στο UV, αλλά δίνουν σκούρο μπλε χρώμα μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

6.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του (LGT) ολικού εκχυλίσματος

Το LGT εκχύλισμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη γέλης πυριτίου με υποβοήθηση κενού (VLC). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μίγμα EtOAc / c-Hex (1:3 v/v) για όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Ο μέσος όγκος των κλασμάτων ήταν 15 mL. Παρελήφθησαν συνολικά 174 κλάσματα.

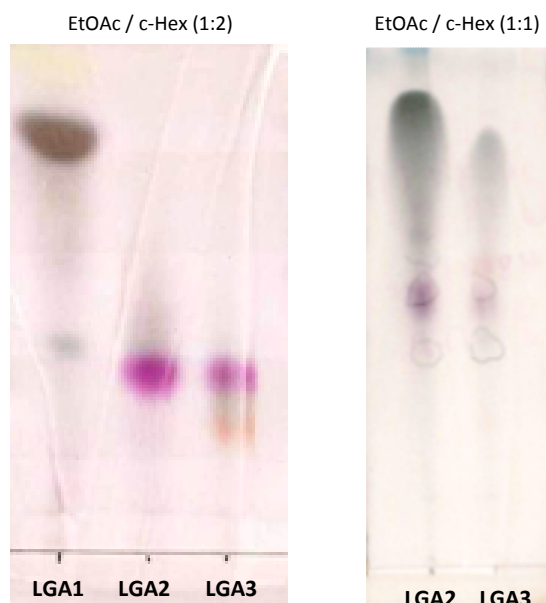
Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ύστερα από το χρωματογραφικό έλεγχο με TLC συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 3 ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν. 6.1. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συγκεντρωτική χρωματογραφία TLC με σκοπό να γίνει μια πρώτη εκτίμηση του προφίλ των ενώσεων που περιέχονταν στο εκχύλισμα και να αποφασιστεί η περαιτέρω ανάλυσή τους (Εικ. 6.2).

Πίνακας 6.1 Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του αρχικού εκχυλίσματος (LGT) με VLC

Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-113	LGA1	142.3
114-141	LGA2	118.4
142-174	LGA3	71.1

Όπως διαπιστώθηκε από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων TLC μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμαθειικής βανιλίνης και θέρμανση, και τα 3 κλάσματα που ανακτήθηκαν είναι μείγματα ουσιών, οι περισσότερες των οποίων δεν απορροφούσαν στο UV, αλλά χρωματίζονταν γκριζομπλέ, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται μάλλον για λιπαρά οξέα και παράγωγά τους (Εικ. 6.2).

Το κλάσμα LGA1 και LGA2 ανακτήθηκαν σε μεγαλύτερη συγκεντρώσεις και περιέχουν τα πιο άπολα συστατικά του εκχυλίσματος, σε αντίθεση με το κλάσμα LGA3 που ανακτήθηκε σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση και περιέχει τις περισσότερες πολικές ουσίες, που μάλιστα κάποιες φαίνεται ότι απορροφούν στο UV. Μάλιστα, αξίζει να αναφερθεί ότι στα κλάσματα LGA2 και LGA3 φαίνεται να περιέχονταν και μόρια που έδωσαν έντονους χρωματισμούς μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμαθειικής βανιλίνης και θέρμανση, χωρίς όμως να απορροφούσαν στο UV (Εικ. 6.2). Τελικά, αποφασίστηκε η περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση και των 3 κλασμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη του LGT εκχυλίσματος, με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των επιμέρους ενώσεων.



Εικόνα 6.2 Συγκεντρωτικά χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα LGA1-LGA3

6.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA1 κλάσματος

Το LGA1 κλάσμα υποβλήθηκε σε VLC για τον περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό του. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μείγμα EtOAc / c-Hex (1:2, v/v) για όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Ο μέσος όγκος των κλασμάτων ήταν 10 mL. Παρελήφθησαν συνολικά 120 κλάσματα.

Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ύστερα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 3 ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν. 6.2. Ακολούθησε συγκεντρωτική TLC χρησιμοποιώντας σύστημα ανάπτυξης EtOAc / c-Hex (1:2, v/v).

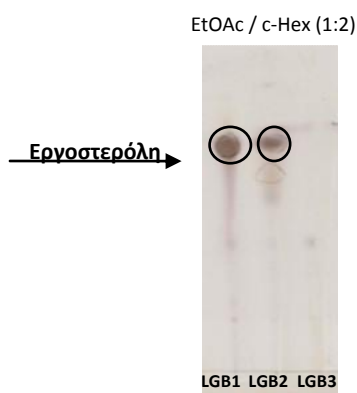
Ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι στο LGB1 κλάσμα περιέχονταν σχεδόν αποκλειστικά μία ουσία, η οποία δεν παρουσίασε απορρόφηση κατά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος με τη λυχνία UV, ενώ έδωσε σκούρο μπλε χρώση μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 6.3). Έτσι, αρχικά αντλήθηκε η πληροφορία ότι το κύριο προϊόν του κλάσματος LGB1 είναι κάποιο τερπενικό παράγωγο.

Πράγματι, μετά από φασματοσκοπική μελέτη του LGB1 κλάσματος, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), και σύγκριση με σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα (Jinming et al. 2001, Seckbach et al. 1993, Zhang,

G. et al. 2002) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την εργοστερόλη (εργοστα-5, 7, 22-τριεν-3β-όλη) (1). Η δομή του μορίου της εργοστερόλης παρουσιάζεται στην Εικ. 6.4.

Πίνακας 6.3 Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LGA1 κλάσματος με VLC

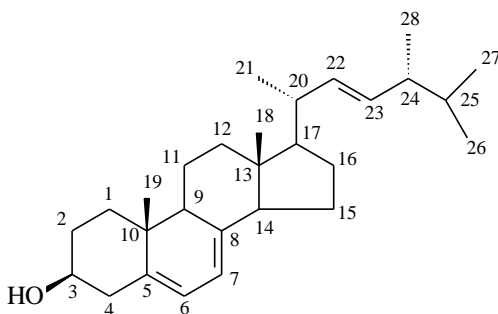
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-34	LGB1	68.0
45-47	LGB2	35.1
48-119	LGB3	12.3



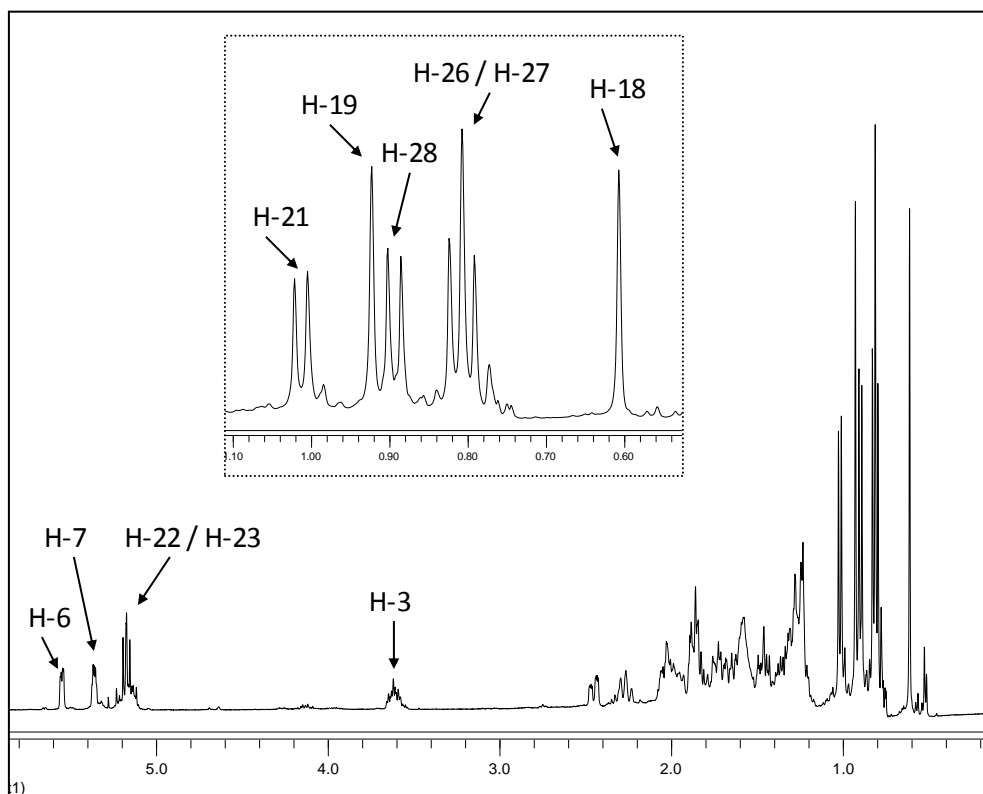
Εικόνα 6.3 Συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα LGB1-3

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλης (Εικ. 6.5) παρατηρήθηκαν έξι σήματα που αντιστοιχούν σε μεθύλια (ψηλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία). Τα τέσσερα από αυτά συνδέονται σε μεθινικούς άνθρακες και εμφανίζονται ως διπλές κορυφές και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-21 (δ 1.02 ppm, J = 6.7 Hz), H-28 (δ 0.91 ppm, J = 7.0 Hz), H-26 (δ 0.82 ppm, J = 6.7 Hz) και H-27 (δ 0.80 ppm, J = 6.5 Hz). Τα άλλα δύο σήματα εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 0.92 και 0.61 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-19 και H-18 που συνδέονται σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Η παρουσία των προαναφερόμενων σημάτων είναι ενδεικτική της ύπαρξης πυρήνα στερόλης στο μόριο (Yue et al. 2001). Επίσης, στην ολεφινική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται δύο χαρακτηριστικές διπλές-διπλών κορυφές στα 5.15 ppm (1H, *dd*, J = 15.2 / 7.8 Hz) και στα 5.21 ppm (1H, *dd*, J = 15.2 / 6.9 Hz). Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα μεθίλια των θέσεων 22 και 23, ενώ από τη σταθερά σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H-22 και H-23 (J = 15.2 Hz) φαίνεται ότι ο διπλός δεσμός στις θέσεις αυτές είναι *trans*. Τέλος, στην ίδια περιοχή εμφανίζονται δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.55 ppm και 5.36 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα μεθινικά πρωτόνια H-6 και H-7. Επίσης, το

μεθινικό πρωτόνιο της θέσης 3 συντονίζεται στα 3.50 ppm και δίνει μία πολλαπλή κορφή, λόγω της σύζευξης που παρουσιάζει με τα μεθυλενικά πρωτόνια των θέσεων 2 και 4. Στον Πιν. 6.3 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα της εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλης.



Εικόνα 6.4 Εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη (1)



Εικόνα 6.5 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλης (1) σε CDCl_3

Πίνακας 6.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλης (**1**) (CDCl₃)

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	1.85 / 1.68	38.3
2	1.80-1.55	29.7
3	3.50 (1H, <i>m</i>)	70.4
4	Ha 2.46 (1H, <i>m</i>)	40.7
	Hb 2.27 (1H, <i>m</i>)	
5	-	139.8
6	5.55 (1H, <i>brs</i>)	119.6
7	5.36 (1H, <i>brs</i>)	116.3
8	-	141.3
9	1.92	46.2
10	-	37.0
11	1.45-1.20	31.9
12	2.05 / 1.24	
13	-	42.8
14	1.89	54.5
15	1.45-1.20	22.9
16	1.65 / 1.45	28.3
17	1.24	55.6
18	0.61 (3H, <i>s</i>)	12.0
19	0.92 (3H, <i>s</i>)	16.3
20	2.00 (1H, <i>m</i>)	40.4
21	1.02 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.7 Hz)	21.5
22	5.15 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.2 / 7.8 Hz)	135.6
23	5.21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.2 / 6.9 Hz)	131.9
24	1.85	42.8
25	1.49	33.0
26	0.82 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.7 Hz)	19.9
27	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz)	19.6
28	0.91 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz)	17.6

Η εργοστερόλη είναι η πιο διαδεδομένη στερόλη στους μύκητες και αποτελεί δομικό και λειτουργικό συστατικό της κυτταρικής τους μεμβράνης (Mysyakina & Funtikova 2007). Έχει απομονωθεί και από άλλα είδη οργανισμών, όπως κυανοβακτήρια, φύκη, πρωτόζωα κ.ά. (Volkman 2003). Τα φυσικά τερπενοειδή στα οποία περιλαμβάνονται και οι στερόλες (π.χ. εργοστερόλη) βιοσυνθετικά προέρχονται από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MEV) που εδράζεται στο κυτταρόπλασμα/ ενδοπλασματικό δίκτυο (Newman & Chappell 1999) που οδηγεί στο σχηματισμό C5 μονάδων πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου (IDP) και του αλλυλικού ισομερούς του, που λέγεται πυροφωσφορικό διμεθαλλύλιο (DMADP). Τα μόρια αυτά αποτελούν τους βασικούς δομικούς λίθους βιοσύνθεσης όλων των τερπενίων. Το DMADP σχηματίζεται από τον ισομερισμό του IDP, τον οποίο καταλύει η ισομεράση του IDP. Και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα το IDP και το DMADP χρησιμοποιούνται από πρενυλ-τρανσφεράσες, που καταλύουν (1'- 4) 'κεφαλή προς ουρά' αντιδράσεις συμπύκνωσης, προς σχηματισμό μεγαλύτερων πυροφωσφορικών πρενυλίων. Συμπύκνωση ενός μορίου DMADP και δύο μορίων IDP από την πρενυλ-τρανσφεράση συνθετάση του πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (FDP) παράγει την πρόδρομο ένωση βιοσύνθεσης των σεσκιτερπενίων (C15), που είναι το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (Cane, 1999). Συμπύκνωση δύο μορίων FDP παράγει το σκουαλένιο, πρόδρομη ένωση των τριτερπενίων και των στερολών. Το IDP σχηματίζεται από το ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) μέσω του μεβαλονικού οξέος (MVA). Συμπύκνωση τριών μορίων ακετυλο-συνενζύμου Α σχηματίζει το 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρικό-συνενζύμο Α (HMGCoA). Το ένζυμο HMGR (αναγωγίαση του 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρικού-συνενζύμου Α), που καταλύει τη μετατροπή του HMG-CoA σε MVA, θεωρείται το ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί σε αυτό το μονοπάτι (Rodwell et al., 2000). Το MVA μετατρέπεται σε IDP από τη διαδοχική δράση των ενζύμων MVA κινάση, φωσφομεβαλονική κινάση και MVA διφωσφορική αποκαρβοξυλάση.

Η εργοστερόλη γενικά αποτελεί μία σημαντική χημική ένωση για τη φαρμακευτική βιομηχανία αφού είναι βιολογικός πρόδρομος της βιταμίνης D (Mysyakina & Funtikova 2007). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η εργοστερόλη και τα υπεροξειδία της, προβάλλουν πολλές φαρμακευτικές δράσεις, όπως ότι μειώνουν τον πόνο σε φλεγμονές, μειώνουν τη πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων (Bok et al. 1999, Yazawa et al. 2000, Takaku et al. 2001, Subbiah & Abplanalp 2003, Zaidman et al. 2005), είτε αναστέλλοντας άμεσα την αγγειογένεση (Takaku et al. 2001), είτε δρώντας ως αντιφλεγμονώδη και/ή ως αντιφλεγμονώδη (Zhang et al. 2003). Επίσης, μελέτες σε κύτταρα του

είδους *Candida albicans* έδειξαν ότι η εργοστερόλη ασκεί προστατευτική δράση στην κυτταρική μεμβράνη έναντι της βλάβης που προκαλείται από επιφανειοδραστικούς παράγοντες, όπως είναι οι σαπωνίνες (Leconte et al. 1997).

Στεροειδείς ενώσεις και παράγωγα της εργοστερόλης έχουν απομονωθεί και από καρποσώματα του *G. lucidum* (Ko et al. 2008, Rösecke & König 2000). Η εργοστερόλη και οι στεροειδείς εστέρες έχουν απομονωθεί όμως και από τα σπόρια του μύκητα (Yuan et al. 2007). Μάλιστα, είναι γνωστό το «λιπίδιο σπόρων *Ganoderma*» (γνωστό ως GSL, *Ganoderma* spore lipid), το οποίο έχει απομονωθεί από τα σπόρια του μύκητα και έχει εγκριθεί ως συμπλήρωμα διατροφής λόγω του σημαντικού περιεχόμενου του σε βιοενεργές ουσίες, όπως τριτερπενοειδή και στερόλες (Yuan et al. 2007). Οι Yuan et al. (2007), μελέτησαν τη διανομή ελεύθερων και εστεροποιημένων εργοστερολών στα διάφορα μέρη του μακρομύκητα *G. lucidum*, και κατέληξαν ότι τα επίπεδα ολικής εργοστερόλης στο στύπο, στον πύλο και στα σπόρια κυμαίνονταν μεταξύ των τιμών 0.8 και 1.6 mg / g. Μάλιστα το σχετικό ποσοστό της ελεύθερης και των εστεροποιημένης εργοστερόλης δεν ήταν το ίδιο στα διάφορα μέρη του καρποσώματος του μακρομύκητα. Παρόλο που η απομόνωση της εργοστερόλης από τα καρποσώματα του *G. australe* έχει αναφερθεί και στο παρελθόν από άλλους ερευνητές (Jain & Gurta 1984, León et al. 2003), αξίζει να αναφερθεί ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που σημειώνεται, σχετικά με την παραγωγή της από αυτόν το μακρομύκητα σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα.

6.2.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA2 κλάσματος

Το LGA2 κλάσμα για τον περεταίρω χρωματογραφικό διαχωρισμό του υποβλήθηκε σε VLC. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μείγμα EtOAc / c-Hex (1.3:1, v/v) για όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Ο μέσος όγκος των κλασμάτων ήταν 5 mL. Παρελήφθησαν συνολικά 80 κλάσματα.

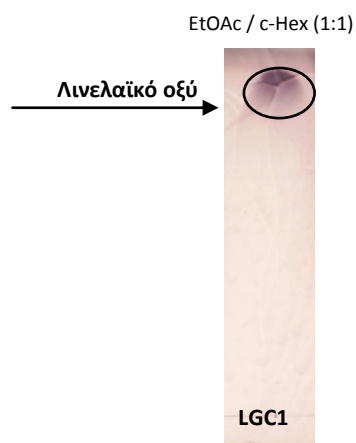
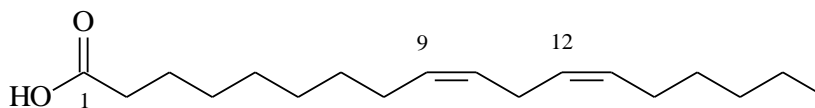
Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ύστερα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 3 ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν. 6.4. Ακολούθησε TLC με σύστημα ανάπτυξης EtOAc / c-Hex (1:1), έλεγχος με παρατήρηση σε λάμπα UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και εμφάνιση μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

Πίνακας 6.4 Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LGA2 κλάσματος με VLC

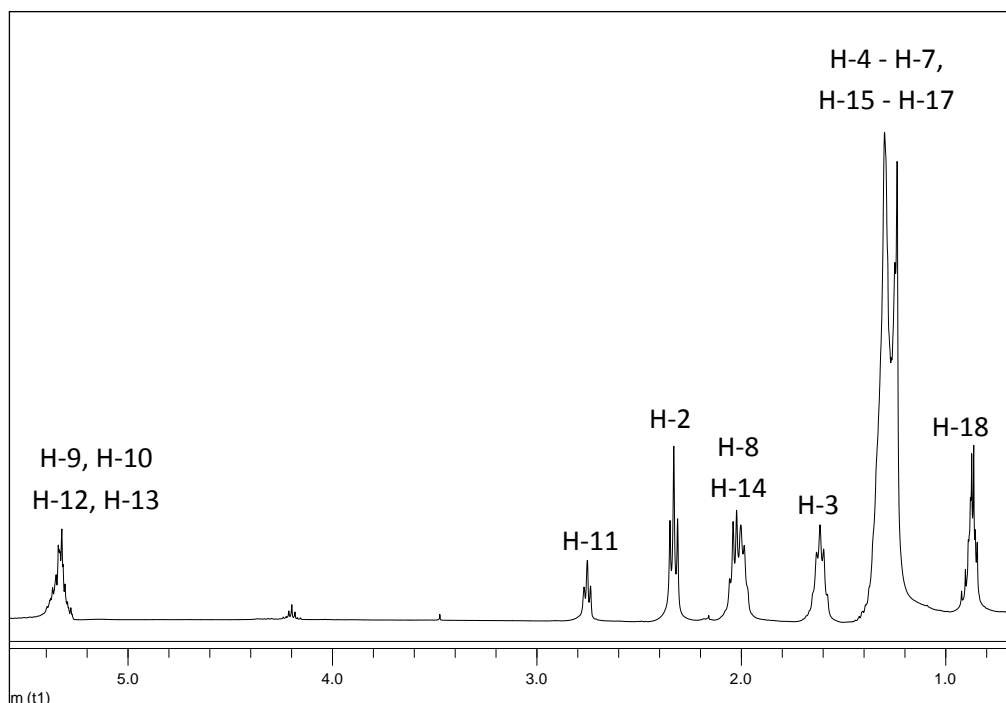
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-33	LGC1	70.0
34-63	LGC2	19.8
64-80	LGC3	11.2

Ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι στο LGC1 κλάσμα περιέχονταν αποκλειστικά μία ουσία, η οποία δεν απορροφούσε στα 254 nm αλλά έδωσε μπλε κηλίδα μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 6.6).

Οι παρατηρήσεις αυτές, καθώς και η μορφή των κηλίδας πάνω στο χρωματογράφημα, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κάποιο λιπαρό οξύ. Πράγματι, μετά από φασματοσκοπική μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 , και σύγκριση με τα φάσματα πρότυπης ουσίας από τη βιβλιοθήκη φασμάτων της Aldrich (FT-NMR spectra, Volume I) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το λινελαϊκό οξύ (**2**). Η δομή του μορίου παρουσιάζεται στην Εικ. 6.7.

**Εικόνα 6.6** Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης πλάκα για το προϊόν LGC1**Εικόνα 6.7** Λινελαϊκό οξύ (**2**)

Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 6.8) εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή στα 5.34 ppm που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί στα μεθίνια των θέσεων 9, 10, 12 και 13. Η κορυφή στα 2.32 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλениκά πρωτόνια της θέσης 2 και εμφανίζεται αποθωρακισμένη λόγω της παρουσίας του γειτονικού καρβοξυλίου. Η κορυφή του μεθυλενίου στη θέση 11 εμφανίζεται αρκετά αποθωρακισμένη στα 2.74 ppm λόγω των διπλών δεσμών στις θέσεις 9 και 12. Τα μεθυλениκά πρωτόνια της θέσης 3 συντονίζονται στα 1.60 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια). Επιπλέον, το σήμα στα 2.02 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια) αντιστοιχεί στα μεθυλениκά πρωτόνια των θέσεων 8 και 14, ενώ στην περιοχή 1.40-1.29 ppm παρατηρούνται τα σήματα των υπόλοιπων μεθυλενίων (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 14 πρωτόνια). Επίσης, η κορυφή του μεθυλίου στη θέση 18 εμφανίζεται ως τριπλή με $J=6.6$ Hz στα 0.86 ppm. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 6.5) δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις για όλα τα πρωτόνια και τους άνθρακες του μορίου.



Εικόνα 6.8 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ λινελαϊκού οξέος (**2**) σε CDCl_3

Πίνακας 6.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα λινελαϊκού οξέος (**2**) (CDCl₃)

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	
1	-	180.07	
2	2.32 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.8 Hz)	34.05	
3	1.60 (2H, <i>m</i>)	24.66	
8	2.02 (4H, <i>m</i>)	27.19	
14			
9	5.34 (4H, <i>m</i>)	130.16	
10		128.01	
12		127.84	
13		129.96	
11		25.63	
4	1.40 – 1.29 (14H, <i>m</i>)	29.58	
5		29.35	
6		29.14	
7		29.07	
15		29.03	
16		31.53	
17		22.58	
18		0.86 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	14.07

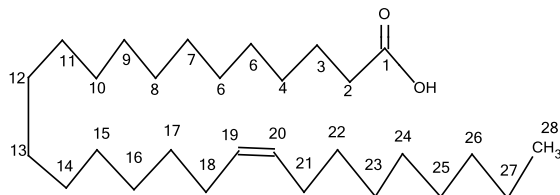
Το λινελαϊκό οξύ, που ανήκει στην οικογένεια των ω-6 λιπαρών, χημικά είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με 18 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα και δύο *cis* διπλούς δεσμούς, ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στο έκτο άτομο άνθρακα από το ωμέγα άκρο. Μαζί με το ω-3 αλινολενικό οξύ (ALA) εντάσσεται στα απαραίτητα λιπαρά οξέα που πρέπει να λαμβάνονται μέσω της τροφής, διότι ο ανθρώπινος οργανισμός δεν έχει την ικανότητα να τα συνθέσει. Το λινελαϊκό οξύ συναντάται στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης κυρίως σε έλαια φυτικής προέλευσης (π.χ. καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο κ.α). Αποτελεί πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση του

διατροφικού πολύτιμου αραχιδονικού οξέος και των εικοσανοειδών (π.χ. προσταγλαδίνες), τα οποία παίζουν πολύπλοκο ρυθμιστικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, επηρεάζοντας τα επίπεδα τριγλυκεριδίων καθώς και την αρτηριακή πίεση (Voet & Voet 2004). Ακόμα, έχει διαπιστωθεί ότι το λινελαϊκό οξύ δρα εναντίον της κυστικής ίνωσης (Vij 2010). Τέλος, χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή σαπουνιών και γαλακτωμάτων και γενικά στη βιομηχανία καλλυντικών, λόγω των ευεργετικών δράσεων που έχει στο δέρμα (δράση εναντίον της ακμής, των φλεγμονών και της ξηρότητας) (Darmstadt et al. 2002).

Σε πολλά διαφορετικά είδη Βασιδιομυκήτων το λινελαϊκό οξύ αποτελεί ένα από τα κυριότερα, αν όχι το επικρατέστερο λιπαρό οξύ (Barros et al. 2007b, León-Guzmán et al. 1997, Ribeiro et al. 2009, Yilmaz et al. 2006). Γενικότερα, αποτελεί πρόδρομη ουσία πτητικών συστατικών των μυκήτων, όπως είναι η 1-οκτεν-3-όλη, η 1-οκτεν-3-όνη, η 2-οκτενόλη και η 3-οκτανόνη, τα οποία αποτελούν τα κύρια αρωματικά συστατικά πολλών ειδών μυκήτων (Maga 1981). Σχετικά με το *G. australe* μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι το λινελαϊκό μαζί με το ελαϊκό οξύ είναι τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα (Martínez et al. 1991), γεγονός που επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη (βλ. παρ. 4.9).

6.2.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGC2 κλάσματος

Το κλάσμα LGC2 (19.8 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική TLC σε γυάλινη πλάκα με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Silica gel 60 F254. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε EtOAc / *c*-Hex (70:30, v/v). Μετά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος αποφασίσθηκε η λήψη μιας ουσίας (13.8 mg) που δεν παρουσίαζε απορρόφηση στο UV, ενώ χρωματίστηκε μπλε μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

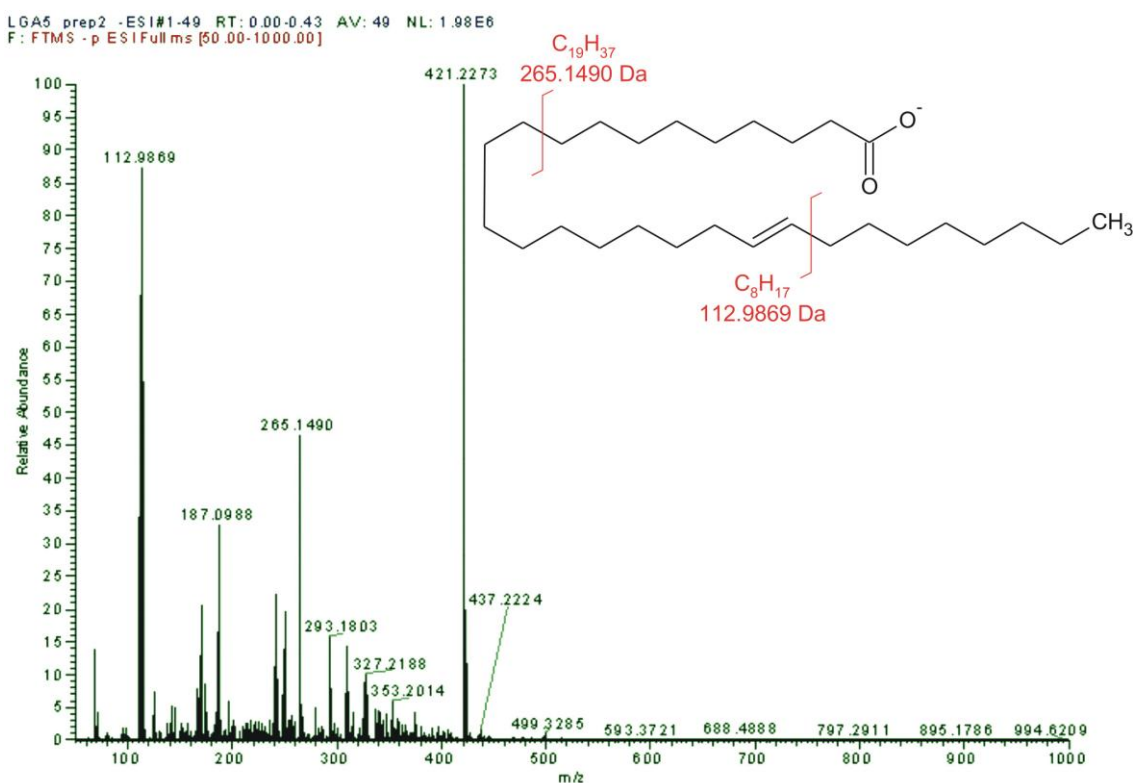


Εικόνα 6.9 19-οκτακοσενοϊκό οξύ (**3**)

Η ουσία μετά από φασματοσκοπική μελέτη της, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 , αλλά και την ανάλυσή της με την τεχνική ESI-HRMS ταυτοποιήθηκε και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το 19-οκτακοσενοϊκό οξύ (**3**), του οποίου η

δομή παρουσιάζεται στην Εικ. 6.9. Το φάσμα μάζας ESI(-) που ελήφθη υπέδειξε το ψευδομοριακό ιόν m/z 421.2273 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{54}O_2$ (19-οκτακοσενοϊκό οξύ), όπως δίνεται στην Εικ. 6.10. Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε 2.

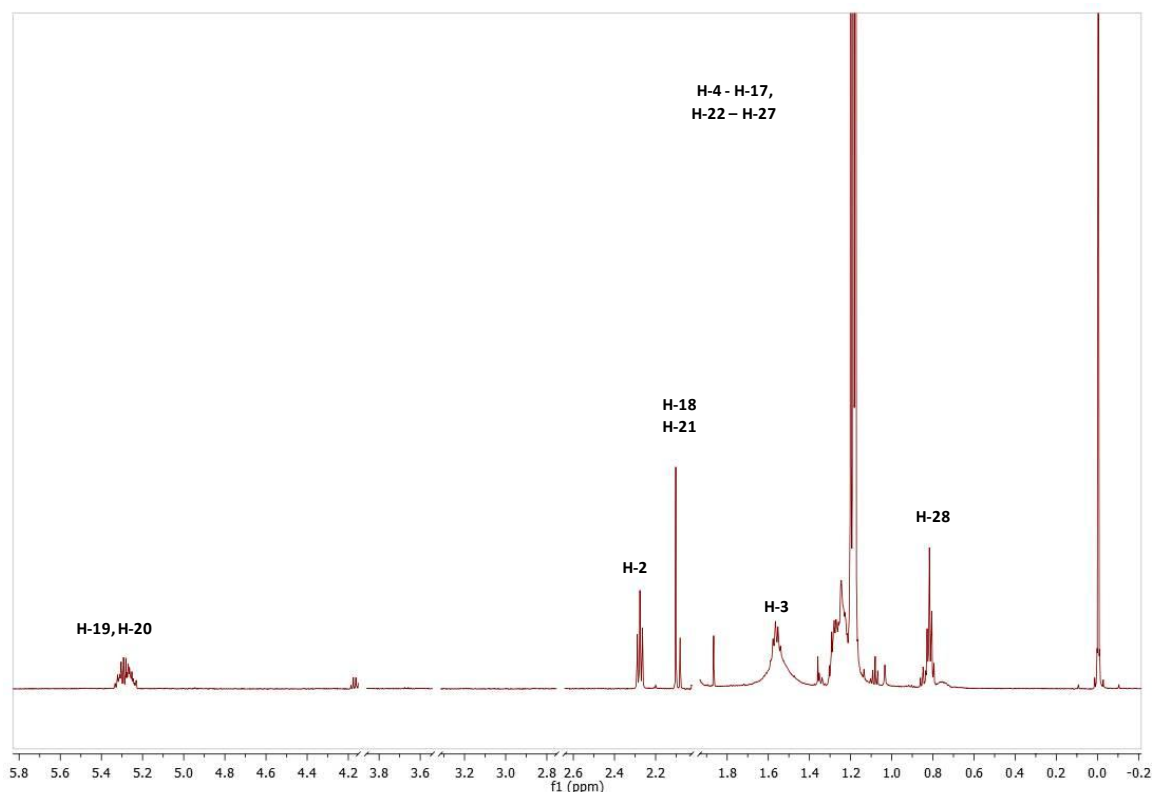
Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος 1H -NMR (Εικ. 6.11) εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή στα 5.34 ppm που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί στα μεθίνα των θέσεων 19 και 20. Η κορυφή στα 2.32 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 2 και εμφανίζεται αποθωρακισμένη λόγω της παρουσίας του γειτονικού καρβοξυλίου. Τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 3 συντονίζονται στα 1.61 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια). Επιπλέον, το σήμα στα 2.04 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 4 πρωτόνια) αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων 18 και 21, ενώ στην περιοχή 1.40-1.29 ppm παρατηρούνται τα σήματα των υπόλοιπων μεθυλενίων (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 40 πρωτόνια). Επίσης, η κορυφή του μεθυλίου στη θέση 28 εμφανίζεται ως πολλαπλή στα 0.86 ppm. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίν. 6.6) δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις για όλα τα πρωτόνια και τους άνθρακες του μορίου.



Εικόνα 6.10 Φάσμα Μάζας του 19-οκτακοσενοϊκού οξέος (3)

Πίνακας 6.6 Φασματοσκοπικά 19-οκτακοσενοϊκού οξέος (**3**)σε CDCl₃

Θέση	¹ H-NMR
1	-
2	2.32 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.8 Hz)
3	1.61 (2H, <i>m</i>)
4	1.40 – 1.29 (40H, <i>m</i>)
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
18	2.02 (4H, <i>m</i>)
21	
19	5.34 (2H, <i>m</i>)
20	
28	0.86 (3H, <i>m</i>)



Εικόνα 6.11 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του 19-οκτακοσενοϊκού οξέος (**3**) σε CDCl_3

Τα πολύ μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα (Very Long Chain Fatty Acids, VLCFA), στα οποία περιλαμβάνεται και το 19-οκτακοσενοϊκό οξύ αποτελούν κοινά συστατικά των λιπιδίων των μυκήτων, αν και ο ακριβής βιοχημικός τους ρόλος παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος (Řezanka & Sigler 2009). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση VLCFA έχει αναφερθεί για τον Ασκομύκητα *Claviceps purpurea* που αναπτύχθηκε σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας τη σουκρόζη ως πηγή άνθρακα, όπου ανιχνεύτηκαν λιπαρά οξέα με 23-26 άτομα άνθρακα (Kren et al. 1985). Επιπροσθέτως, το λιπαρό οξύ με το μέγιστο αριθμό ατόμων άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα που έχει προηγουμένως αναφερθεί για το *G. australe* είναι το πεντακοσενοϊκό οξύ (C25:0) από τους Martínez et al. (1991). Παρόλα αυτά, η παραγωγή του 19-οκτακοσενοϊκού οξέως αναφέρεται για πρώτη φορά στο *G. australe* σε αυτήν τη μελέτη.

6.2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του LGA3 κλάσματος

Το LGA3 κλάσμα με σκοπό τον περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό του υποβλήθηκε σε VLC. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μείγμα EtOAc / *c*-Hex (1:1, v/v)

για όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Ο μέσος όγκος των κλασμάτων ήταν 5 mL. Παρελήφθησαν συνολικά 75 κλάσματα.

Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ύστερα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 5 ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν. 6.7. Ακολούθησε συγκεντρωτική TLC με διαλύτη ανάπτυξης μείγμα EtOAc / c-Hex σε διάφορες αναλογίες, έλεγχο με παρατήρηση σε λάμπα UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και εμφάνιση μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

Ο χρωματογραφικός έλεγχος των LGD1-5 με TLC έδειξε ότι τα περισσότερα από αυτά αποτελούσαν μείγματα ουσιών, όμως στο LGD1 κλάσμα περιέχονταν αποκλειστικά μία ουσία, η οποία δεν απορροφούσε στα 254nm αλλά έδωσε μπλε κηλίδα μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Μετά από φασματοσκοπική μελέτη της, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (σε CDCl_3), και σύγκριση με τα φάσματα πρότυπης ουσίας από τη βιβλιοθήκη φασμάτων της Aldrich (FT-NMR spectra, volume I) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το λινελαϊκό οξύ (**2**) που είχε απομονωθεί και σε προηγούμενη χρωματογραφική ανάλυση.

Πίνακας 6.7 Κλάσματα από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του LGA3 κλάσματος με VLC

Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-18	LGD1	41.3
19-23	LGD2	1.5
24-29	LGD3	10.6
30-60	LGD4	1.2
61-75	LGD5	1.0

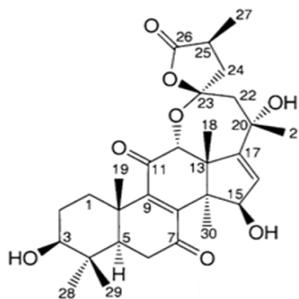
Σχετικά με το LGD2, από το χρωματογραφικό έλεγχο με TLC φάνηκε να περιέχει αποκλειστικά μία ουσία, η οποία δεν παρουσίασε απορρόφηση κατά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος με τη λυχνία UV, ενώ έδωσε έντονο μωβ χρώμα μετά τον ψεκασμό και την εμφάνιση της TLC με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης (Εικ. 6.12). Από αυτήν την παρατήρηση αντλήθηκε η πληροφορία ότι το συγκεκριμένο προϊόν είναι κάποιο τερπενικό παράγωγο. Πράγματι, μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ (σε CDCl_3), και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (León

et al. 2003) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τριτερπένιο, και συγκεκριμένα για κάποιο ανάλογο της αυστρολακτόνης (4). Η αυστρολακτόνη έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα καρποσώματα του *G. australe*.



Εικόνα 6.12 Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για το προϊόν LGD2
Σύστημα ανάπτυξης: *c*-Hex / EtOAc (1:1)

Δυστυχώς, η χημική αστάθεια του μορίου δεν επέτρεψε την ασφαλή εκτίμηση της ακριβούς δομής του μορίου που απομονώθηκε. Ωστόσο, η δομή του μορίου της αυστρολακτόνης παρουσιάζεται στην Εικ. 6.13.

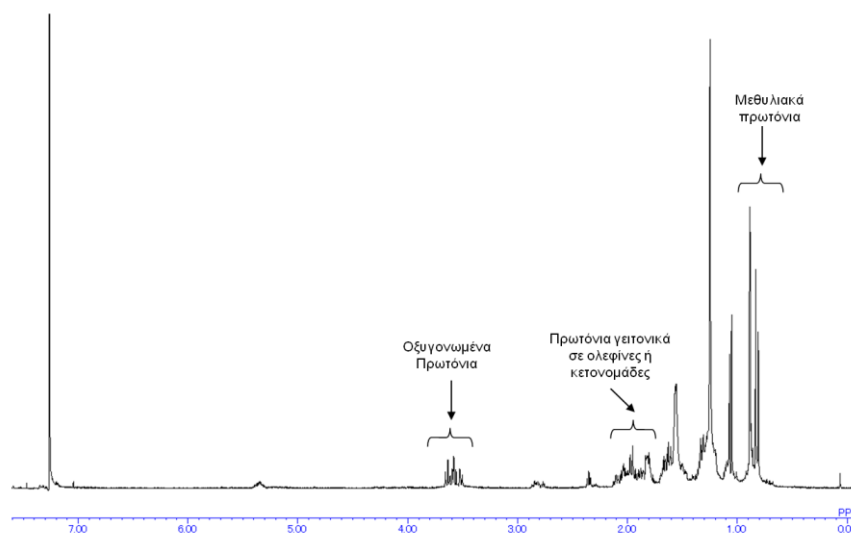


Εικόνα 6.13 Αυστρολακτόνη (4)

Τα στοιχεία που μας οδήγησαν στην παραπάνω υπόθεση είναι καταρχήν η παρουσία έξι χαρακτηριστικών σημάτων στην περιοχή δ [0.87-1.28 ppm] του $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 6.14) που αντιστοιχούν σε μεθύλια (κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία). Επίσης, τα σήματα που εμφανίστηκαν στην περιοχή του φάσματος δ [3.4-3.7 ppm], αντιστοιχούν σε οξυγονωμένα πρωτόνια και αποδεικνύει την παρουσία υδροξυλίων ή αιθέρων στο μόριο. Μάλιστα, ανιχνεύτηκαν σήματα και στην περιοχή του φάσματος δ [1.8-2.2 ppm] που

αντιστοιχούν σε πρωτόνια αρκετά αποθωρακισμένα λόγω της γειτνίασης τους με ολεφίνες ή κετονομάδες.

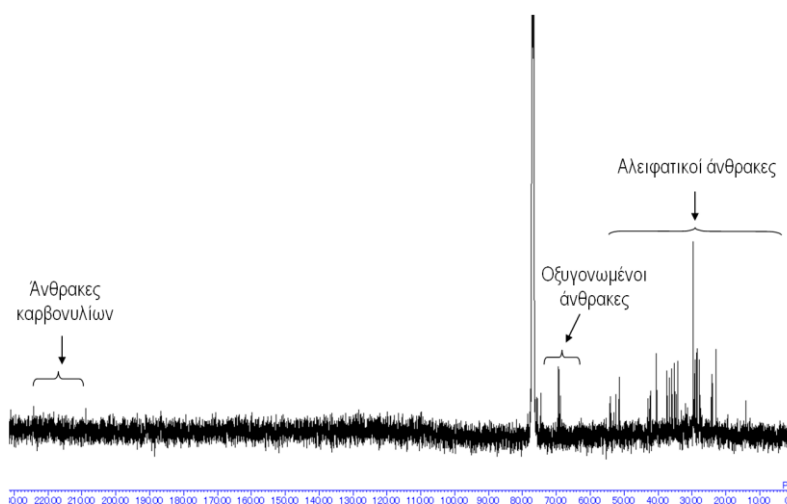
Επιπλέον στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 6.15) παρατηρούνται 30 άτομα ανθράκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μόριο είναι τριτερπένιο. Τα σήματα που εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος δ [10-60 ppm] αντιστοιχούν σε αλειφατικούς άνθρακες (CH_3 , CH_2 , CH , C), ενώ η παρουσία 5 σημάτων στην περιοχή του φάσματος δ [68-70 ppm] αποδεικνύει την παρουσία 5 οξυγονωμένων ανθράκων στο μόριο. Τέλος, δύο σήματα εμφανίζονται σε τιμές χαμηλότερου πεδίου (περίπου 210 και 225 ppm) που αντιστοιχούν στην παρουσία δύο καρβονυλίων στο μόριο.



Εικόνα 6.14 Φάσμα ^1H -NMR του ανάλογου αυστρολακτόνης (**4**) σε CDCl_3

Για συγκριτικούς λόγους αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τους León et al. (2003), τα χαρακτηριστικά σημεία του φάσματος ^1H -NMR της αυστρολακτόνης που απομόνωσαν από τον ίδιο μικροοργανισμό, είναι 6 απλές κορυφές στην περιοχή δ [0.91-1.42 ppm] που αντιστοιχούν στα μεθυλιακά πρωτόνια στις θέσεις 18, 19, 21, 28, 29 και 30 (Εικ. 6.13). Επίσης, τα μεθινικά πρωτόνια της θέσης 3 και 15 συντονίζονται σε δ 3.21 ppm και δ 4.71 ppm αντίστοιχα λόγω της παρουσίας και μιας υδροξυλομάδας σε αυτές τις θέσεις του μορίου, και εμφανίζονται ως μια διπλής διπλή κορυφή (1H, *dd*, $J = 4.3 / 11.7$ Hz) για το H3, και μια διπλή κορυφή (1H, *d*, $J = 3.2$ Hz) για το H15, (Εικ. 18).

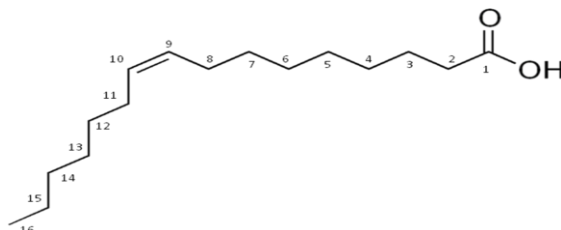
Επιπροσθέτως, στο φάσμα ^{13}C -NMR της αυστρολακτόνης, εμφανίζονται 30 σήματα από τα οποία τα 7 αντιστοιχούν σε CH_3 , τα 5 σε CH_2 , τα 6 σε CH , και τα 12 σε τεταρτοταγή άτομα C. Επιπλέον, 4 σήματα στην ολεφινική περιοχή του φάσματος ^{13}C -NMR σε δ 146.2, 155.8 και 128.1, 157.6 ppm αντιστοιχούν στους ενδοκυκλικούς διπλούς δεσμούς ανάμεσα στα C(8) και C(9) και C(16) και C(17), αντίστοιχα. Τέλος, εμφανίστηκαν 3 σήματα σε τιμές χαμηλού πεδίου του φάσματος δ (203.81, 198.52 και 178.73 ppm) που αντιστοιχούν στους άνθρακες των καρβονυλίων C(7) και C(11) και C(26) του μορίου.



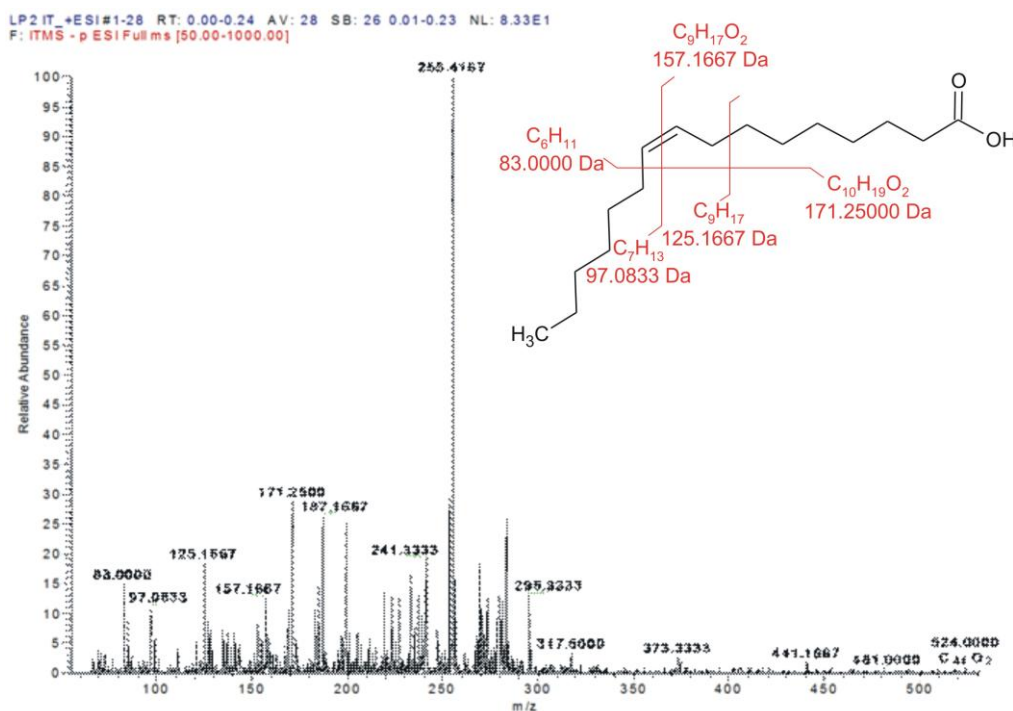
Εικόνα 6.15 Φάσμα ^{13}C -NMR του ανάλογου αυστρολακτόνης (**4**) σε CDCl_3

Συμπερασματικά, από τη σύγκριση των δικών μας φασματοσκοπικών δεδομένων και της βιβλιογραφικής αναφοράς για την αυστρολακτόνη, συμπεραίνεται ότι το μόριο που απομονώθηκε με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική ανάλυση είναι τριτερπένιο και μάλιστα πιθανότατα πρόκειται για κάποιο ανάλογο της αυστρολακτόνης, δεδομένου ότι τα περισσότερα σήματα στα φάσματα των δύο μορίων, όπως διαπιστώθηκε από τα παραπάνω έχουν σημαντικές ομοιότητες. Αυτό το τριτερπένιο έχει κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι με την εργοστερόλη (MEV μονοπάτι) που αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα (βλ. παρ. 6.2.1) Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η αυστρολακτόνη που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το *G. australe* έχει επιδείξει κυτταροστατική δράση (León et al. 2003).

Για το κλάσμα LGD3 διαπιστώθηκε ότι περιείχε μια ουσία που απορροφούσε στα 254 nm αλλά έδωσε γκριζομπλέ κηλίδα μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Οι παρατηρήσεις αυτές, καθώς και η μορφή των κηλίδας πάνω στο χρωματογράφημα, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κάποιο λιπαρό οξύ.



Εικόνα 6.16 9-παλμιτολεϊκό οξύ (5)

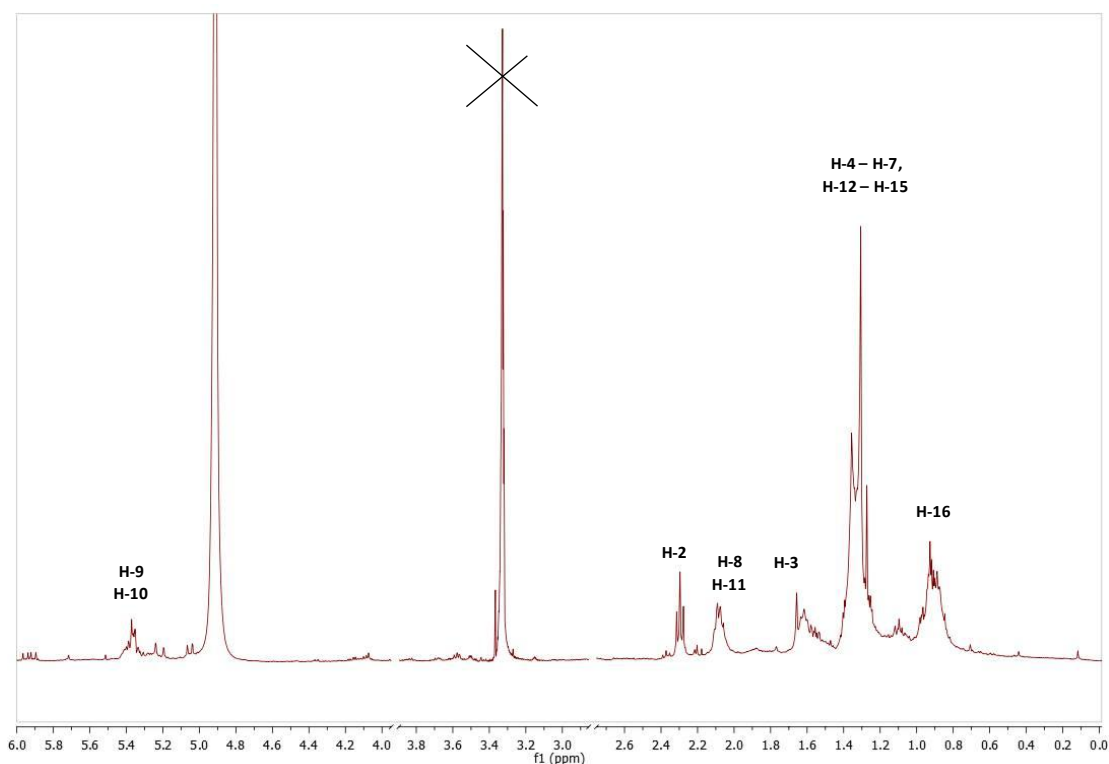


Εικόνα 6.17 Φάσμα Μάζας για το 9-παλμιτολεϊκό οξύ (5)

Η ουσία μετά από φασματοσκοπική μελέτη της, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε CD_3OD , αλλά και την ανάλυσή της με τη τεχνική ESI-HRMS ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι πρόκειται για το 9-παλμιτολεϊκό οξύ (Z-9-εξαδεκενοϊκό οξύ) (5), του οποίου η δομή δίνεται στην Εικ. 6.16. Το φάσμα μάζας ESI (+) που ελήφθη, υπέδειξε το

ψευδομοριακό ιόν m/z 255.4167 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{16}H_{30}O_2$ (9-παλμιτολεϊκό οξύ), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 6.17. Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε 2.

Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος 1H -NMR (Εικ. 6.18) εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή στα 5.37 ppm που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί στα μεθίλια των θέσεων 9 και 10. Η κορυφή στα 2.30 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 2, ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης 3 συντονίζονται στα 1.60 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια). Επιπλέον, η κορυφή στα 2.08 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων 8 και 11 και εμφανίζεται αρκετά αποθωρακισμένη λόγω του διπλού δεσμού στη θέση 9. Στην περιοχή 1.40-1.29 ppm παρατηρούνται τα σήματα των υπόλοιπων μεθυλίων (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 16 πρωτόνια). Τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου στη θέση 16 συντονίζονται στα 0.92 ppm (πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίν. 6.8) δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις για όλα τα πρωτόνια και τους άνθρακες του μορίου.



Εικόνα 6.18 Φάσμα 1H -NMR του 9-παλμιτολεϊκού οξέος (5) σε CD_3OD

Το 9-παλμιτολεϊκό οξύ είναι ένα ω-7 μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, που βιοσυντίθεται από το παλμιτικό οξύ με τη μεσολάβηση του ενζύμου της δέλτα-9 αποακορεστάσης. Οι Ito et al. (1982) έχουν διαπιστώσει ότι αυτό το λιπαρό οξύ έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ πρόσφατα οι Yoon et al. (2010) απέδειξαν ότι αποτελεί ένα υποψήφιο παράγοντα με δράση εναντίον της μελάνωσης, αποτελεσματικό σε προσβολές υπέρχρωσης. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτολεϊκό οξύ (π.χ. έλαιο μακαντάμιας) δεν επηρεάζουν αρνητικά το προφίλ των λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα ή τη συσσώρευση της χοληστερόλης στην αορτή, αλλά έχουν παρόμοια δράση με αυτήν που προβάλλουν έλαια πλούσια σε άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα (Matthan et al. 2009).

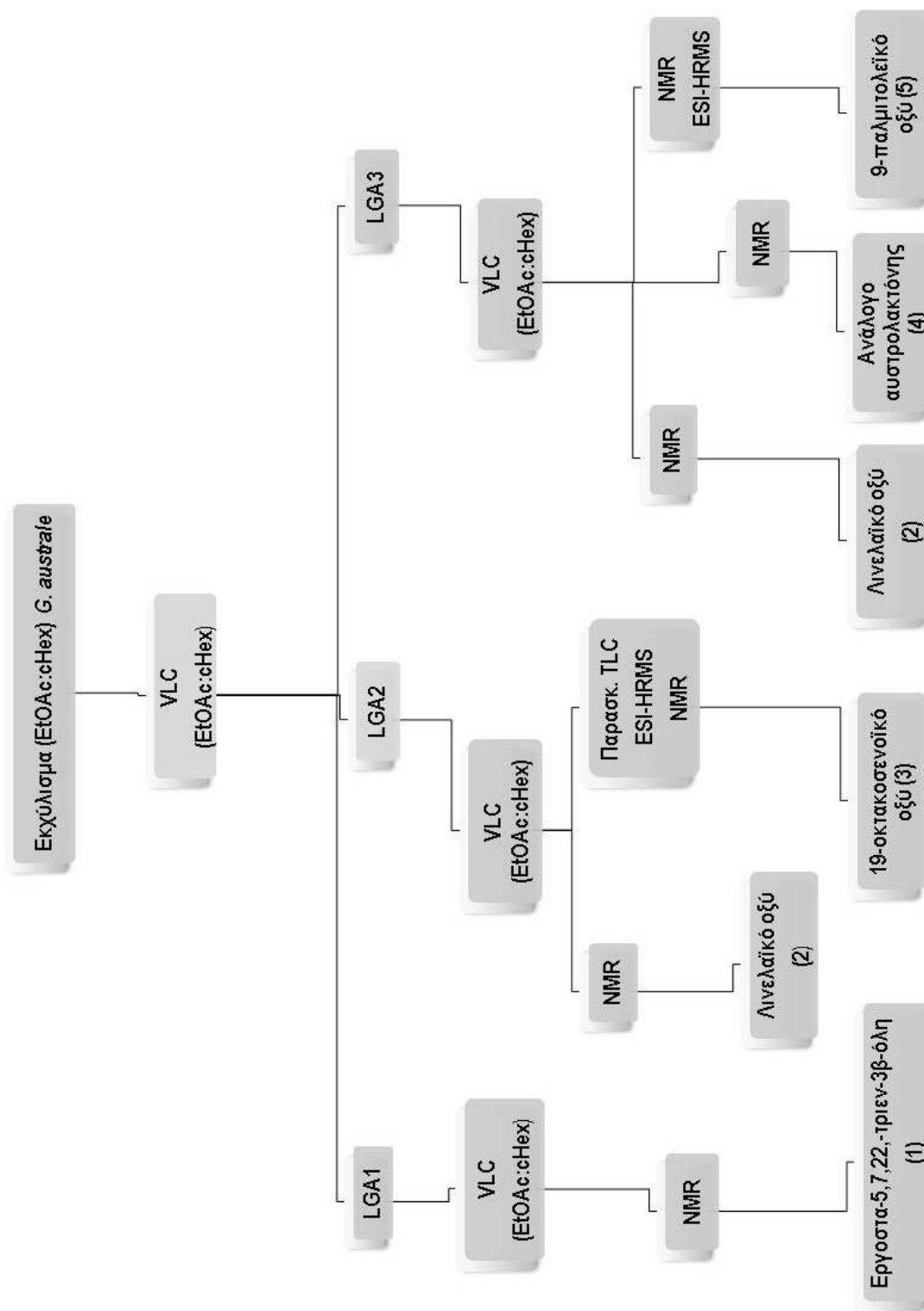
Πίνακας 6.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα 9-παλμιτολεϊκού οξέος (5) (CD₃OD)

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	
1	-	181.90	
2	2.30 (2H, t, J = ... Hz)	36.38	
3	1.60 (2H, m)	26.73	
8	2.08 (4H, m)	28.66	
11		28.46	
9	5.37 (2H, m)	131.66	
10		131.66	
4	1.40 – 1.29 (16H, m)	29.15	
5		22.60	
6		29.11	
7		29.93	
12		29.81	
13		29.40	
14		31.04	
15		22.81	
16		0.92 (3H, m)	14.23

Το 9-παλμιτολεϊκό οξύ έχει ανιχνευτεί σε σημαντική συγκέντρωση στους εδώδιμους μακρομύκητες *Morchella conica*, *Lactarius sanguifluus*, *Russula brevipes* και *Suillus bellini* (Kavishree et al. 2008, Ribeiro et al. 2009). Επιπλέον ενώ έχει απομονωθεί από τα πετρελαϊκά

εκχυλίσματα των καρποσωμάτων του *G. australe* (Martínez et al. 1991) δεν έχει αναφερθεί ξανά στο μυκήλιο του μακρομύκητα σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα.

Στο Σχ. 6.1 απεικονίζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση ή/και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του *G. australe* ATHUM 4345.



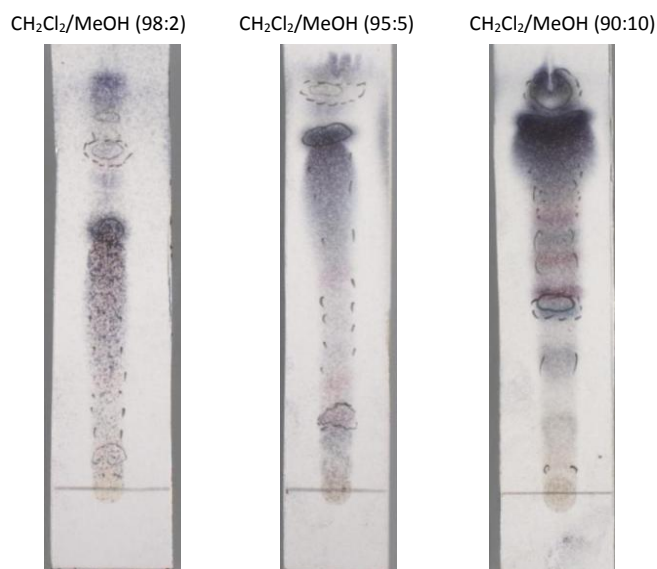
Σχέδιο 6.1. Συνοπτική διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης των μεταβολιτών από το *G. australe* ATHUM 4345

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ *P. ostreatus* ATHUM 4438

7.1 Χρωματογραφικός Έλεγχος του Προφίλ μεταβολιτών

Ποσότητα 110g ξηρής βιομάζας που προέκυψε από την καλλιέργεια του *P. ostreatus* ATHUM 4438 στο βιοαντιδραστήρα 20L εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών μείγμα EtOAc / c-Hex (1:3 v/v), όπως πραγματοποιήθηκε και για την περίπτωση του *G. australe* (βλ. 2.7.1.2). Το λαμβανόμενο εκχύλισμα (LPT) υποβλήθηκε σε διαδικασία εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και προσδιορίστηκε το βάρος του (936.4 mg). Στη συνέχεια, ελέγχθηκε σε χρωματογραφικές πλάκες TLC κανονικής φάσης (χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂ / MeOH σε διάφορες αναλογίες) μετά από την παρατήρηση αυτών σε λάμπα UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και εμφάνισή τους ύστερα από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 7.1).



Εικόνα 7.1 Χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσης για το LPT εκχύλισμα

Ακολούθησε χρωματογραφική ανάλυση του LPT εκχυλίσματος με VLC. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μείγμα EtOAc / c-Hex, προσδευτικά αυξανόμενης πολικότητας από καθαρό c-Hex μέχρι 100% EtOAc. Παρελήφθησαν συνολικά 143 κλάσματα, για τα οποία οι αναλογίες του χρησιμοποιούμενου συστήματος διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε κατά την VLC χρωματογραφία παρουσιάζονται στον Πιν. 7.1. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα ύστερα από έλεγχο με TLC συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 19

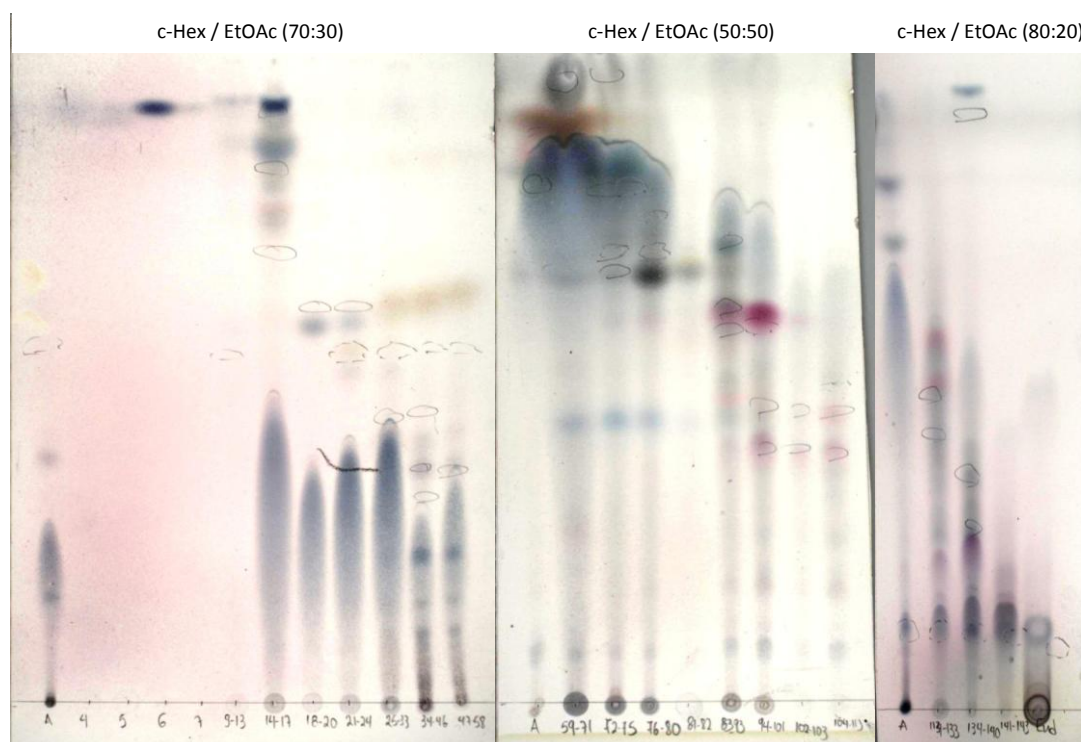
ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν. 7.2. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συγκεντρωτική TLC με σκοπό να γίνει μια πρώτη εκτίμηση του προφίλ των ενώσεων που περιέχονται στο αρχικό LPT εκχύλισμα (Εικ. 7.2).

Πίνακας 7.1 Κλάσματα που ελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών που εφαρμόστηκαν κατά τη VLC για το LPT εκχύλισμα

	Κλάσματα	Σύστημα Διαλυτών
LPT Εκχύλισμα (936.4 mg)	1-8	c-Hex 100%
	9-51	c-Hex/EtOAc 95/5
	52-58	c-Hex/EtOAc 60/40
	59-71	c-Hex/EtOAc 85/15
	72-93	c-Hex /EtOAc 80/20
	94-113	c-Hex /EtOAc 75/25
	114-123	c-Hex /EtOAc 70/30
	124-133	c-Hex /EtOAc 60/40
	134-138	c-Hex /EtOAc 50/50
	139-143	EtOAc 100%

Πίνακας 7.2. Ξηρά βάρη (mg) των ομάδων που προέκυψαν από τη χρωματογραφική ανάλυση του LPT εκχυλίσματος με VLC, μετά από έλεγχο με TLC

Ομάδες	Βάρος (mg)	Ομάδες	Βάρος (mg)
1-8	3.2	76-80	20.2
9-13	2.0	81-82	4.7
14-17	145.7	83-93	15.3
18-20	71.8	94-101	11.3
21-24	58.4	102-103	3.2
25-33	82.4	104-113	10.3
34-46	113.1	114-133	20.6
47-58	40.7	134-140	25.8
59-71	76.7	141-143	20.7
72-75	23.6		



Εικόνα 7.2. Συγκεντρωτικά χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το LPT αρχικό εκχύλισμα

Ύστερα από την ανάπτυξη των πλακών TLC ακολούθησε παρατήρησή τους σε λάμπα UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και εμφάνισή τους, μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 7.2). Όπως διαπιστώνεται, στα πιο άπολα συστατικά του LPT εκχυλίσματος περιλαμβάνονται κυρίως λιπαρά οξέα και ουσίες τερπενικού τύπου, ενώ τα πιο πολικά συστατικά του εκχυλίσματος περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν απορρόφηση στο UV.

7.2 Παραλαβή εκχυλισμάτων του *P. ostreatus* με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE)

Μετά τον πρώτο έλεγχο του προφίλ των ενώσεων από τη βιομάζα του *P.ostreatus* ATHUM 4438 που εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με σύστημα διαλυτών EtOAc / c-Hex (1:3 v/v), διαπιστώθηκε ότι τα λιπαρά οξέα κυριαρχούν, γεγονός που καθιστά δυσχερή την απομόνωση των μορίων με περισσότερο ενδιαφέρον. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εκ νέου εκχύλιση με την μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE). Η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών και η εφαρμογή πίεσης κατά τη μέθοδο αυτή, συντέλεσε στην επιτάχυνση της διαδικασίας παραλαβής των ουσιών. Επιπλέον, η ασκούμενη πίεση στο δοχείο εκχύλισης του δείγματος επέτρεψε στο διαλύτη να εισχωρήσει αποτελεσματικότερα στους ιστούς του δείγματος, ενώ η δυνατότητα για χρήση διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης

προσέφερε μια πρώτη καλή κλασμάτωση, ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία απομόνωσης.

Ποσότητα 131g ξηρής βιομάζας που προέκυψε από την καλλιέργεια του *P.ostreatus* ATHUM 4438 στο βιοαντιδραστήρα 20 L εκχυλίστηκε στη συσκευή εκχύλισης ASE διαδοχικά με *c*-Hex, διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), μεθανόλη (MeOH) και νερό. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά επτά διαδοχικές εκχυλίσεις. Οι συνθήκες της διαδικασίας εκχύλισης περιγράφονται στην παρ. 2.7.1.1. Τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε διαδικασία εξάτμισης σε χαμηλή θερμοκρασία (περίπου 40°C) σε περιστροφικό εξάτμιστήρα κενού και ζυγίστηκαν. Τα βάρη των εκχυλισμάτων που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πιν. 7.3.

Πίνακας 7.3 Βάρη των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν με τη μέθοδο ASE

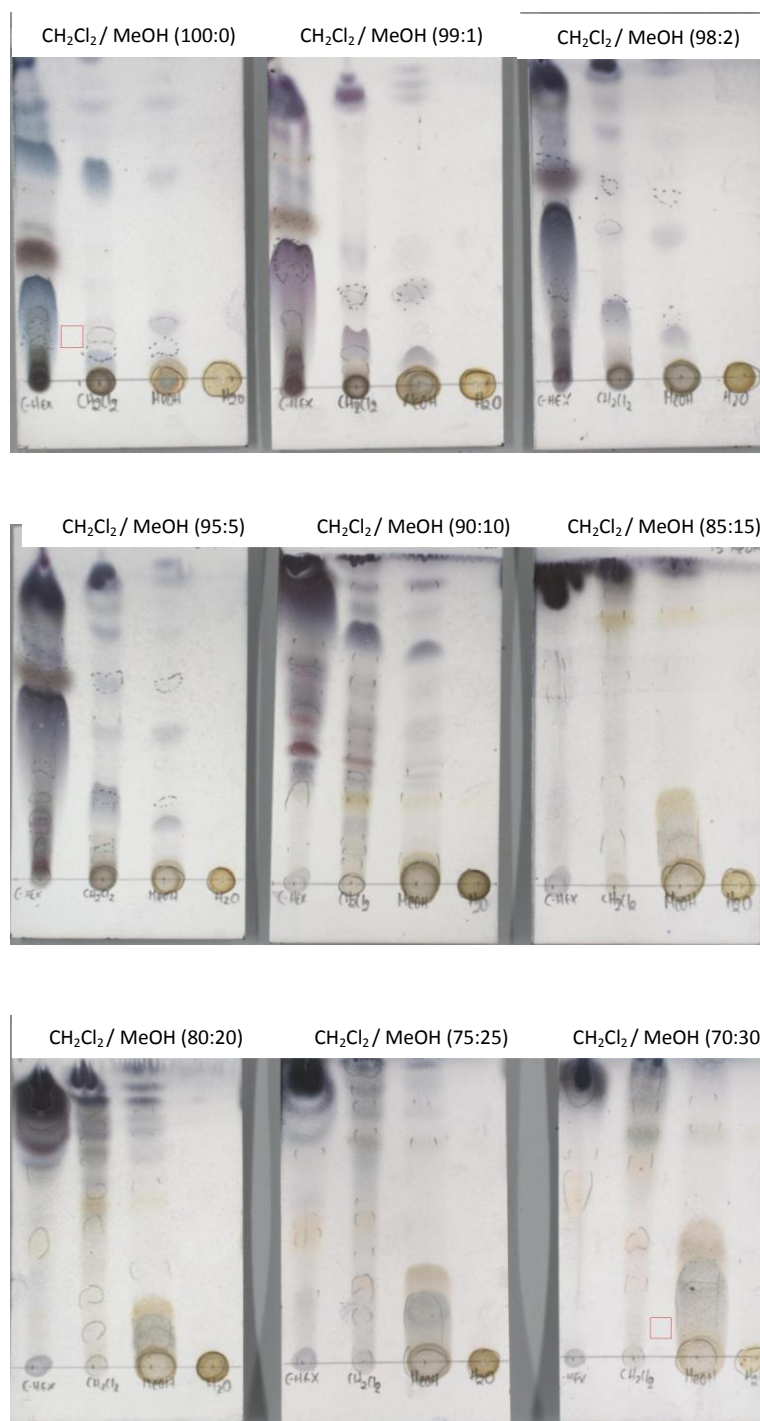
Εκχυλίσματα	Ξηρό Βάρος (g)	Απόδοση (%)
<i>c</i> -Hex	17.52	13.37
CH ₂ Cl ₂	1.44	1.01
MeOH	42.45	32.41
H ₂ O	52.56	40.12

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω, σε συνάρτηση με το χρωματογραφικό προφίλ σε TLC των εκχυλισμάτων του *P. ostreatus*, φαίνεται ότι το υδατικό και μεθανολικό εκχύλισμα, που ανακτήθηκαν και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα εκχυλίσματα, να είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτά συστατικά, τα οποία περιέχουν κυρίως σάκχαρα. Στο μεθανολικό εκχύλισμα περιέχονται και αρκετές αρωματικές ενώσεις π.χ. φαινολικά παράγωγα, κ.α. Αντίθετα, στο κυκλοεξανικό εκχύλισμα φάνηκε να περιέχει μόνο άπολες ενώσεις που είναι κυρίως λιπαρά οξέα και παράγωγά τους. Είναι γνωστό ότι τα εκχυλίσματα των Βασιδιομυκήτων που παραλαμβάνονται μετά από εκχύλιση με άπολους διαλύτες είναι πλούσια σε λιπαρά συστατικά και στερόλες (Yokokawa & Mitsuhashi 1981). Οι ουσίες μέσης πολικότητας (π.χ. τερπενοειδή κ.α.) που ανακτήθηκαν στο διχλωρομεθανικό εκχύλισμα αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικά εκχυλιζόμενων ουσιών.

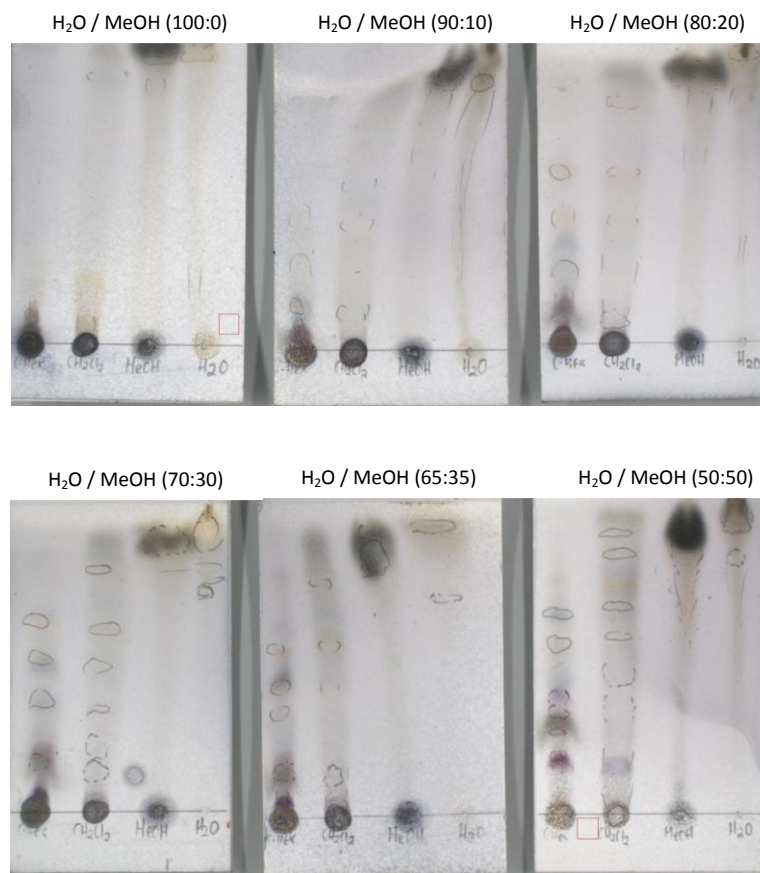
7.3 Σύγκριση των Εκχυλισμάτων ASE με TLC

Τα 4 διαφορετικά εκχυλίσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο ASE ελέχθησαν σε χρωματογραφικές πλάκες TLC κανονικής και αντίστροφης φάσης χρησιμοποιώντας τα

συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2 / MeOH και H_2O / MeOH αντίστοιχα, σε διάφορες αναλογίες (Εικ. 7.3, 7.4). Ακολούθησε παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκάσμο με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό, με σκοπό να γίνει εκτίμηση του προφίλ των ενώσεων για να αποφασιστεί η συνέχεια της αναλυτικής πορείας.



Εικόνα 7.3 Χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσης για τα εκχυλίσματα (c-Hex, CH_2Cl_2 , MeOH και H_2O , κατά σειρά κηλίδων) που προέκυψαν με τη μέθοδο ASE



Εικόνα 7.4 Χρωματογραφήματα TLC αντίστροφης φάσης για τα εκχυλίσματα (c-Hex, CH₂Cl₂, MeOH και H₂O, κατά σειρά κηλίδων) που προέκυψαν με τη μέθοδο ASE

Από την παρατήρηση των παραπάνω χρωματογραφημάτων TLC διαπιστώθηκε ότι τα σάκχαρα αποτελούν βασικό συστατικό του υδατικού κλάσματος. Ο έλεγχος έδειξε ότι το κυκλοεξανικό εκχύλισμα είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε λιπαρά οξέα. Έτσι, αποφασίσθηκε να μελετηθούν περαιτέρω το διχλωρομεθανικό και μεθανολικό εκχύλισμα, στα οποία περιλαμβάνονται κυρίως ουσίες τερπενικού τύπου, καθώς και ορισμένα συστατικά που παρουσιάζουν απορρόφηση στο UV (αρωματικές ενώσεις) και παρουσιάζουν περισσότερο φαρμακολογικό ενδιαφέρον.

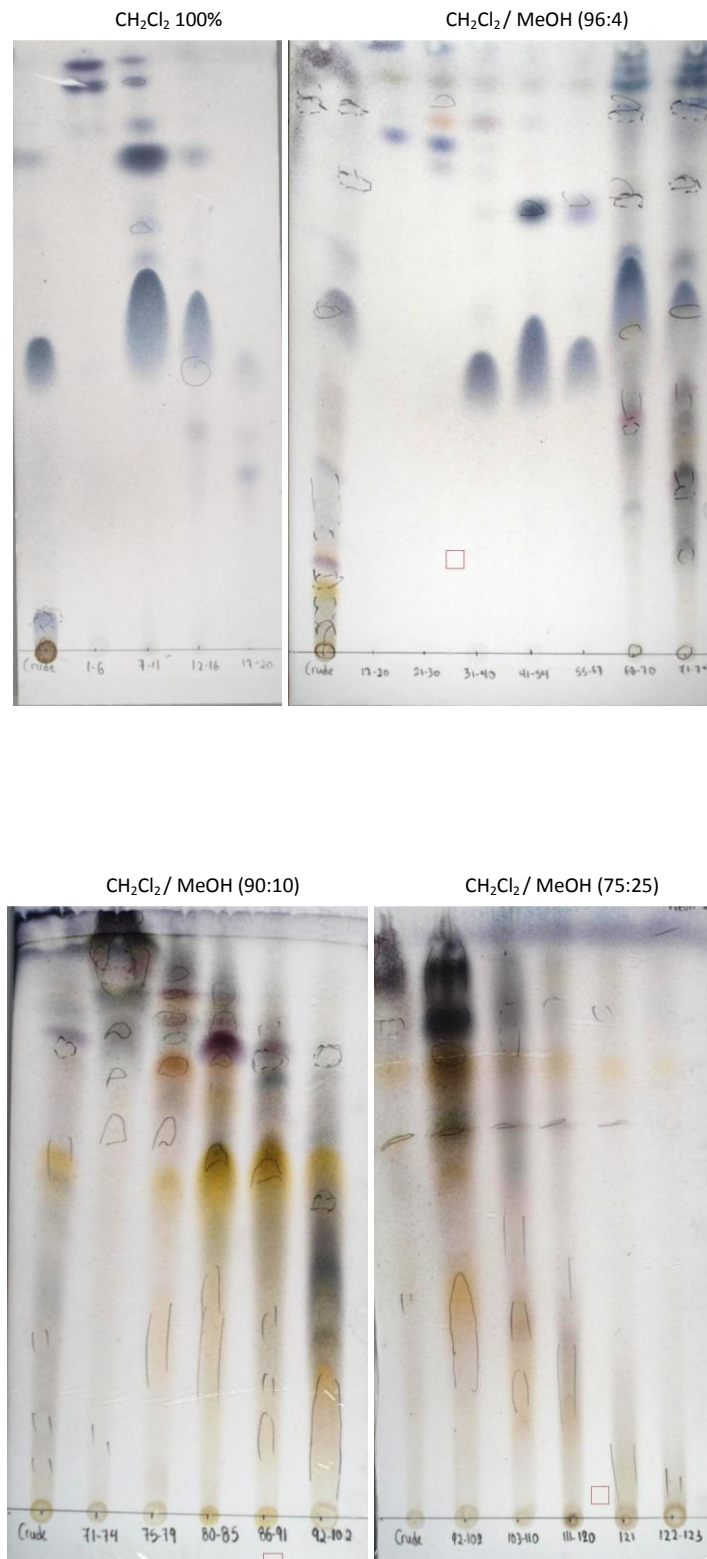
7.4 Μελέτη της χημικής σύστασης του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος

Το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα βάρους 1.01 g υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (MPLC). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60, 0.02-0.04 mm) και ως κινητή φάση μείγμα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση ήταν γυάλινη (36 / 920-044042) διαμέτρου 36 mm και μήκους 920 mm, η ροή του διαλύτη

ρυθμίστηκε στα 20 mL / min, ενώ η μέγιστη πίεση είχε οριστεί στα 10.0 bar. Συλλέχθηκαν 123 κλάσματα για τα οποία το αντίστοιχο σύστημα έκλουσης που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον Πιν. 7.4. Οι συνενώσεις έγιναν μετά από χρωματογραφικό έλεγχο των κλασμάτων με TLC σε σύστημα ανάπτυξης μείγμα CH₂Cl₂ / MeOH σε διάφορες αναλογίες, παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό (Εικ. 7.5). Τα βάρη για τις ομάδες που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πιν. 7.4.

Πίνακας 7.4 Χαρακτηριστικά χρωματογραφικού διαχωρισμού με MPLC του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος

Σύστημα Έκλουσης	Κλάσματα	Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
CH ₂ Cl ₂ 100%	1-20	1-6	LPMA1	9.4
		7-11	LPMA2	231.0
		12-16	LPMA3	66.9
		17-20	LPMA4	6.5
		21-30	LPMA5	2.7
		31-40	LPMA6	7.4
CH ₂ Cl ₂ / MeOH 100→95:5	21-70	41-54	LPMA7	22.6
		55-67	LPMA8	8.3
		68-70	LPMA9	100.7
		71-74	LPMA10	16.8
CH ₂ Cl ₂ / MeOH 95:5→90:10	71-90	75-79	LPMA11	74.4
		80-85	LPMA12	97.6
		86-91	LPMA13	79.3
CH ₂ Cl ₂ / MeOH 90:10→80:20	91-100	92-102	LPMA14	208.5
CH ₂ Cl ₂ / MeOH 80:20→50:50	101-120	103-110	LPMA15	216.7
CH ₂ Cl ₂ / MeOH 50:50	121-122	111-120	LPMA16	59.3
MeOH 100%	123	121-123	LPMA17	190.1



Εικόνα 7.5 Συγκεντρωτικά χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσεως των κλασμάτων από την ανάλυση του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος με MPLC

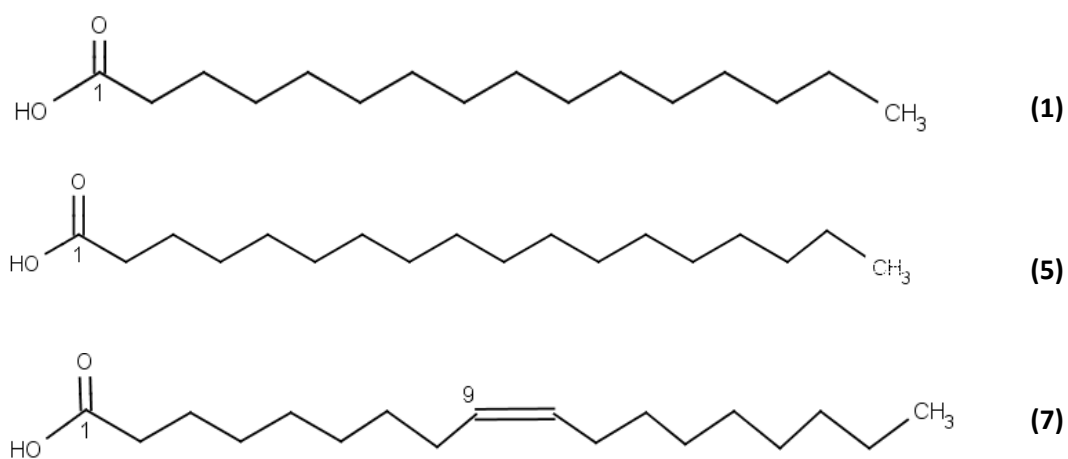
Ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι τα κλάσματα LPMA1- LPMA3 αποτελούν μείγματα άπολων συστατικών, κυρίως λιπαρών οξέων και παραγώγων τους σε διάφορες αναλογίες. Όπως παρουσιάζεται και στις πλάκες TLC (Εικ. 7.5), τα συγκεκριμένα κλάσματα δεν παρουσίαζαν απορρόφηση στο UV και έδιναν κηλίδες χρώματος μπλε μετά από ψεκάσμο με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

Η ποιοτική σύσταση των κλασμάτων αυτών μελετήθηκε με τη συνδυασμένη τεχνική αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε αναφέρεται σε προηγούμενη ενότητα (βλ. 2.7.11). Τα φάσματα μάζας συγκρίθηκαν με πρότυπα φάσματα μάζας που περιέχονται στη βιβλιοθήκη Wiley275. Από την ανάλυση προέκυψε ότι τα κλάσματα LPMA1- LPMA3 αποτελούν μείγματα παλμιτικού οξέος **(1)** και του μεθυλεστέρα του **(2)**, μεθυλεστέρα **(3)** και αιθυλεστέρα **(4)** του λινελαϊκού οξέος, του στεαρικού οξέος **(5)** και του μεθυλεστέρα του **(6)**, καθώς και του ελαϊκού οξέος **(7)** και του μεθυλεστέρα του **(8)**. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την τεχνική GC-MS δίνονται στον Πιν. 7.5.

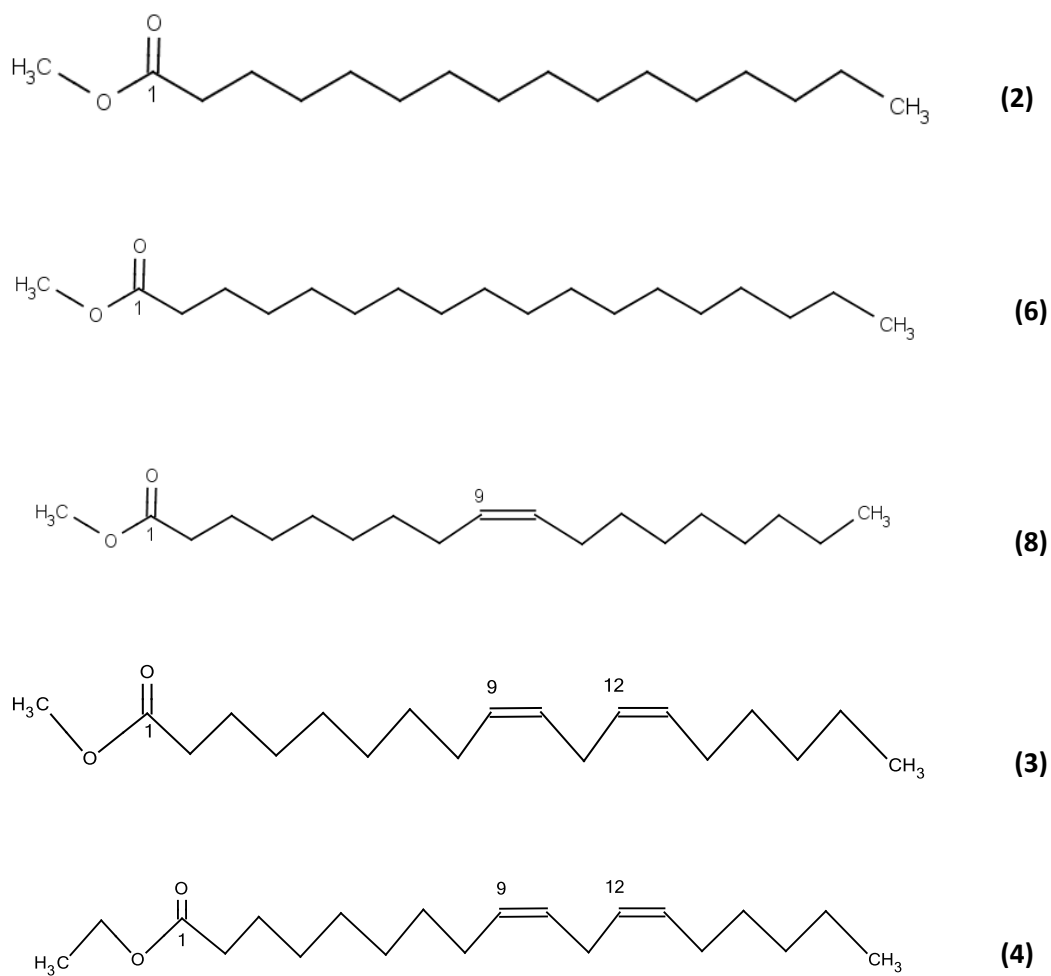
Πίνακας 7.5 Ποιοτική σύσταση των κλασμάτων LPMA1- LPMA3 από την ανάλυση με GC-MS

Κλάσματα	Συστατικά	Χρόνος ανάσχεσης (Rt) (min)
LPMA1- LPMA3	Παλμιτικό οξύ (1)	51.34
	Μεθυλεστέρας παλμιτικού οξέος (2)	50.27
	Μεθυλεστέρας λινελαϊκού οξέος (3)	55.23
	Αιθυλεστέρας λινελαϊκού οξέος (4)	57.70
	Στεαρικό οξύ (5)	57.96
	Μεθυλεστέρας στεαρικού οξέος (6)	52.51
	Ελαϊκό οξύ (7)	56.80
	Μεθυλεστέρας ελαϊκού οξέος (8)	55.47

Οι δομές των λιπαρών οξέων καθώς και των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων τους που ανιχνεύτηκαν σύμφωνα με τα παραπάνω, παρουσιάζονται στις Εικ. 7.6 και 7.7.



Εικόνα 7.6 Παλμιτικό (1), στεαρικό (5), ελαϊκό οξύ (7)



Εικόνα 7.7 Μεθυλεστέρες παλμιτικού (2), στεαρικού (6), ελαϊκού οξέος (8) και λινελαϊκού οξέος (3), καθώς και ο αιθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος (4)

Το παλμιτικό και το στεαρικό οξύ αποτελούν τα επικρατέστερα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) που συναντώνται στα περισσότερα είδη Βασιδιομυκήτων, μεταξύ των οποίων και στο *P. ostreatus* (Barros et al., 2007b, León-Guzmán et al. 1997, Pedneault et al. 2007, Ribeiro et al. 2009, Yilmaz et al. 2006). Βέβαια, στους Βασιδιομύκητες επικρατούν τα διατροφικά πολύτιμα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA) και μάλιστα το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ, γεγονός που δικαιολογεί την υψηλή θρεπτική αξία τους (Ribeiro et al. 2009).

Γενικά, τα SFA θεωρούνται διατροφικά ανεπιθύμητα συστατικά διότι αυξάνουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων. Το παλμιτικό οξύ είναι το πιο κοινό λιπαρό που απαντάται σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς και αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό των φυτικών λιπιδίων και πρωτεύον συστατικό των περισσότερων λιπών, ελαίων και κηρών. Χρησιμοποιείται ως λιπαντικό, γαλακτωματοποιητής και συστατικών ξηρών ελαίων και σαπώνων. Το στεαρικό οξύ αποτελεί το πιο κοινό συστατικό των λιπών και ελαίων των λαχανικών, όπου και απαντάται κυρίως με τη μορφή εστέρων γλυκερόλης. Χρησιμοποιείται στην παραγωγή ρητινών, κεριών, ως λιπαντικό στα καλλυντικά, σε αλοιφές, υπόθετα κ.ά. Το στεαρικό οξύ αν και κορεσμένο, έχει αποδειχτεί ότι δεν προκαλεί την αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, καθώς ένζυμα του ήπατος το μετατρέπουν σε ακόρεστο λίπος κατά την πέψη (Beare-Rogers et al. 2001). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι τόσο το στεαρικό, όσο και το παλμιτικό οξύ προκαλούν απόπτωση του κοκκιοκυτταρικού όγκου (θυλακίωμα) (Mu et al. 2001). Ακόμα, έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι το παλμιτικό οξύ προωθεί την απόπτωση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Jiang et al. 2010), ενώ το στεαρικό οξύ προβάλλει νευροπροστατευτική δράση εναντίον του οξειδωτικού στρες (Wang et al. 2006).

Το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ ανήκει στην οικογένεια των ω-9 λιπαρών και έχει πολύτιμα διατροφικά οφέλη. Συναντάται στα φυτικά έλαια και αποτελεί το κύριο συστατικό του ελαιόλαδου. Έχει διαπιστωθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα, με αποτέλεσμα να περιορίζει τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Moreno & Mitjavila 2003), ενώ δρα και κατά της αρτηριακής πίεσης (Lopez-Huertas 2010, Terés et al. 2008). Ακόμα, το ελαϊκό οξύ φαίνεται να αναστέλλει τη δράση του ογκογονιδίου Her-2/εu που εντοπίζεται στο 30% των ασθενών με καρκίνο του μαστού (Mendez et al. 2005). Εκτός των σημαντικών βιολογικών δράσεων, το ελαϊκό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών αλλά και ως έκδοχο σε φαρμακευτικά προϊόντα (Smolinske 1992).

7.4.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA9

Στο κλάσμα LPMA9 πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε MeOH

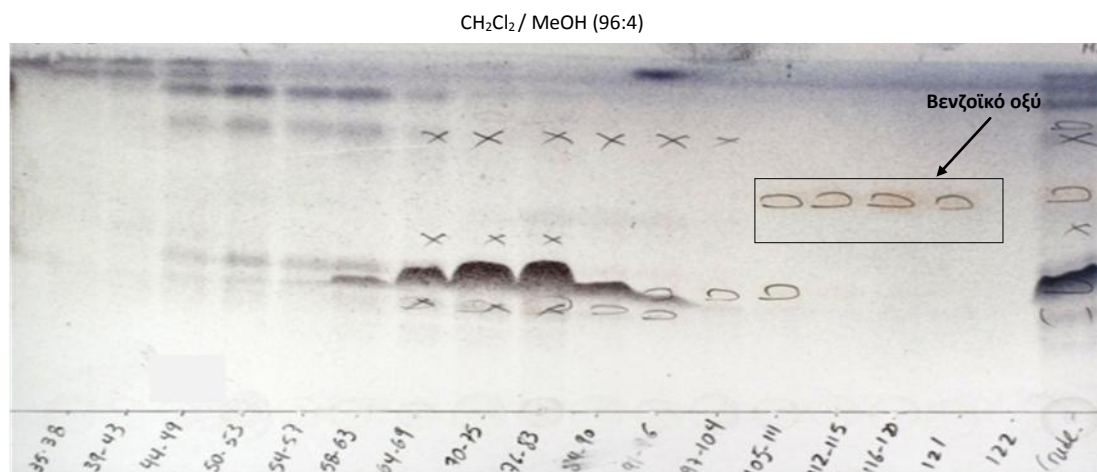
100%. Συνολικά παρελήφθησαν 122 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε κανονικής φάσης πλάκες με χρησιμοποιούμενο σύστημα ανάπτυξης $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ σε διάφορες αναλογίες. Ύστερα από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό έγιναν οι συνενώσεις (16) που αναφέρονται στον Πιν. 7.6.

Πίνακας 7.6. Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA9 σε στήλη Sephadex LH-20

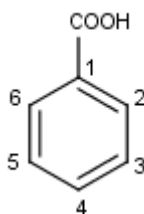
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-34	LPSA1	0.2
35-38	LPSA2	3.3
39-43	LPSA3	2.3
44-49	LPSA4	3.6
50-53	LPSA5	3.2
54-57	LPSA6	2.3
58-63	LPSA7	5.0
64-69	LPSA8	10.5
70-75	LPSA9	14.5
76-83	LPSA10	16.5
84-90	LPSA11	5.8
91-96	LPSA12	4.0
97-104	LPSA13	4.2
105-111	LPSA14	1.5
112-115	LPSA15	0.7
116-122	LPSA16	2.3

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC (Εικ. 7.8) έδειξε ότι τα περισσότερα από τα λαμβανόμενα κλάσματα αποτελούσαν μείγμα πολλών ουσιών. Παρόλα αυτά, στα κλάσματα LPSA13-16 περιέχονταν μία ουσία που παρουσίαζε απορρόφηση στο UV, ενώ ταυτόχρονα έδιναν πορτοκαλί χρώμα μετά το ψεκασμό με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

Έτσι, για αυτά τα κλάσματα έγινε λήψη φασμάτος $^1\text{H-NMR}$ (σε CDCl_3) και μετά από μελέτη και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Sato et al. 1999) διαπιστώθηκε η παρουσία του βενζοϊκού οξέος (**9**), η μοριακή δομή του οποίου παρουσιάζεται στην Εικ. 7.9.



Εικόνα 7.8 Συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης των κλασμάτων από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA9 σε στήλη Sephadex LH-20



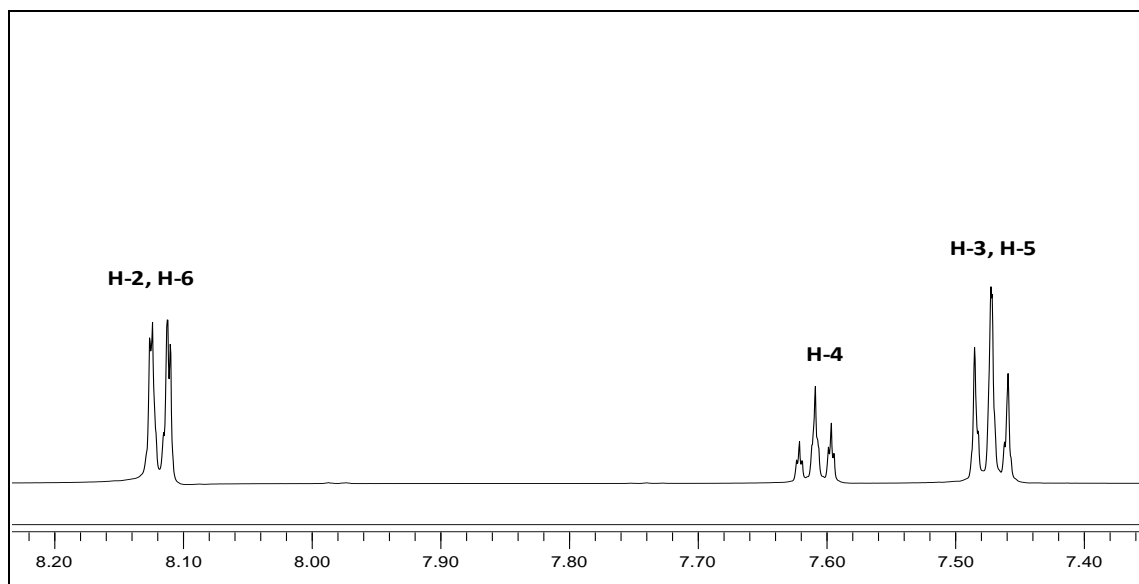
Εικόνα 7.9 Βενζοϊκό οξύ (**9**)

Πίνακας 7.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα του βενζοϊκού οξέος (**9**) σε CDCl₃

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	-	129.42
2	8.12 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.3 / 1.2 Hz)	130.20
6		130.20
3	7.47 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.7 Hz)	128.46
5		128.46
4	7.61 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.7 Hz)	133.75
1-COOH	-	172.31

Στο φάσμα ¹H-NMR του βενζοϊκού οξέος (**9**) σε CDCl₃ (Εικ. 7.10) εμφανίζονται στα 8.12 ppm μια διπλής διπλή κορυφή (*J* = 8.3 / 1.2 Hz) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2/H-6 και μια τριπλή κορυφή που επίσης ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια (*J* = 7.7 Hz) στα 7.47 ppm και η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-3/H-5. Επίσης παρατηρείται μια ακόμα τριπλή κορυφή (*J* = 7.7 Hz) στα 7.61 ppm η οποία ολοκληρώνει για

ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4. Στον Πιν. 7.7 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του βενζοϊκού οξέος.



Εικόνα 7.10 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του βενζοϊκού οξέος (**9**) σε CDCl_3

Το βενζοϊκό οξύ συναντάται ελεύθερο ή δεσμευμένο ως εστέρες του βενζοϊκού οξέος σε πολλούς κυρίως φυτικούς οργανισμούς (βατόμουρα, κανέλλα κ.α.), αλλά και ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού της φαινυλανίνης. Το βενζοϊκό οξύ πρόκειται για το απλούστερο αρωματικό καρβοξυλικό οξύ που περιέχει μια καρβοξυλική ομάδα απευθείας συνδεδεμένη με ένα δακτύλιο βενζενίου.

Το βενζοϊκό οξύ και τα άλατά του χρησιμοποιούνται κυρίως ως συντηρητικά τροφίμων (E210-E213) καλλυντικών και φαρμάκων, αφού παρεμποδίζει την ανάπτυξη της μούχλας, των ζυμών και ορισμένων βακτηρίων (Warth 1991). Ο μηχανισμός δράσης του ξεκινά με την απορρόφησή τους από το κύτταρο του μικροοργανισμού. Εάν η τιμή του ενδοκυτταρικού pH είναι μικρότερη ή ίση του 5.0, τότε η αναερόβια ζύμωση της γλυκόζης μέσω του ενζύμου της φωσφοφρουκτοκινάσης μειώνεται στο 95%. Επομένως η αποτελεσματικότητα της αντισηπτικής δράσης του βενζοϊκού οξέος και των αλάτων του είναι εξαρτώμενη της τιμής του pH του τρόφιμου (Pastorova et al. 1997). Τα όξινα τρόφιμα και ροφήματα, όπως είναι οι χυμοί φρούτων (κιτρικό οξύ), τα ανθρακούχα ποτά (διοξειδίο του άνθρακα), τα αναψυκτικά (φωσφορικό οξύ) κ.α. συντηρούνται με το βενζοϊκό οξύ ή τα άλατά του. Τα επιτρεπτά επίπεδα της χρήσης τους ως συντηρητικά τροφίμων είναι μεταξύ 0.05 και 0.1% (GSFA 2006). Μάλιστα, έχει διατυπωθεί ότι το βενζοϊκό οξύ και τα άλατά του

είναι δυνατό να αντιδράσουν με το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) σε ορισμένα ανθρακούχα ποτά, παράγοντας έτσι μικρές συγκεντρώσεις βενζενίου.

Επιπλέον το βενζοϊκό οξύ αποτελεί μια σημαντική ενδιάμεση ένωση για τη σύνθεση και την παραγωγή πολλών άλλων οργανικών ενώσεων, που χρησιμεύουν ως αρωματικά πρόσθετα τροφίμων, φάρμακα κ.ά. Το βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται επίσης σε μικρότερη κλίμακα στη βιομηχανία πλαστικών και χρωμάτων. Όταν μάλιστα αντιδράσει με χλώριο ή φώσφορο, προκύπτουν χημικές ενώσεις ιδιαίτερα δηλητηριώδεις που έχουν εφαρμογές στα εντομοαπωθητικά. Σχετικά με τις φαρμακευτικές δράσεις του βενζοϊκού οξέος, έχει αποδειχτεί αποτελεσματικό για την θεραπεία πολλών δερματικών ασθενειών (π.χ. μυκητιάσεις του ποδιού κ.α). Ως ομοιοπαθητικό φάρμακο χρησιμοποιείται σε προβλήματα νεφρών, αρθρώσεων, καρδιάς και ρευματικές και αρθριτικές καταστάσεις που συνδέονται με προβλήματα του ουροποιητικού (Wilson et al.2004).

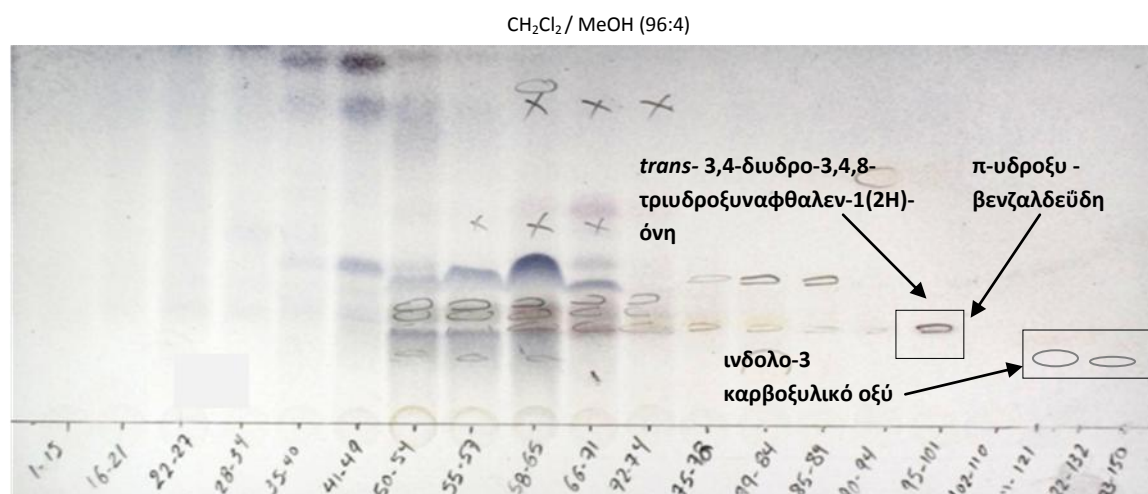
Το βενζοϊκό οξύ, ελεύθερο ή δεσμευμένο με τη μορφή απλών παραγώγων του (άλατα, εστέρες και αμίδια) συναντάται ευρέως στη φύση (π.χ. στα φυτά *Styrax benzoin*, *Xanthorrhoca harsilis*). Σχετικά με την παρουσία του σε Βασιδιομύκητες, αξίζει να αναφερθεί ότι το βενζοϊκό οξύ έχει απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Agaricus* (Chen & Wu 1984, Stijve et al., 2002, Kim et al. 2008), καθώς και από τα είδη *Sparassis crispa* και *Phellinus linteus* (Kim et al. 2008). Επίσης, οι Beltran-Garcia et al. (1997) απομόνωσαν από το *P. ostreatus* διάφορα πτητικά μόρια, μεταξύ των οποίων και το βενζοϊκό οξύ στο οποίο μάλιστα αποδόθηκαν αντιβακτηριακές ιδιότητες.

7.4.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA10

Στο κλάσμα LPMA10 πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε MeOH 100 %. Συνολικά παρελήφθησαν 150 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε κανονικής φάσης πλάκες, με χρησιμοποιούμενο σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂ / MeOH σε διάφορες αναλογίες. Ύστερα από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό, έγιναν οι συνενώσεις (19) που αναφέρονται στον Πιν. 7.8.

Πίνακας 7.8 Κλάσματα από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA10 σε στήλη Sephadex LH-20

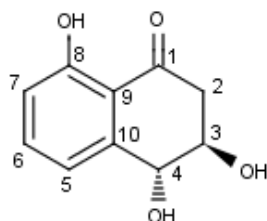
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-15	LPSB1	0.7
16-21	LPSB2	1.0
22-27	LPSB3	3.1
28-34	LPSB4	2.1
35-40	LPSB5	55.0
41-49	LPSB6	12.9
50-54	LPSB7	14.9
55-57	LPSB8	37.9
58-65	LPSB9	43.2
66-71	LPSB10	15.4
72-74	LPSB11	4.9
75-78	LPSB12	5.1
79-84	LPSB13	7.9
85-89	LPSB14	4.2
90-94	LPSB15	2.1
95-101	LPSB16	9.1
102-110	LPSB17	2.3
111-132	LPSB18	4.5
132-150	LPSB19	0.3



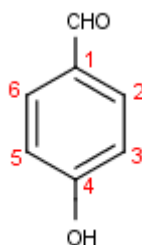
Εικόνα 7.11 Συγκεντρωτικό Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης των κλασμάτων που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA10 σε στήλη Sephadex LH-20

Ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι τα περισσότερα κλάσματα αποτελούσαν μείγματα πολλών ουσιών (Εικ. 7.11). Τα κλάσματα LPSB12, LPSB13, LPSB14 και LPSB15 συνολικού βάρους 19.3 mg, ύστερα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, συνενώθηκαν αφού τα χρωματογραφήματά τους TLC παρουσίασαν παρόμοια εικόνα (LPSB12+LPSB13+LPSB14+LPSB15=LPPRA).

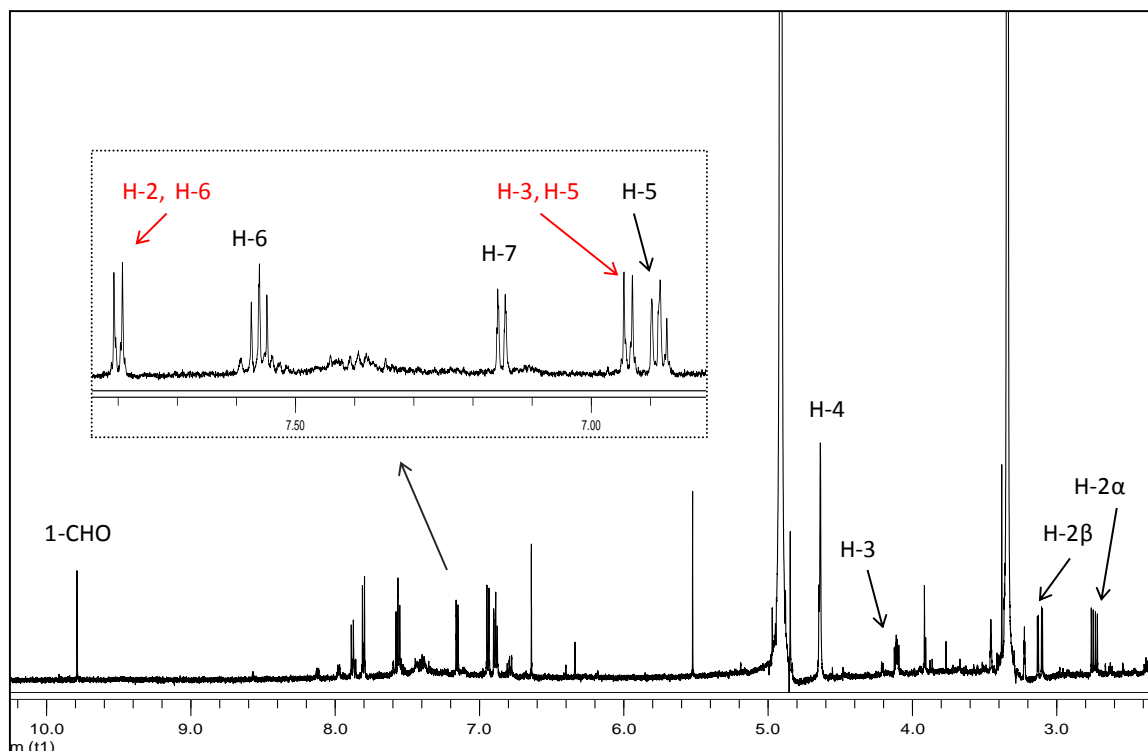
Ύστερα από χρωματογραφικό έλεγχο του κλάσματος LPSB16, διαπιστώθηκε ότι αποτελεί μείγμα ενώσεων που απορροφούν στο UV, ενώ ταυτόχρονα δίνουν έντονο κόκκινο χρώμα μετά το ψεκάσμο με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη του παραπάνω κλάσματος, με τη λήψη φασμάτων NMR μιας ($^1\text{H-NMR}$) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC) σε CD_3OD , σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Couché et al. 2009, Tan et al. 2004) καθώς και με τα φάσματα πρότυπων ουσιών από τη βιβλιοθήκη φασμάτων της Aldrich (FT-NMR spectra). Τελικά, διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα LPSC16 αποτελεί μείγμα δύο ουσιών, της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνης (**10**) και της 4-υδροξυβενζαλδεΐδης (π-υδροξυβενζαλδεΐδης) (**11**). Το βασικό συστατικό του κλάσματος ήταν η *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη. Οι δομές των δύο μορίων παρουσιάζονται στις Εικ. 7.12 και Εικ. 7.13, αντίστοιχα.



Εικόνα 7.12 *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη (**10**)



Εικόνα 7.13 π-υδροξυβενζαλδεΐδη (**11**)



Εικόνα 7.14 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνης (**10**) (μαύρες λεζάντες) και της π-υδροξυβενζαλδεΐδης (**11**) (κόκκινες λεζάντες) σε CD_3OD

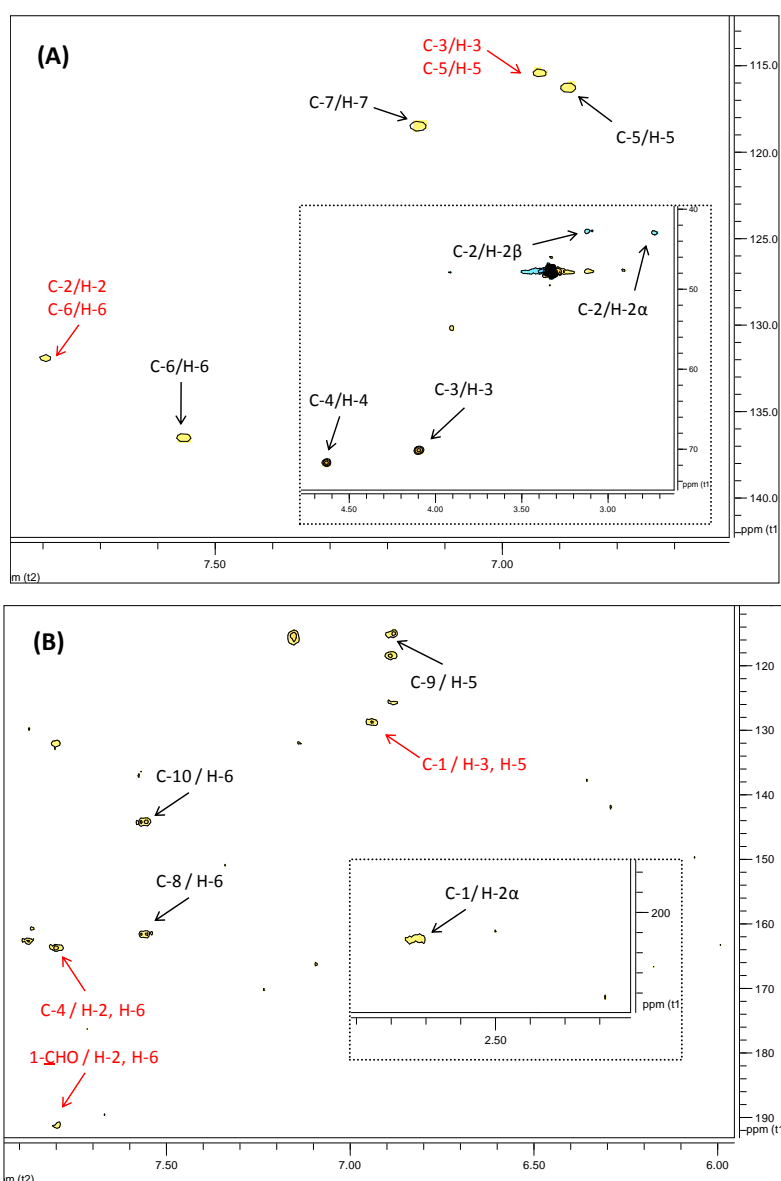
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 7.14) εμφανίζονται συνολικά 5 κορυφές. Οι 2 διπλές κορυφές στα 7.80 και 6.94 ppm, που η κάθε μία ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια, με σταθερά σύζευξης $J = 8.6$ Hz, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2/H-6 και H-3/H-5 της π-υδροξυ-βενζαλδεΐδης, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 131.8 και 115.6 ppm (HMQC). Επίσης, το πρωτόνιο της αλδεΐδης δίνει ένα χαρακτηριστικό σήμα στα 9.78 ppm, μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο (Εικ. 7.14).

Οι υπόλοιπες 3 κορυφές της αρωματικής περιοχής αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H-5, H-6 και H-7 της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνης. Τα σήματα των πρωτονίων αυτών εμφανίζονται ως διπλές διπλών κορυφές στα 6.88 ppm, (1H, $J=8.5 / 0.6$ Hz), 7.56 ppm (1H, $J=8.5 / 7.4$ Hz) και 7.14 ppm (1H, $J=7.4 / 0.6$ Hz) και οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 116.3 ppm, 136.8 ppm και 118.7 ppm (HMQC), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 7.15A.

Τα μεθυλινικά πρωτόνια H-2α και H-2β της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνης συντονίζονται στα 2.73 (1H, *dd*, $J=17.2 / 7.9$ Hz) και 3.11 (1H, *dd*, $J=17.2 / 3.9$ Hz) ppm αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια H-3 (4.09 ppm, 1H, *m*) και H-4 (4.63 ppm, 1H, *d*, $J=7.0$ Hz) του ίδιου μορίου εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένα λόγω της παρουσίας του υδροξυλίου στους αντίστοιχους άνθρακες.

Οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα που φέρουν πρωτόνια, καθώς και των τεταρτοταγών ανθράκων των δύο μορίων, βρέθηκαν από τη μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων HMQC και HMBC (Εικ. 7.15). Παραδείγματος χάριν, ο C-8 της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2H)-όνης συντονίζεται στα 162 ppm και δίνει χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης J^3 με το πρωτόνιο H-6. Επίσης, ο άνθρακας της αλδεΐδης αποτελεί τον πιο αποθωρακισμένο άνθρακα της π-υδροξυ-βενζαλδεΐδης, ο οποίος συντονίζεται στα 190.8 ppm και δίνει χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης J^3 με τα πρωτόνια H-2 και H-6.

Στον Πιν. 7.9 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2H)-όνης.



Εικόνα 7.15 Φάσματα HMQC (A) και HMBC (B) της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2H)-όνης (**10**)(μαύρες λεζάντες) και της π-υδροξυβενζαλδεΐδης (**11**) (κόκκινες λεζάντες)

Πίνακας 7.9 Φασματοσκοπικά δεδομένα της *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνης (**10**) σε CD₃OD

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	-	203.13
2	Hα 2.73 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17.2 / 7.9Hz)	42.90
	Hβ 3.11 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =17.2 / 3.9Hz)	
3	4.09 (1H, <i>m</i>)	70.15
4	4.63 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.0Hz)	71.30
5	6.88 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.5 / 0.6 Hz)	116.33
6	7.56 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.5 / 7.4 Hz)	136.80
7	7.14 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.4 / 0.6 Hz)	118.70
8	-	162.00
9	-	115.25
10	-	144.70

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της π-υδροξυβενζαλδεΐδης παρουσιάζονται στον Πιν. 7.10.

Πίνακας 7.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα της π-υδροξυβενζαλδεΐδης (**11**) (CD₃OD)

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	-	128.57
2	7.80 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.6Hz)	131.80
6		
4	-	163.80
3	6.94 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.6Hz)	115.60
5		
1-CHO	9.78 (1H, <i>s</i>)	190.80

Η 3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη αποτελεί φυσικό προϊόν και συγκεκριμένα ανήκει στη χημική ομάδα των πολυ-υδροξυλιωμένων α-τετραλονών (=3,4-διυδροναφθαλεν-1(2H)-όνες). Αυτοί οι μεταβολίτες είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της DHN-μελανίνης στους μύκητες (Basarab et al. 1999). Οι μελανίνες είναι χρωστικές μεγάλου μοριακού βάρους που προκύπτουν από τον οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών και ινδολικών ουσιών και είναι συνήθως σκουρόχρωμες (καφέ ή

μαύρες). Οι μελανίνες παρέχουν ορισμένα οφέλη στους μύκητες, και συγκεκριμένα συμβάλλουν στο δυναμικό επιβίωσής τους σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν την παθογόνα δράση τους (Henson et al. 1999, Rizner & Wheeler, 2003). Από τους Βασιδιομύκητες, για το *Pleurotus cystidiosus* έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει σκουρόχρωμα αρθροκονίδια, παράγοντας μαύρη χρωστική στο μυκήλιο και στο καρπόσωμα (Petersen et al. 1997, Zervakis 1998). Η μαύρη χρωστική επιβεβαιώθηκε από τους Selvakumar et al. (2008) ότι είναι μελανίνη και χαρακτηρίστηκε. Σε προηγούμενη παράγραφο μάλιστα, αναφέρθηκε η παραγωγή μελανίνης από το *P. ostreatus* (Εικ. 5.2, 5.3).

Μέχρι στιγμής μόνο τα *trans*-ισομερή της 3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2*H*)-όνης έχουν απομονωθεί από έξι διαφορετικά είδη μυκήτων (Couché et al. 2009). Το φυσικό *cis*-ισομερές έχει απομονωθεί από το μεταλλαγμένο μικροοργανισμό *Verticillium dahliae* (Stipanovic & Bell 1977).

Παρόμοιοι ναφθαλενικοί μεταβολίτες έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη Ασκομυκήτων που αναπτύχθηκαν σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες (π.χ. *Lachnum raryraceum*, *Cytospora eucalypticola*, *Xylaria hypoxylon*), για μερικούς από τους οποίους μεταβολίτες έχει διαπιστωθεί δράση κατά του ιού *Herpes simplex* (Gu & Ding 2008, Kokubun et al. 2003, Shan et al. 1997, Shushni et al. 2009). Από το *P. ostreatus* η 3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2*H*)-όνη απομονώθηκε για πρώτη φορά.

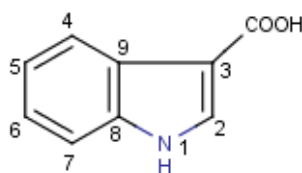
Η *π*-υδροξυβενζαλδεΐδη (ή 4-φορμυλ-φαινόλη), αποτελεί παράγωγο μόριο της βενζαλδεΐδης, που είναι μια αρωματική αλδεΐδη που συνίσταται από ένα δακτύλιο βενζολίου με μια φορμυλική ομάδα. Η βενζαλδεΐδη που είναι και η απλούστερη αρωματική αλδεΐδη έχει πολλές εφαρμογές και ειδικότερα στη βιομηχανία των καλλυντικών καθώς και στην αρωματοποιία (Brüchne & Wright 2002). Έχει χαρακτηριστική και σχετικά ευχάριστη οσμή (αμυγδάλου). Η *π*-υδροξυβενζαλδεΐδη αποτελεί χημικό ενδιάμεσο για τη σύνθεση πολλών αγροχημικών ουσιών, ενώ χρησιμοποιείται και στην ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση. Καθώς διακρίνεται για τη χαρακτηριστική αρωματική οσμή της, βρίσκει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες σύνθεσης αρωμάτων. Μάλιστα, ο μεθυλεστέρας της (*π*-ανισαλδεΐδη) χρησιμοποιείται εμπορικά ως άρωμα. Επιπλέον, η *π*-υδροξυβενζαλδεΐδη χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία φαρμακευτικών προϊόντων. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται στη βιομηχανική διαδικασία σύνθεσης της 2-(4-υδροξυφαινυλ) γλυκίνης που αποτελεί ένα εμπορικά σημαντικό ενδιάμεσο αμινοξύ για την παραγωγή της ημισυνθετικής πενικιλίνης αμοξικιλίνης. Ακόμα, αποτελεί πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση αντιβιοτικών τύπου κεφαλοσπορίνης, καθώς και του αντιεμετικού τριμεθοβενζαμιδίου (Maliverney & Mulhauser 2000). Τέλος, η *π*-υδροξυβενζαλδεΐδη,

καθώς και τα ανάλογα μόρια της (ανισαλδεΐδη, κουμιν-αλδεΐδη και 4-μεθοξυ-σαλικυλαλδεΐδη) αποτελούν αναστολείς της τυροσινάσης, του ενζύμου που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της τυροσίνης σε μελανίνη (Seo et al. 2003). Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον στην ιατρική, τη βιομηχανία καλλυντικών και τροφίμων αφού μειώνουν την παραγωγή και συσσώρευση της μελανίνης (Maeda & Fukuda 1991, Matsuura et al. 2006).

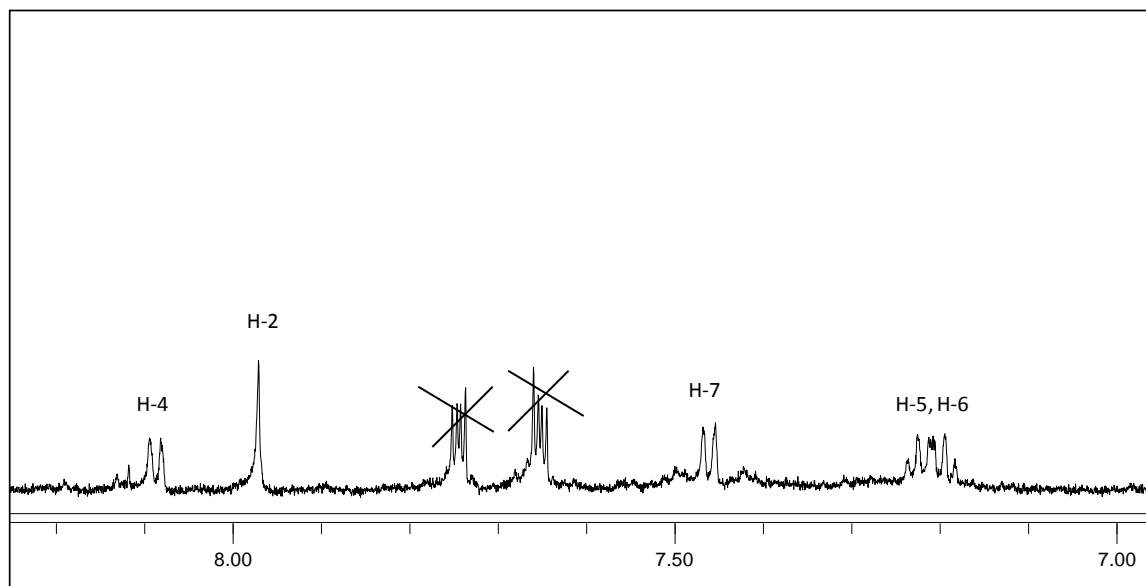
Η π -υδροξυβενζαλδεΐδη έχει ανιχνευτεί σε διάφορα είδη φυτών σε μικρές συγκεντρώσεις (Maliverney & Mulhauser 2000), σε θαλάσσιους οργανισμούς (Moon et al., 1998), ενώ έχει απομονωθεί από τον Ασκομύκητα *Sirodesmium diversum* (Tiefel & Berger 1993) καθώς και από το Βασιδιομύκητα *Osmoporos odoratus* (Sivakumar et al. 2006). Οι Gutiérrez et al. (1994) ανέφεραν την παραγωγή π -υδροξυβενζαλδεΐδης από 6 διαφορετικά είδη *Pleurotus* μεταξύ των οποίων και το *P. ostreatus*.

Βέβαια, το χαρακτηριστικό άρωμα του *P. ostreatus* έχει αποδοθεί στην παρουσία του πρόδρομου μορίου της π -υδροξυβενζαλδεΐδης, της βενζαλδεΐδης (Beltran-Garcia et al. 1997), η οποία έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Pleurotus*, όπως από το *P. eryngii* (Mau et al. 1998), το *P. florida* (Venkateshwarlu et al. 2000), αλλά και από άλλους Βασιδιομύκητες και συγκεκριμένα από το *Laetiporus sulphureus* (Rapior et al. 2000), το *Lepista nebularis* (Rapior et al. 2003) και από είδη του γένους *Agaricus* (Chen & Wu 1984, Picardi & Issenberg 1973, Stijve et al. 2002).

Ακόμα, στο κλάσμα LPSB18 που προέκυψε από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA10 κλάσματος όπως περιγράφεται παραπάνω, φάνηκε να περιέχει μια ουσία η οποία κατά το χρωματογραφικό έλεγχο με TLC παρουσίασε απορρόφηση σε λυχνία UV ενώ μετά το ψεκασμό της με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση έδωσε καφε-κόκκινη κηλίδα. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (σε CD_3OD). Ακόμα με τη βοήθεια πειραμάτων δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC) προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Βασιζόμενοι και στη σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Bano et al. 1987), διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ (**12**), του οποίου η δομή παρουσιάζεται στην Εικ. 7.16.



Εικόνα 7.16 Ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ (**12**)



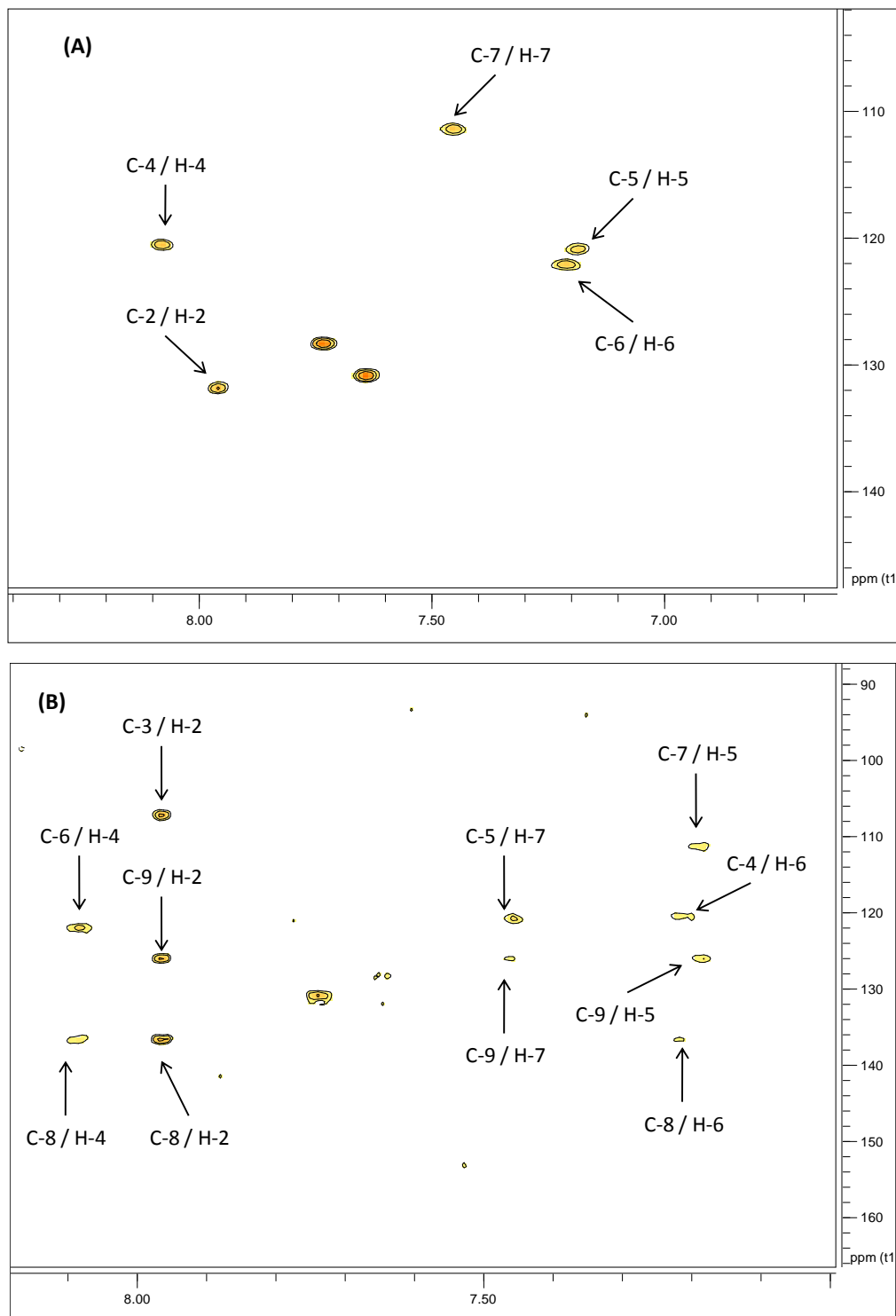
Εικόνα 7.17 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος (**12**) σε CD_3OD

Από την μελέτη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (σε CD_3OD) φάνηκε ότι στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται τέσσερις κορυφές οι οποίες φανερώνουν την ύπαρξη ενός 1,2-δισυποκατεστημένου βενζολικού πυρήνα (Εικ. 7.17). Πιο συγκεκριμένα σε δ 7.46 και 8.08 εμφανίζονται δύο διπλές διπλών κορυφές ($J=7.8 / 1.1$ Hz) οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-4 αντίστοιχα, ενώ σε δ 7.20 εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-5 και H-6. Τέλος, το πρωτόνιο H-2 του οποίου η αποθωράκιση ($\delta=7.95$) είναι ανάλογη του H-7 λόγω γειτνίασης με το άζωτο του ινδολικού πυρήνα, εμφανίζεται ως απλή κορυφή.

Πίνακας 7.11 Φασματοσκοπικά δεδομένα του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος (**12**) (CD_3OD)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
2	7.95 (1H, s)	131.80
3	-	107.20
4	8.08 (1H, dd, $J=7.8 / 1.1$ Hz)	120.60
5	7.20 (2H, m)	120.90
6		122.20
7	7.46 (1H, dd, $J=7.8 / 1.1$ Hz)	111.40
8	-	136.70
9	-	126.20
3-COOH	-	171.00

Οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα που φέρουν πρωτόνια, καθώς και του τεταροταγούς άτομα άνθρακα του μορίου, βρέθηκαν από τη μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων ΗΜQC και ΗΜBC (Εικ. 7.18). Στον Πιν. 7.11 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος.



Εικόνα 7.18 Φάσματα ΗΜQC (A) και ΗΜBC (B) του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος (13)

Τα παράγωγα ινδόλης συνιστούν μια σημαντική ομάδα ενώσεων με πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι φέρουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιρευματικές ιδιότητες και ακόμα δρουν εναντίον του HIV-ιού, ενώ διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα (Farghaly 2010). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι τα 3-παράγωγα της ινδόλης, στα οποία περιλαμβάνεται και το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ, βρίσκουν επιπλέον πολλές εφαρμογές ως συστατικά των αγροχημικών αλλά και στη βιομηχανία καλλυντικών και αρωμάτων (Kasahara 1987). Συγκεκριμένα, το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ αποτελεί ένα αλκαλοειδές ινδόλης του οποίου οι φαρμακολογικές δράσεις που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα είναι πολύ λίγες, με σημαντικότερη τη δράση κατά της αντιγραφής του ιού HIV σε λεμφοκυτταρικές σειρές (Wu et al. 2004).

Γενικότερα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων που περιέχουν στο μόριο τους ινδολικό πυρήνα συνήθως χρησιμεύουν ως βιοσυνθετικοί πρόδρομοι της τρυπτοφάνης (Mantle 2009). Η τρυπτοφάνη μάλιστα αποδείχτηκε σε σχέση με άλλα αμινοξέα που δοκιμάστηκαν καταλληλότερη πηγή άνθρακα για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες (βλ. παρ. 5.4). Επιπλέον η τρυπτοφάνη είναι συστατικό του CSL που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου κατά την ανάπτυξη του μελετώμενου στελέχους στο βιοαντιδραστήρα, από όπου προήλθε η βιομάζα που αναλύεται για παραγωγή μεταβολιτών σε αυτό το κεφάλαιο.

Το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ έχει απομονωθεί στο παρελθόν από ανώτερα φυτά, π.χ. από το *Bauchinia tarapotensis* της Οικ. Leguminosae (Braca et al. 2001), αλλά και από μύκητες (Machida et al. 2001, Cheng et al. 2009). Ακόμα, έχει απομονωθεί από διάφορα είδη Βασιδιομυκήτων, π.χ. από το *Aporrium caryae* (Levy et al. 2000) και από το *Paxillus involutus* (Rudawska & Kieliszewska-Rokicka 1997). Επίσης, πρόσφατα απομονώθηκε από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του Ασκομύκητα *Gaeumannomyces atomi* (Jumpathong et al. 2011). Η παρουσία του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος αναφέρεται για πρώτη φορά στο *P. ostreatus*, όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη.

7.4.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRA

Το κλάσμα LPPRA που προήλθε από προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA10 κλάσματος σε στήλη Sephadex LH-20, υποβλήθηκε σε παρασκευαστική TLC σε γυάλινη πλάκα με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Silica gel 60 F254. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε CH_2Cl_2 / MeOH (94:6, v/v). Μετά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος αποφασίσθηκε η λήψη μιας ουσίας που παρουσίαζε απορρόφηση

στο UV. Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη, που πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (σε CDCl_3), και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Sato et al. 1999), διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το βενζοϊκό οξύ (**9**). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του βενζοϊκού οξέος αναφέρονται σε προηγούμενη ενότητα (βλ. 7.4.1).

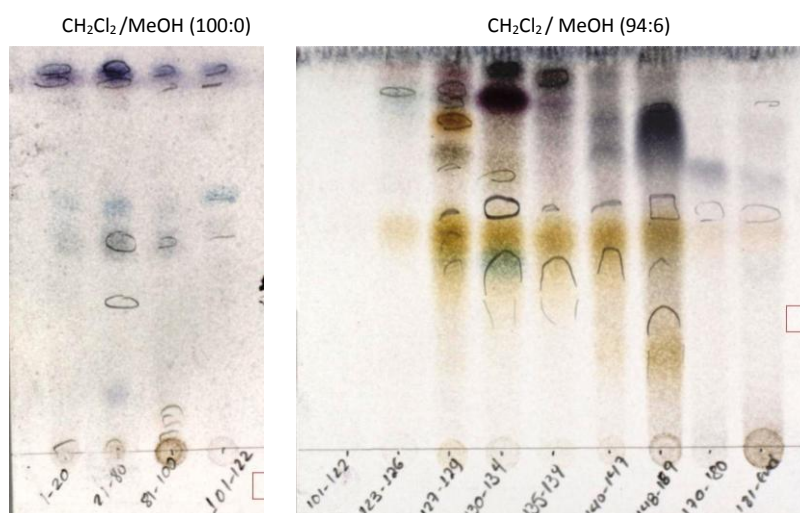
7.4.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA12

Το κλάσμα LPMA12 υποβλήθηκε σε MPLC με σκοπό το χρωματογραφικό διαχωρισμό του. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (Silica gel 60, 0.02-0.04 mm) και ως κινητή φάση μείγμα διαλυτών CH_2Cl_2 / MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πλαστική (Cartridge PP 12/150) διαμέτρου 12 mm και μήκους 150 mm, η ροή του διαλύτη ρυθμίστηκε στα 20 mL/min, ενώ η μέγιστη πίεση είχε οριστεί στα 10.0 bar. Συλλέχτηκαν 216 κλάσματα για τα οποία το αντίστοιχο σύστημα έκλουσης που εφαρμόστηκε φαίνονται στον Πιν. 7.12.

Πίνακας 7.12 Χαρακτηριστικά χρωματογραφικού διαχωρισμού με MPLC του κλάσματος LPMA12

Σύστημα Έκλουσης	Κλάσματα	Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
CH_2Cl_2 100%	1-40	1-20	LPMB1	3.2
CH_2Cl_2 / MeOH 100→95:5	41-140	21-80	LPMB2	10.0
CH_2Cl_2 / MeOH 95:5→90:10	141-180	81-100	LPMB3	3.2
CH_2Cl_2 / MeOH 90:10→80:20	181-200	101-122	LPMB4	1.7
CH_2Cl_2 / MeOH 80:20→50:50	201-210	123-126	LPMB5	3.8
CH_2Cl_2 / MeOH 50:50	211-215	127-129	LPMB6	9.6
MeOH 100%	216	130-134	LPMB7	63.6
		135-139	LPMB8	10.9
		140-147	LPMB9	6.0
		148-169	LPMB10	6.7
		170-180	LPMB11	2.5
		181-216	LPMB12	2.1

Οι συνενώσεις έγιναν μετά από χρωματογραφικό έλεγχο των κλασμάτων με TLC σε κανονικής φάσης πλάκες, σε σύστημα ανάπτυξης μείγμα CH₂Cl₂ / MeOH σε διάφορες αναλογίες, παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκάσμο με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό (Εικ. 7.19). Τα βάρη για τις ομάδες που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πιν. 7.12.



Εικόνα 7.19 Συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του LPMA12 με MPLC

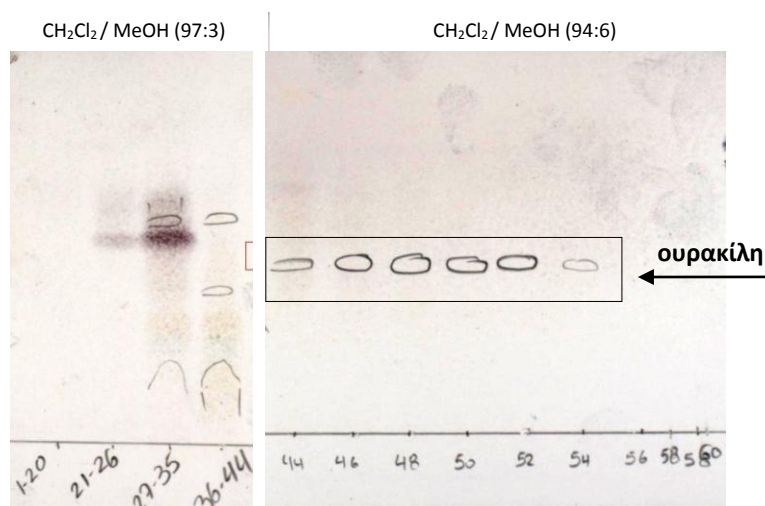
7.4.3.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMB7

Στο κλάσμα LPMB7 πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε MeOH 100 %.

Πίνακας 7.13 Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του κλάσματος LPMB7 σε στήλη Sephadex LH-20

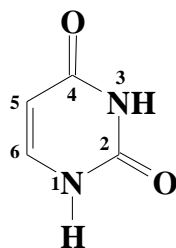
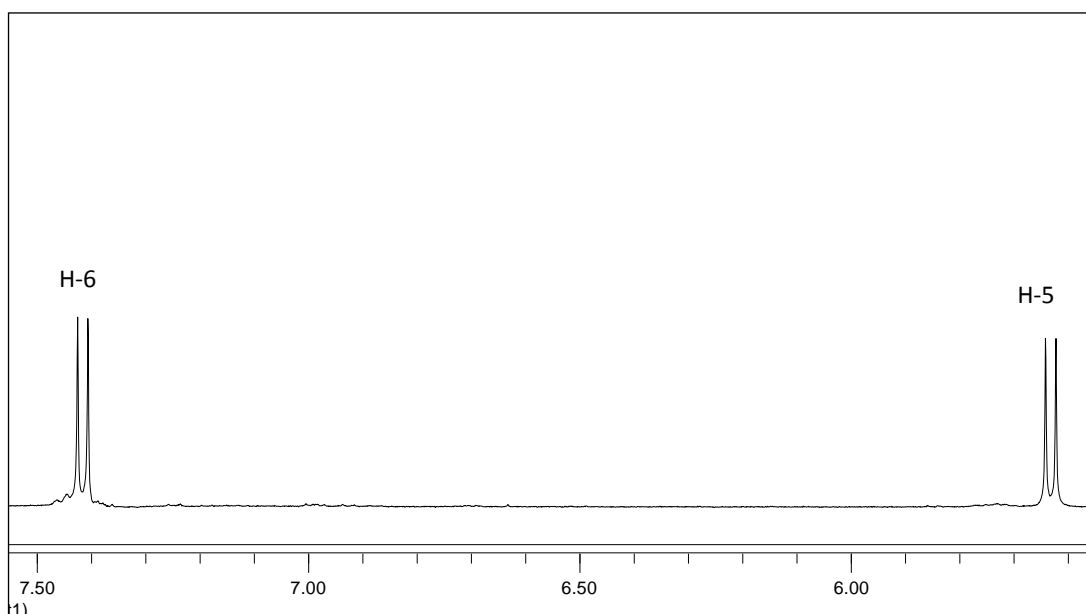
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-20	LPSC1	3.2
21-26	LPSC2	19.2
27-35	LPSC3	18.1
36-44	LPSC4	6.1
45-60	LPSC5	7.9

Συνολικά παρελήφθησαν 60 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL, τα οποία υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο με TLC σε κανονικής φάσης πλάκες, σε σύστημα ανάπτυξης μείγμα CH₂Cl₂ / MeOH σε διάφορες αναλογίες, παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό.



Εικόνα 7.20 Συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMB7 σε στήλη Sephadex LH-20

Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια εικόνα, ύστερα από το χρωματογραφικό έλεγχο με TLC συνενώθηκαν και τελικά προέκυψαν 5 ομάδες, το βάρος των οποίων παρατίθενται στον Πιν 7.13. Στην Εικ. 7.20 παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMB7 με μοριακό αποκλεισμό. Ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι τα περισσότερα από αυτά αποτελούσαν μείγμα ουσιών, όμως στο κλάσμα LPSC5 περιέχονταν σχεδόν αποκλειστικά μία ουσία που παρουσίαζε απορρόφηση στο UV, ενώ δεν έδωσε χρώση μετά τον ψεκασμό με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Έτσι, έγινε για αυτό το κλάσμα λήψη φάσματος πρωτονίου ¹H-NMR (σε CD₃OD) και μετά από μελέτη και σύγκριση με σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα (Bednarek et al. 2000, Togashi et al. 2000) διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η ουρακίλη (**14**) της οποίας η δομή παρουσιάζεται στην Εικ. 7.21.

Εικόνα 7.21 Ουρακίλη (**14**)Εικόνα 7.22 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουρακίλης (**14**) σε CD_3OD

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουρακίλης (Εικ. 7.22), τα πρωτόνια στις θέσεις 5 και 6 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές στα 5.63 και 7.42 ppm αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης $J = 7.8$ Hz. Στον Πιν. 7.14 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουρακίλης.

Πίνακας 7.14 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουρακίλης (**14**) (CD_3OD)

Θέση	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
2	-	153.23
3	-	-
4	-	168.30
5	5.63 (1H, <i>d</i> , $J = 7.8$ Hz)	101.87
6	7.42 (1H, <i>d</i> , $J = 7.8$ Hz)	144.25

Η ουρακίλη είναι μία πυριμιδίνη που απαντάται ευρέως σε ζωντανούς ιστούς υπό μορφή ουριδίνης (συστατικό των νουκλεϊκών οξέων) ή διφωσφορικού γλυκοσίτη αυτής, ο

οποίος μετέχει στο μεταβολισμό των υδατανθράκων (Milfin 1981). Η ουρακίλη συμβάλλει στην σύνθεση πολλών ενζύμων απαραίτητων για την λειτουργία του κυττάρου, λειτουργεί ως αλλοστερικός ρυθμιστής και συμπαράγοντας σε βιοχημικές αντιδράσεις στους ανθρώπινους και φυτικούς οργανισμούς (Garret & Grisham 1997). Η ουρακίλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακοδιατροφικό. Όταν το στοιχείο φθόριο αντιδράσει με την ουρακίλη παράγεται η 5-φθορο-ουρακίλη που αποτελεί αντικαρκινικό φάρμακο, καθώς αντικαθιστά την ουρακίλη, λόγω μοριακής ομοιότητας κατά την αντιγραφή του νουκλεϊκού οξέος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όμως την παρεμπόδιση των ενζύμων αντιγραφής του RNA, οπότε αναστέλλεται η σύνθεση του RNA και σταματάει η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Garret & Grisham 1997). Ακόμα η ουρακίλη χρησιμοποιείται για τη διάγνωση μικροβιακής μόλυνσης (οξυγαλακτικά βακτήρια) σε φρούτα και λαχανικά (Hildalgo et al. 2005). Τα παράγωγα της ουρακίλης που περιέχουν δακτύλιο διαζίνης έχουν εφαρμογές ως εντομοκτόνα (Pozharskii et al. 1997).

Η ουρακίλη έχει απομονωθεί από μυκήλια πολλών Βασιδιομυκήτων, όπως από το *G. carpense*, *G. lucidum* και *G. sinense* (Gao et al. 2007, Huie & Di 2004). Οι νουκλεοζίτες και οι βάσεις (π.χ. η αδενοσίνη, η ουριδίνη, η κυτιδίνη και η ουρακίλη) αποτελούν σημαντικά βιολογικά ενεργά συστατικά του Ασκομύκητα *Cordyceps militaris* (Gu et al. 2007).

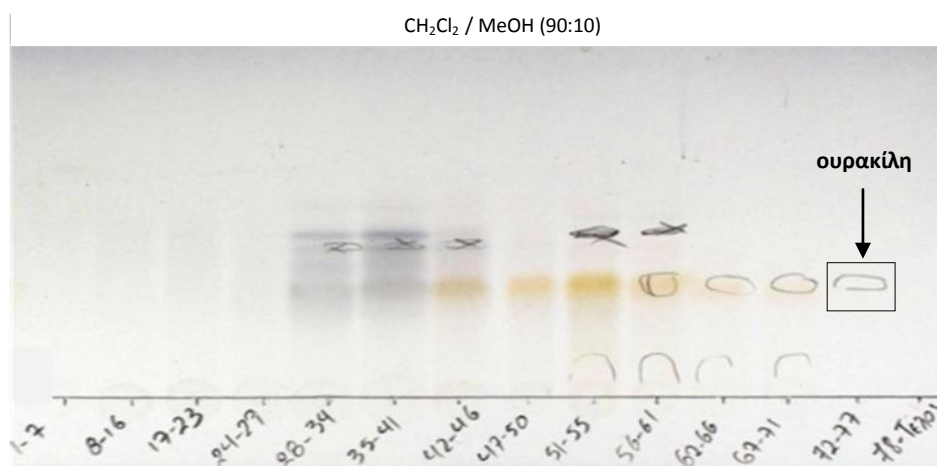
7.4.4 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPMA13

Το κλάσμα LPMA13 υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συνολικά παρελήφθησαν 80 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL, τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική TLC, (παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό), έγιναν οι συνενώσεις (15) που αναφέρονται στον Πιν. 7.15.

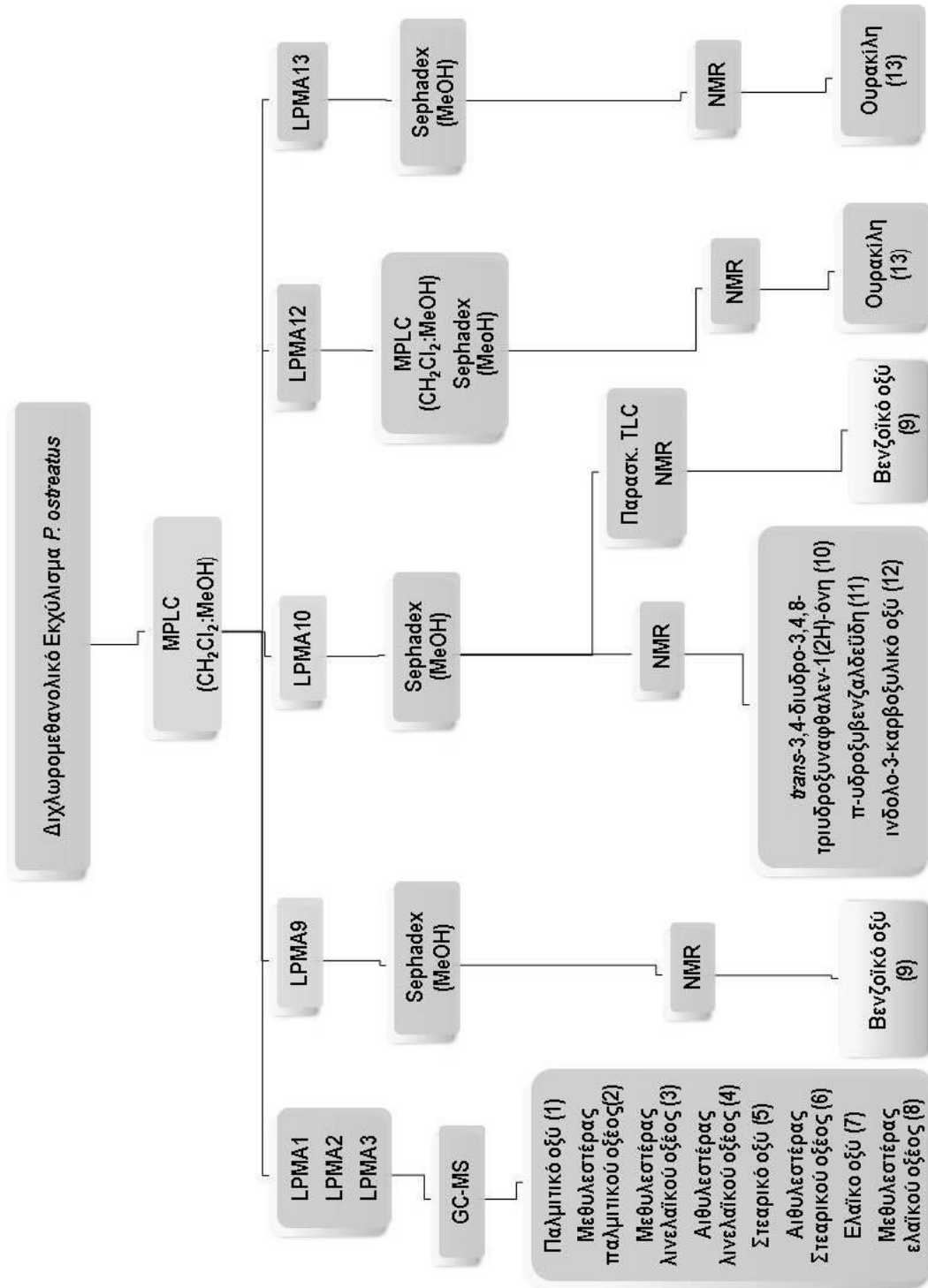
Ο έλεγχος με TLC (Εικ. 7.23) έδειξε ότι τα περισσότερα κλάσματα αποτελούσαν μείγμα πολλών ουσιών. Όμως, στο κλάσμα LPD13 φαίνεται να περιέχεται μια ουσία που απορροφούσε στο UV αν και δεν έδωσε χρώμα μετά το ψεκασμό με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Μετά τη φασματοσκοπική μελέτη του LPD13 κλάσματος, που πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (σε CD_3OD) και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Togashi et al. 2000, Bednarek et al. 2000), διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την ουρακίλη (**14**). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουρακίλης αναφέρονται σε προηγούμενη ενότητα (βλ. 7.4.3.1).

Πίνακας 7.15 Κλάσματα από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA13 σε στήλη Sephadex LH-20

Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-7	LPSD1	0.9
8-16	LPSD2	20.2
17-23	LPSD3	0.6
24-27	LPSD4	1.2
28-34	LPSD5	5.7
35-41	LPSD6	14.8
42-46	LPSD7	6.4
47-50	LPSD8	3.4
51-55	LPSD9	4.1
56-61	LPSD10	3.7
62-66	LPSD11	3.0
67-71	LPSD12	11.8
72-77	LPSD13	16.6
78-80	LPSD14	0.9

**Εικόνα 7.23** Συγκεντρωτικό Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPMA13 σε στήλη Sephadex LH-20

Τέλος, στο Σχ. 7.1 απεικονίζεται συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών από το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα του *P. ostreatus*.



Σχέδιο 7.1 Συνοπτική διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης των μεταβολιτών από το διχλωρομεθανολικό εκχύλισμα του *P. ostreatus* ATHUM 4438

7.5 Μελέτη της χημικής σύστασης του μεθανολικού εκχυλίσματος

Το μεθανολικό εκχύλισμα ξηρού βάρους 42.45 g, που προέκυψε από την εκχύλιση του *P.ostreatus* με την μεθοδολογία ASE, αναλύθηκε με χρωματογραφία προσρόφησης χρησιμοποιώντας ως στατική φάση (XAD-4) ρητίνη (βλ. 2.7.9). Ο σκοπός ήταν ο διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών από τα σάκχαρα που περιέχονταν στο μεθανολικό εκχύλισμα.

Πίνακας 7.16 Ξηρά βάρη (g) του υδατικού (LPXDW) και του μεθανολικού (LPXDM) κλάσματος που συλλέχτηκαν από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του *P. ostreatus* με χρωματογραφία προσρόφησης (XAD-4 ρητίνη)

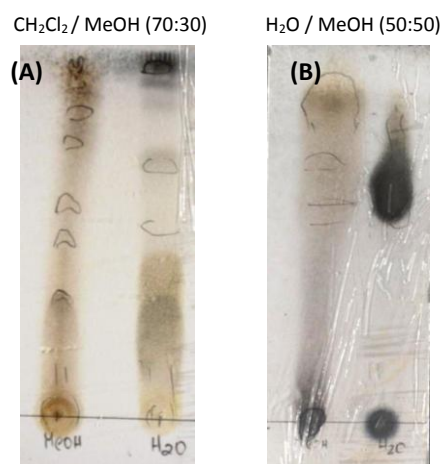
Κλάσματα	Ξηρό βάρος (g)
LPXDW	34.66
LPXDM	5.81

Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με τη χρωματογραφία προσρόφησης συλλέχτηκαν δύο κλάσματα, το υδατικό LPXDW στο οποίο περιέχονται κυρίως σάκχαρα και το μεθανολικό LPXDM με τις φαινολικές ουσίες. Τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε διαδικασία εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού (Εικ. 7.24) και προσδιορίστηκε το βάρος τους (Πιν. 7.16). Όπως διαπιστώνεται, μόνο το 13.7% περίπου του μεθανολικού εκχυλίσματος συνίσταται από φαινολικά συστατικά αφού σε μεγαλύτερο ποσοστό φαίνεται να επικράτησαν τα σάκχαρα.



Εικόνα 7.24 Το μεθανολικό κλάσμα LPXDM όπως παρελήφθη ύστερα από τη χρωματογραφία προσρόφησης και την εξάτμισή του σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού

Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος των δύο κλασμάτων που συλλέχτηκαν με TLC σε κανονικής και αντίστροφης φάσης πλάκες με συστήματα ανάπτυξης CH_2Cl_2 / MeOH (70:30) και H_2O / MeOH (50:50), αντίστοιχα. Τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στην Εικ. 7.25, μετά από παρατήρησή τους σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό.



Εικόνα 7.25 Χρωματογραφήματα TLC κανονικής **(A)** και αντίστροφης φάσης **(B)** για το (LPXDM) μεθανολικό και (LPXDW) υδατικό κλάσμα (κατά σειρά κηλίδων)

7.5.1 Μελέτη του LPXDM κλάσματος με FCPC

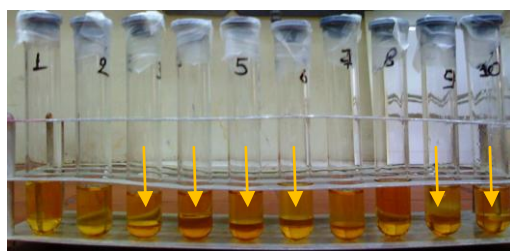
Το μεθανολικό κλάσμα (LPXDM), υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (FCPC). Για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαχωρισμού για το εκχύλισμα προς ανάλυση, δοκιμάστηκαν συνολικά 10 συστήματα διαλυτών των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται στον Πιν. 7.17. Η επιλογή του συστήματος έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.7.10.

Πίνακας 7.17 Συστήματα διαλυτών που δοκιμάστηκαν για διαχωρισμό με FCPC

Συστήματα διαλυτών (v/v)	
1	BuOH:EtOH:H ₂ O (12:7:15)
2	BuOH:MeOH:H ₂ O (12:8:15)
3	BuOH:ACN:H ₂ O (12:8:15)
4	EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O (5:10:4:15)
5	EtOAc:BuOH:ACN:H ₂ O (4:10:4:15)
6	EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O (3:10:5:15)
7	EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O (6:8:6:15)
8	EtOAc:BuOH:MeOH:H ₂ O (4:10:5:15)
9	EtOAc:BuOH:CAN:H ₂ O (3:11:3:15)
10	EtOAc:BuOH:CAN:H ₂ O (2:12:3:15)

Στην Εικ. 7.26 παρουσιάζονται οι σωλίνες με τα διαφορετικά συστήματα διαλυτών που δοκιμάστηκαν όπου διακρίνονται οι περιπτώσεις που σχηματίστηκε διφασικό σύστημα. Τα συστήματα 1, 2 και 8 απορρίφθηκαν διότι δεν οδήγησαν στο σχηματισμό διφασικού

συστήματος. Ακόμα, το σύστημα 3 απορρίφθηκε γιατί εάν και σχημάτισε διφασικό σύστημα, ο χρόνος εξισορρόπησης ήταν μεγαλύτερος από 30 sec.



Εικόνα 7.26 Δοκιμή των 10 συστημάτων διαλυτών με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXDM με FCPC. (Με βέλη σημειώνονται αυτά που επιλέχθηκαν για έλεγχο με TLC)

Ο έλεγχος των συστημάτων που επιλέχθηκαν έγινε με TLC σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης. Τελικά, επιλέξαμε ως καταλληλότερο σύστημα διαχωρισμού το σύστημα 6 [EtOAc:BuOH:EtOH:H₂O (3:10:5:15)]. Ποσότητα 5.81 g από το κλάσμα LPXDM εισήχθη στο σύστημα FCPC. Οι συνθήκες λειτουργίας του FCPC που επικρατούσαν κατά το διαχωρισμό παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 2.7.10. Οι 2 φάσεις του επιλεγμένου συστήματος διαλυτών για το χρωματογραφικό διαχωρισμό με FCPC του κλάσματος LPXDM, διακρίνονται στην Εικ. 7.27 Συνολικά ελήφθησαν 160 κλάσματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός έλεγχος των κλασμάτων με TLC. Ως συστήματα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν μείγματα ACN / CH₂Cl₂ / MeOH (75:5:25) για τις πλάκες κανονικής φάσεως και H₂O / MeOH (90:10) για τις πλάκες αντίστροφης φάσης.



Εικόνα 7.27 Παρασκευή του επιλεγμένου συστήματος διαλυτών (6) για το χρωματογραφικό διαχωρισμό με FCPC του κλάσματος LPXDM. Διακρίνονται οι δύο φάσεις, που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα FCPC

Μετά από παρατήρηση των χρωματογραφήματων στη λυχνία UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και τον ψεκασμό τους με μεθανολικό διάλυμαθειικής βανιλίνης και θέρμανση, έγιναν οι συνενώσεις που φαίνονται στον Πιν. 7.18 και προέκυψαν συνολικά 24

ομάδες. Το συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC για αυτά τα κλάσματα σε σύστημα ανάπτυξης ACN / CH₂Cl₂ / MeOH (75:5:25) παρουσιάζεται στην Εικ. 7.28.

Πίνακας 7.18 Κλάσματα που παρελήφθησαν με το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXDM με FCPC

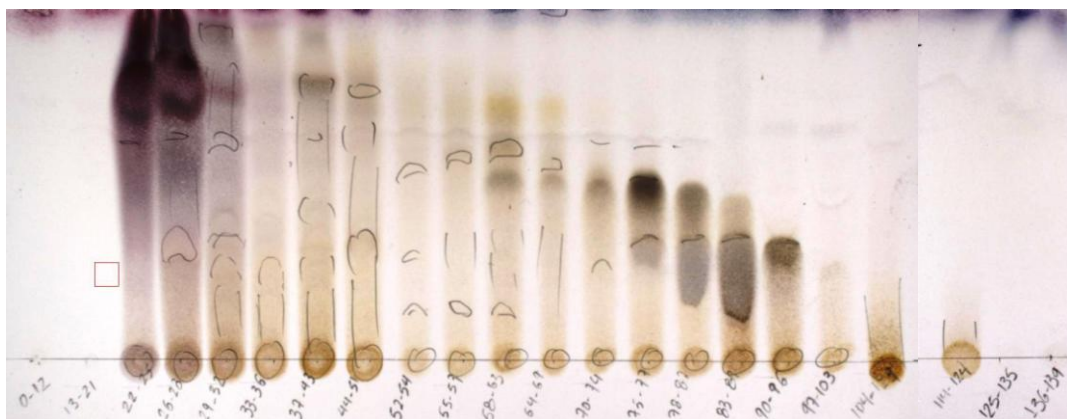
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
0-12	LPXM1	32.0
13-21	LPXM2	45.0
22-25	LPXM3	205.8
26-28	LPXM4	435.8
29-32	LPXM5	} LPXMSE 183.4
33-36	LPXM6	
37-43	LPXM7	187.9
44-51	LPXM8	172.8
52-54	LPXM9	65.3
55-57	LPXM10	75.5
58-63	LPXM11	154.0
64-69	LPXM12	139.2
70-74	LPXM13	166.3
75-77	LPXM14	181.8
78-82	LPXM15	607.4
83-89	LPXM16	545.5
90-96	LPXM17	230.2
97-103	LPXM18	130.7
104-113	LPXM19	266.3
114-116	LPXM20	24.9
117-124	LPXM21	332.5
125-135	LPXM22	395.9
136-139	LPXM23	217.7
140-160	LPXM24	590.7

Τα τελευταία κλάσματα LPXM20-24 μετά και από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων τους σε πλάκες TLC αντίστροφης φάσης, παρατήρησή τους στη λυχνία UV (μήκη κύματος 254 nm και 365 nm) και ψεκασμό τους με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση, διαπιστώθηκε ότι περιέχουν σάκχαρα. Εξάλλου, από την

ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με την χρωματογραφία προσρόφησης (XAD-4), στο μεθανολικό κλάσμα (LPXDM) που παρελήφθη, εκτός από φαινολικά συστατικά είναι πιθανόν να συλλέχτηκαν και κάποια σάκχαρα, για αυτό και δικαιολογείται η ανάκτησή τους στο τελευταίο στάδιο ανάλυσης με την FCPC.

Μετά το χρωματογραφικό έλεγχο των παραπάνω κλασμάτων με TLC αποφασίσθηκε η περαιτέρω μελέτη των κλασμάτων LPXM5-7. Να σημειωθεί ότι τα κλάσματα LPXM5 και LPXM6 συνολικού βάρους 304 mg, έδωσαν παρόμοια εικόνα ύστερα από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων τους TLC και έτσι αναμείχτηκαν για περαιτέρω ανάλυση (LPXM5+LPXM6=LPXMSE).

ACN / CH₂Cl₂ / MeOH (75:5:25)



Εικόνα 7.28 Συγκεντρωτικό χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του κλάσματος LPXM με FCPC

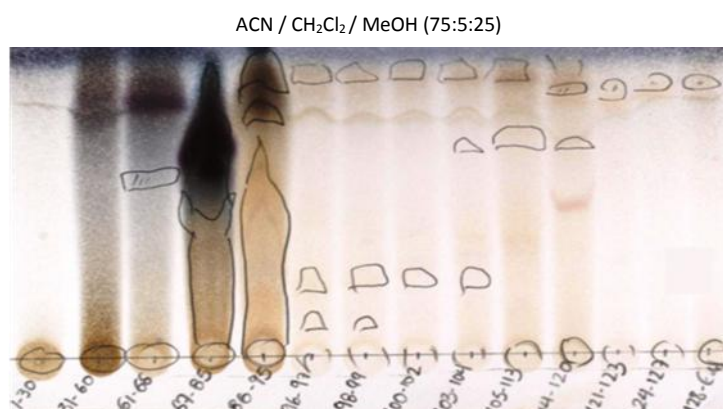
7.5.1.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE

Το κλάσμα LPXMSE υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20 με διαλύτη έκλουσης MeOH 100%. Συνολικά παρελήφθησαν 130 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική TLC συνενώθηκαν σε (14) ομάδες που αναφέρονται στον Πιν. 7.19.

Ο έλεγχος με TLC, ύστερα από παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό έδειξε ότι τα περισσότερα κλάσματα αποτελούσαν μείγματα πολλών ουσιών (Εικ. 7.29). Τα κλάσματα LPXMSE6 και LPXMSE7 φαίνεται να περιέχουν μόρια που απορροφούν στο UV, χωρίς όμως να χρωματίζονται μετά το ψεκασμό με το διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Έτσι, αποφασίστηκε να συνενωθούν για να διαχωριστούν χρωματογραφικά περαιτέρω (LPXMSE6+LPXMSE7=LPPRC). Ακόμα, τα κλάσματα LPXMSE8-10 συνενώθηκαν για περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση (LPXMSE8+LPXMSE9=LPPRD).

Πίνακας 7.19 Κλάσματα που παρελήφθησαν με το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXMSE σε στήλη Sephadex LH-20

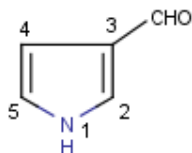
Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-30	LPXMSE1	9.5
31-60	LPXMSE2	43.1
61-66	LPXMSE3	16.4
67-85	LPXMSE4	93.4
86-95	LPXMSE5	39.0
96-97	LPXMSE6	7.0
98-99	LPXMSE7	5.0
100-102	LPXMSE8	4.6
103-104	LPXMSE9	3.1
105-113	LPXMSE10	7.1
114-120	LPXMSE11	3.8
121-123	LPXMSE12	5.0
124-127	LPXMSE13	2.0
128-130	LPXMSE14	3.9

**Εικόνα 7.29** Συγκεντρωτικό Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXMSE κλάσματος σε στήλη Sephadex LH-20

7.5.1.1.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRC

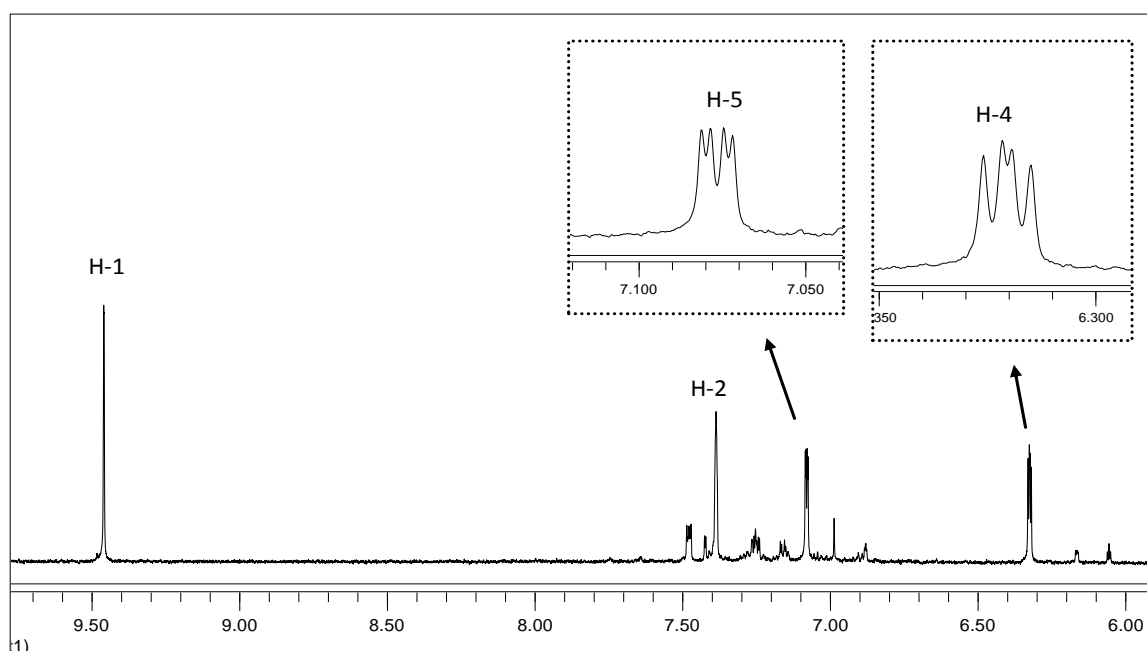
Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος LPPRC (12.0mg), έδειξε ότι αποτελεί μείγμα ουσιών, αν και το βασικό συστατικό του φαίνεται να είναι μια ουσία που απορροφά στα 254 nm (Εικ. 7.29). Για την απομόνωσή της, το κλάσμα υποβλήθηκε σε παρασκευαστική TLC σε γυάλινη πλάκα με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Silica gel 60 F254. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ACN / CH₂Cl₂ / MeOH (75:5:25). Μετά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος και τη λήψη της ουσίας που παρουσίαζε απορρόφηση στο UV,

ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη της με λήψη των φασμάτων NMR μιας ($^1\text{H-NMR}$) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC) σε CD_3OD . Μελετώντας και σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα (Purkarthhofer et al. 2005), διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η 3-φορμυλ πυρρόλη (1*H*-πυρρόλη-3-καρβοξυαλδεΐδη) (**15**), της οποίας η δομή παρουσιάζεται στην Εικ. 7.30.



Εικόνα 7.30 3-φορμυλ πυρρόλη (**15**)

Στο φάσμα πρωτονίου της 3 φορμυλ πυρρόλης (Εικ. 7.31), οι δύο διπλές διπλών κορυφές που εμφανίζονται στα 6.32 και 7.07 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4 και H-5, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 110.7 και 126.7 ppm (HMQC). Στην ίδια περιοχή, συντονίζεται και το πρωτόνιο H-2, που δίνει μια απλή κορυφή στα 7.38 ppm και ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 131.1 ppm (HMQC), όπως παρουσιάζεται στην Εικ. 7.32 Α. Επιπλέον, η απλή κορυφή στα 9.46 ppm, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης. Η χημική μετατόπιση του τεταρτοταγή άνθρακα C-3 βρέθηκε από τη μελέτη του φάσματος 2D HMBC (Εικ. 7.32 Β). Ο C-3, ο οποίος συντονίζεται στα 132.8 ppm, δίνει χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης J^2 με το πρωτόνιο H-2.



Εικόνα 7.31 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 3-φορμυλ πυρρόλης (**15**) σε CD_3OD

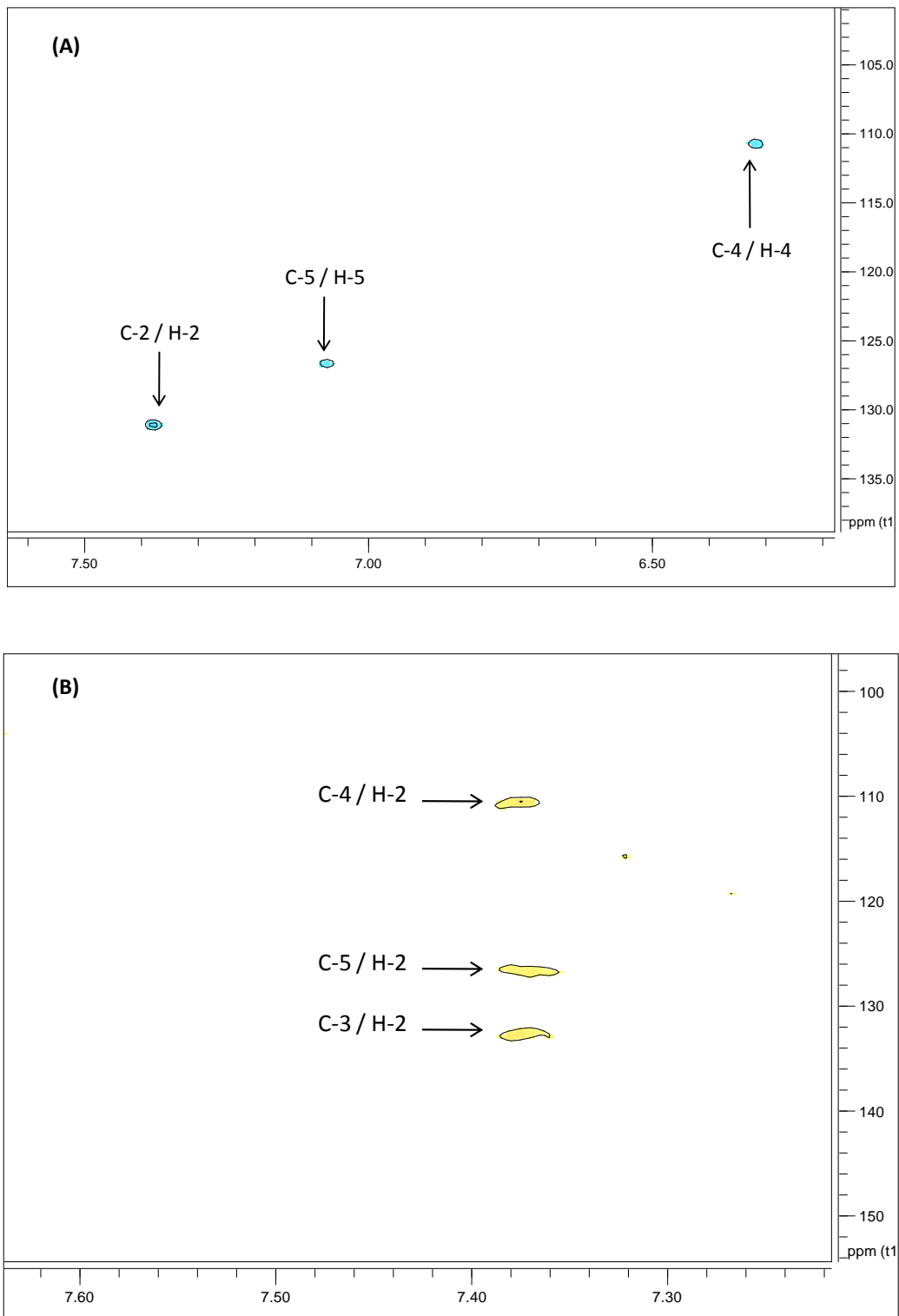
Στον Πιν. 7.20 δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-φορμυλ πυρρόλης σε CD₃OD.

Πίνακας 7.20 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-φορμυλ πυρρόλης (**15**) σε CD₃OD

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
2	7.38 (1H, s)	131.10
3	-	132.80
4	6.32 (1H, dd, J=3.8 / 2.5Hz)	110.70
5	7.07 (1H, dd, J=3.8/1/6Hz)	126.70
3-CHO	9.46 (1H, s)	186.70

Η οικογένεια των πυρρολών περιλαμβάνει οποιαδήποτε οργανική ένωση με πενταμελή δακτύλιο που συνίσταται από τέσσερα άτομα άνθρακα και ένα άτομο αζώτου. Το απλούστερο μέλος της οικογένειας των πυρρολών είναι βεβαίως το πυρρόλιο, μία ένωση με μοριακό τύπο C₄H₅N. Ο πυρρολικός δακτύλιος είναι παρόν στα αμινοξέα προλίνη και υδροξυπυρολίνη, και σε έγχρωμα βιολογικά σημαντικά φυσικά προϊόντα, όπως είναι η χλωροφύλλη, η αίμη (μέρος της αιμοσφαιρίνης) και η χολοχρωστική. Οι ενώσεις με πυρρολικό δακτύλιο αποτελούν και μέλη των αλκαλοειδών (Aiello et al. 2005), που συναντώνται σε είδη φαρμακοδιατροφικού ενδιαφέροντος (Bijev 2008, Mahmood et al. 2010, Raimondi et al. 2006, Rochais et al. 2006). Τα φυσικά προϊόντα με πυρρολικό δακτύλιο παρουσιάζουν πολυποίκιλες και ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις, και μάλιστα έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν κεντρικές ενώσεις για την ανάπτυξη φαρμάκων (Gurton 2006). Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά ή και συνθετικά μόρια με πυρρολικό δακτύλιο παρουσιάζουν αντικαρκινικές, αντιβακτηριδιακές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές ιδιότητες καθώς και δράση εναντίον του HIV ιού (D' Ischia et al. 2008).

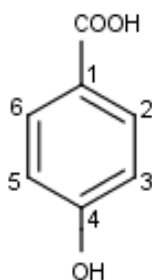
Τα αλκαλοειδή με πυρρολικό δακτύλιο συναντώνται ευρέως στη φύση (Brosi 1971, 1980). Δύο νέα αλκαλοειδή πυρρολίου (γανσΐνη και γανοδίνη) έχουν απομονωθεί πρόσφατα από το μυκήλιο του *G. carpense* (Paterson 2006). Η 3-φορμυλ πυρρόλη αποτελεί φυσικό προϊόν που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *P. ostreatus*. Βέβαια, παρόμοια αλκαλοειδή πυρρολίου, όπως είναι το N-[5-(2-φορμυλ-5-υδροξυμεθυλ-πυρρολ-1-υλ)-βουτυλ]-ακεταμίδιο καθώς και το N-[5-(2-φορμυλ-5-υδροξυμεθυλ-πυρρολ-1-υλ)-πεντυλ]-ακεταμίδιο έχουν απομονωθεί πρόσφατα από τον ενδοφυτικό Ασκομύκητα *Fusarium incarnatum* (Li et al. 2008, Tsuchinari et al. 2007).



Εικόνα 7.32 Φάσματα HMQC (A) και HMBC (B) της 3-φορμυλ πυρρόλης (15)

7.5.1.1.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPPRD

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος LPPRD (7.7 mg), με TLC έδειξε ότι αποτελεί μίγμα ουσιών, που απορροφούν στα 254 nm. Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των επιμέρους ουσιών, το κλάσμα LPPRD υποβλήθηκε σε παρασκευαστική TLC σε γυάλινη πλάκα με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Silica gel 60 F254. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ACN / CH₂Cl₂ / MeOH (75:5:25). Μετά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος αποφασίσθηκε η λήψη μιας ουσίας που παρουσίαζε απορρόφηση στο UV, αλλά δεν έδωσαν κάποιο χρωματισμό μετά το ψεκασμό με το διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Έτσι πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη της με λήψη φασμάτων ¹H-NMR σε CD₃OD. Ύστερα από σύγκριση των φασμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα (Wang M. et al. 2000, Nasfey 1988) αλλά και τη συγχρωματογράφησή της με πρότυπη ένωση διαπιστώθηκε τελικά ότι η ουσία ήταν το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (π-υδροξυβενζοϊκό οξύ) (**16**). Η δομή του παρουσιάζεται στην Εικ. 7.33.

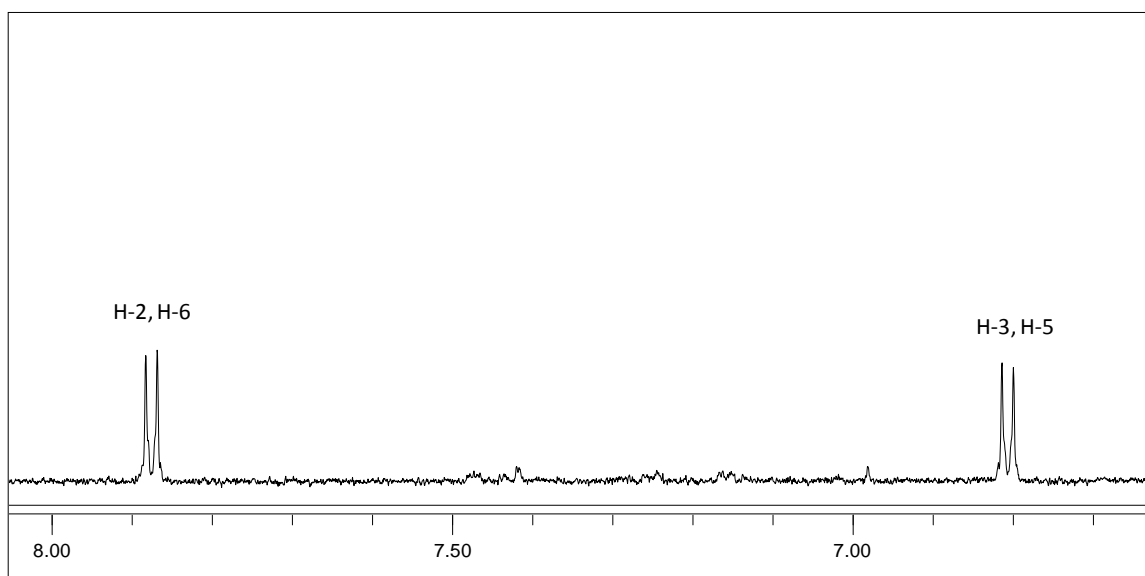


Εικόνα 7.33 π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**16**).

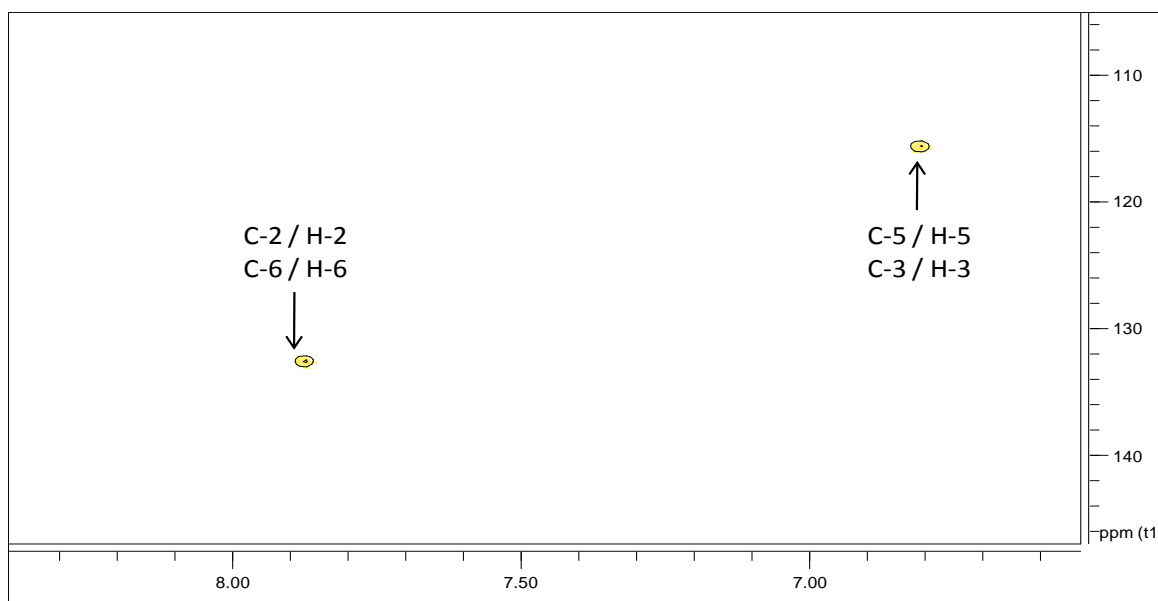
Στο φάσμα ¹H-NMR (σε CD₃OD) εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές ($J = 8.8$ Hz) στα 7.82 και 6.80 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2/H-6 και H-3/H-5, αντίστοιχα (Εικ. 7.34). Ακόμα, με τη βοήθεια πειραμάτων δύο διαστάσεων (HMQC) προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 7.35). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 7.21) αναφέρονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος.

Το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ αποτελεί ένα φαινολικό παράγωγο του βενζοϊκού οξέος που είναι γνωστό και ως π-σαλικυλικό οξύ. Είναι ισομερές του 2-υδροξυβενζοϊκού οξέος, γνωστού ως σαλικυλικό οξύ που αποτελεί και το πρόδρομο μόριο της ασπιρίνης. Το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ αποτελεί την βάση σύνθεσης των εστέρων του, γνωστοί parabens που χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Τα διάφορα parabens και τα άλατά τους είναι αποτελεσματικά εναντίον βακτηρίων και μυκήτων. Ακόμα, χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων (Soni

et al. 2005). Παρά τις πολλές εφαρμογές τους, έχει διαπιστωθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν καρκίνο του μαστού. Τα parabens έχουν επιδείξει ακόμα την ικανότητα να μιμούνται ασθενώς τα φυσικά οιστρογόνα (που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού). Παρόλα αυτά, δεν έχει ακόμα αποδειχτεί αιτιώδης συνάφεια των παράμπενης και του καρκίνου (Harvey & Everett 2004). Το π -υδροξυβενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται επίσης ως διατροφικό αντιοξειδωτικό (Tomas-Barberan & Clifford 2000), αλλά και ως φυσικό άρωμα (Walton et al. 2003).



Εικόνα 7.34 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του π -υδροξυβενζοϊκού οξέος (**16**) σε CD_3OD



Εικόνα 7.35 Φάσμα HMQC του π -υδροξυβενζοϊκού οξέος (**16**)

Πίνακας 7.21 Φασματοσκοπικά δεδομένα του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος (**16**) σε CD₃OD

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	-	121.90
2	7.87 (2H, d, J=8.7 Hz)	132.70
6		
3	6.80 (2H, d, J=8.7 Hz)	115.70
5		
4	-	162.50
1-COOH	-	169.0

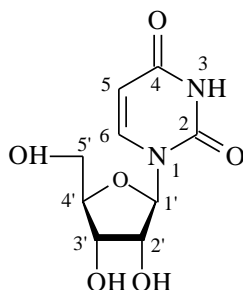
Το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ αποτελεί το πλέον απαντώμενο αρωματικό οργανικό οξύ στο φυτικό βασίλειο, ενώ αποτελεί έναν κοινό φαινολικό δευτερογενή μεταβολίτη πολλών μυκήτων. Οι Nozawa et al. (1989) απομόνωσαν από το υγρό καλλιέργειας του Ασκομύκητα *Talaromyces derxii* τρία παράγωγα του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Ακόμα, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ έχει απομονωθεί από το μεθανολικό εκχύλισμα του Βασιδιομύκητα *Thelephora aurantiotincta* (Quang et al. 2003), από το Βασιδιομύκητα *Russula cyanoxantha* (Ribeiro et al. 2006), από τον Ασκομύκητα *Emarcea castanopsidicola* (Jumpathong et al. 2011), από τα άγρια εδώδιμα μανιτάρια *Amanita rubescens* και *Suillus granulatus* (Ribeiro et al. 2008), καθώς και από τον ενδοφυτικό μύκητα *Lecythophora* sp. (Sugijonto et al. 2009). Πρόσφατα, οι Vaz et al. (2010) μελέτησαν τα φαινολικά συστατικά άγριων εδώδιμων μανιταριών της Πορτογαλίας, και ανίχνευσαν υψηλές συγκεντρώσεις π-υδροξυβενζοϊκού οξέος στο είδος *Fistulina hepatica*, ενώ οι Barros et al. (2009) στο *Agaricus silvicola*. Τέλος, οι Matilla et al. (2001) ανίχνευσαν π-υδροξυβενζοϊκό οξύ στους Βασιδιομύκητες *Agaricus bisporus* και *Lentinus edodes*. Το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ ενώ έχει παραχθεί από διάφορα είδη *Pleurotus* (*P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju*, *P. floridanus*) (Gutiérrez et al. 1994), ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στο *P. ostreatus*.

Στο σημείο αυτό κρίνεται ενδιαφέρον να αναφερθεί ένα πιθανό μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος για το *P. ostreatus*. Ένα δυνατό βιοσυνθετικό μονοπάτι για την παραγωγή αυτού του φαινολικού δευτερογενούς μεταβολίτη, είναι μέσω της βιομεταρροπής της L-φαινυλανίνης, το οποίο αποτελεί ένα αρωματικό αμινοξύ, συστατικό του CSL που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου για την παραγωγή βιομάζας και το οποίο αφομοιώθηκε ικανοποιητικά από τον μακρομύκητα, όπως διαπιστώθηκε σε προηγούμενη ενότητα (5.3.1). Η L-φαινυλανίνη είναι δυνατό να αποαμινωθεί σε *trans*-κινναμικό οξύ μέσω του ενζύμου της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλανίνης. Στη συνέχεια, το *trans*-κινναμικό οξύ μπορεί να υδροξυλιωθεί σε β-

υδροξυφαινυλ-προπιονικό οξύ, το οποίο ακολούθως μετατρέπεται μέσω μιας β-οξειδωσης σε βενζοϊκό οξύ και τελικά σε π-υδροξυβενζοϊκό οξύ με τη δράση της υπεροξειδάσης της λιγνίνης (*LiP*), ένα ένζυμο που συναντάται στις καλλιέργειες του *P. ostreatus* (Lapadatescu et al. 2000).

7.5.1.1.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE10

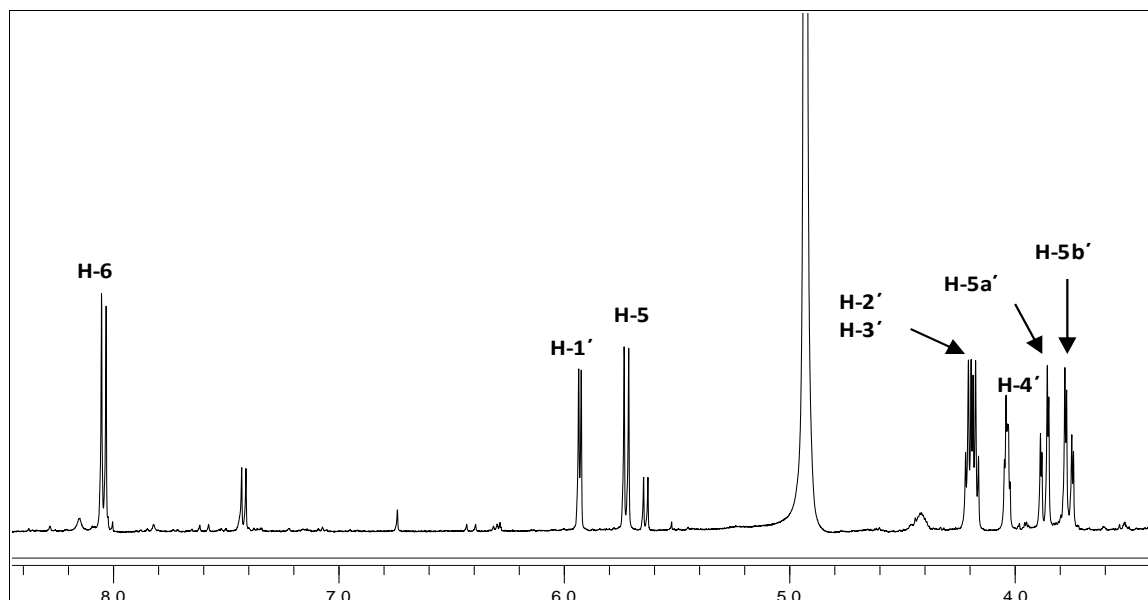
Ο χρωματογραφικός έλεγχος του κλάσματος LPXMSE10 (7.1 mg), έδειξε ότι αποτελεί μείγμα ουσιών, αν και το βασικό συστατικό του φαίνεται να είναι μια ουσία που παρουσίαζε απορρόφηση μετά από παρατήρηση με λυχνία UV ενώ έδωσε καφέ κηλίδα μετά από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση (Εικ. 7.29). Έτσι, το LPXMSE10 κλάσμα αναλύθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο της παρασκευαστικής HPLC, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.7.2.4. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βαθμωτή έκλυση (gradient) χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση, H₂O : ACN (98:2→2:98). Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη με λήψη φασμάτων ¹H-NMR (σε CD₃OD) της ουσίας που απομονώθηκε μέσω της παρασκευαστικής HPLC. Ύστερα από σύγκριση των φασμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα (Kurche & Mikstais 1980) διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η ουριδίνη (**17**). Η δομή του μορίου της ουριδίνης παρουσιάζεται στην Εικ. 7.36.



Εικόνα 7.36 Ουριδίνη (**17**)

Στο φάσμα ¹H-NMR της ουριδίνης (Εικ. 7.37), τα πρωτόνια στις θέσεις 5 και 6 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές στα 5.72 και 8.04 ppm, αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης *J* = 8.2 Hz. Οι κορυφές αυτές, σε σχέση με τις κορυφές των αντίστοιχων πρωτονίων της ουρακίλης, εμφανίζονται πιο αποθωρακισμένες λόγω της παρουσίας του σακχάρου στη θέση 1. Επιπλέον, στα 5.92 ppm εμφανίζεται ως διπλή κορυφή το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου. Στην οξυγονωμένη περιοχή παρατηρήθηκαν δύο σήματα που αντιστοιχούν στα μεθίλια του σακχάρου. Στα 4.18 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' και H-3'. Η κορυφή στα 4.03 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4'. Στην ίδια περιοχή, τα πρωτόνια του μεθυλενίου

εμφανίζονται ως δύο διπλές-διπλών κορυφές στα 3.86 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.4$ Hz) και 3.54 (1H, dd, $J = 12.2 / 2.7$ Hz) ppm. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουριδίνης δίνονται στον Πιν. 7.22.



Εικόνα 7.37 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ουριδίνης (**17**) σε CD_3OD

Η ουριδίνη συμμετέχει στη σύνθεση του RNA και των βιομεμβρανών (σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα λιπίδια) και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη και λειτουργία. Η πρόσληψη της ουριδίνης μέσω της τροφής δεν θεωρείται απαραίτητη. Μελέτες έδειξαν ότι το ήπαρ συνθέτει και αποικοδομεί την ουριδίνη, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στη διατήρηση των επιπέδων της στο πλάσμα. Η ουριδίνη και τα παράγωγά της βοηθούν στη ρύθμιση διαφόρων βιολογικών συστημάτων, όπως είναι το αναπνευστικό, το κυκλοφορικό, το αναπαραγωγικό και το νευρικό σύστημα. Επιπλέον, κλινικές μελέτες αποδεικνύουν τη θεραπευτική και προστατευτική της δράση σε διάφορες παθήσεις. Για παράδειγμα, η τριφωσφορική ουριδίνη (UTP), σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης, του άσθματος και της χρόνιας βρογχίτιδας. Επίσης, η ουριδίνη και ο γλυκοσίδης της διφωσφορικής ουριδίνης μειώνουν την ανεπιθύμητη τοξικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων (Connolly & Duley 1999). Τέλος, οι Lou & Montag (1994) απέδειξαν ότι τα επικρατέστερα κλάσματα των νουκλεοζιτών στους Βασιδιομύκητες είναι η αδενοσίνη, η γουανοσίνη και η ουριδίνη, η τελευταία εκ των οποίων απομονώθηκε από το *P. ostreatus* και στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 7.22 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ουριδίνης (**17**) (CD₃OD)

Θέση	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
2	-	151.96
3		-
4	-	165.68
5	5.72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz)	102.12
6	8.04 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz)	142.15
1'	5.92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4.8 Hz)	90.29
2'	4.98 (2H, <i>m</i>)	75.21
3'		70.79
4'	4.03 (1H, <i>~q</i> , <i>J</i> = 3 Hz)	85.80
5'	Ha 3.86 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2.4 / 12.2 Hz)	61.76
	Hb 3.76 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 2.7 / 12.2 Hz)	

7.5.1.1.4 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXMSE12

Το κλάσμα LPXMSE12 αποτελεί μείγμα ουσιών, αν και το βασικό συστατικό του φαίνεται να είναι μια ουσία που απορροφούσε στο UV, αλλά δεν έδωσε χρώμα μετά το ψεκασμό με το διάλυμα θεϊκής βανιλίνης και θέρμανση. Έτσι, το LPXMSE12 κλάσμα αναλύθηκε περαιτέρω με τη μέθοδο της παρασκευαστικής HPLC, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.7.2.4. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με βαθμωτή έκλουση (gradient) χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση, H₂O : ACN (98:2→2:98). Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας που απομονώθηκε μέσω της παρασκευαστικής HPLC, με λήψη φασμάτων ¹H-NMR (σε CD₃OD). Ύστερα και από σύγκριση των φασμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα (Bednarek et al. 2000, Togashi et al. 2000), διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η ουρακίλη (**14**). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ουρακίλης αναφέρονται σε προηγούμενη ενότητα (παρ. 7.4.3.1).

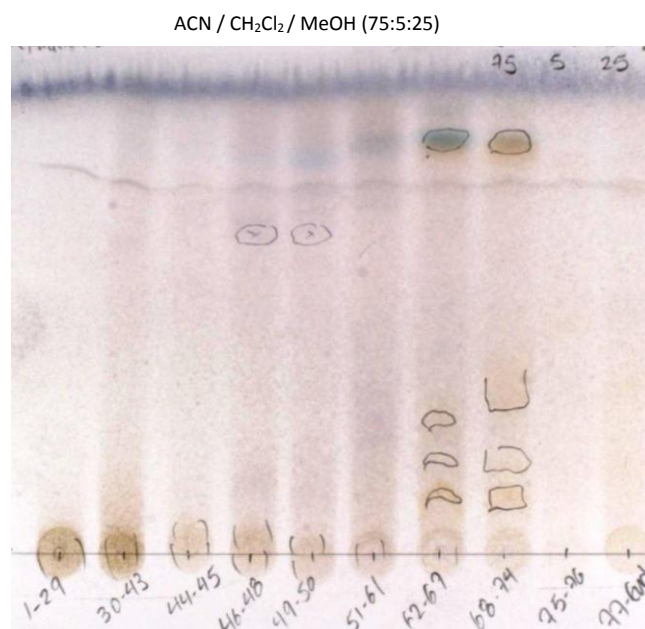
7.5.1.2 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του κλάσματος LPXM7

Το κλάσμα LPXM7 που προέκυψε από την ανάλυση του LPXDM με FCPC, υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20, με διαλύτη έκλουσης MeOH 100 %. Συνολικά παρελήφθησαν 80 κλάσματα, μέσου όγκου 1 mL τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική TLC συνενώθηκαν σε (10) ομάδες που αναφέρονται στον Πιν. 7.23.

Πίνακας 7.23 Κλάσματα που παρελήφθησαν με το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXM7 σε στήλη Sephadex LH-20

Συνενώσεις	Κωδική Ονομασία	Βάρος (mg)
1-29	LPXMSF1	11.2
30-43	LPXMSF2	21.8
44-45	LPXMSF3	7.4
46-48	LPXMSF4	14.7
49-50	LPXMSF5	8.6
51-61	LPXMSF6	30.4
62-67	LPXMSF7	17.1
68-74	LPXMSF8	14.5
75-76	LPXMSF9	3.7
77-80	LPXMSF10	9.5

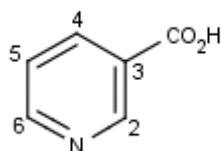
Ο χρωματογραφικός έλεγχος με TLC (παρατήρηση των χρωματογραφημάτων σε λάμπα UV, ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, θέρμανση και παρατήρηση στο ορατό), έδειξε ότι τα περισσότερα κλάσματα αποτελούσαν μείγμα πολλών ουσιών (Εικ. 7.38). Τα κλάσματα LPXMSF7 και LPXMSF8 αποφασίστηκε να συνενωθούν (LPXMSF6+LPXMSF7=LPPRE) για να αναλυθούν περαιτέρω.



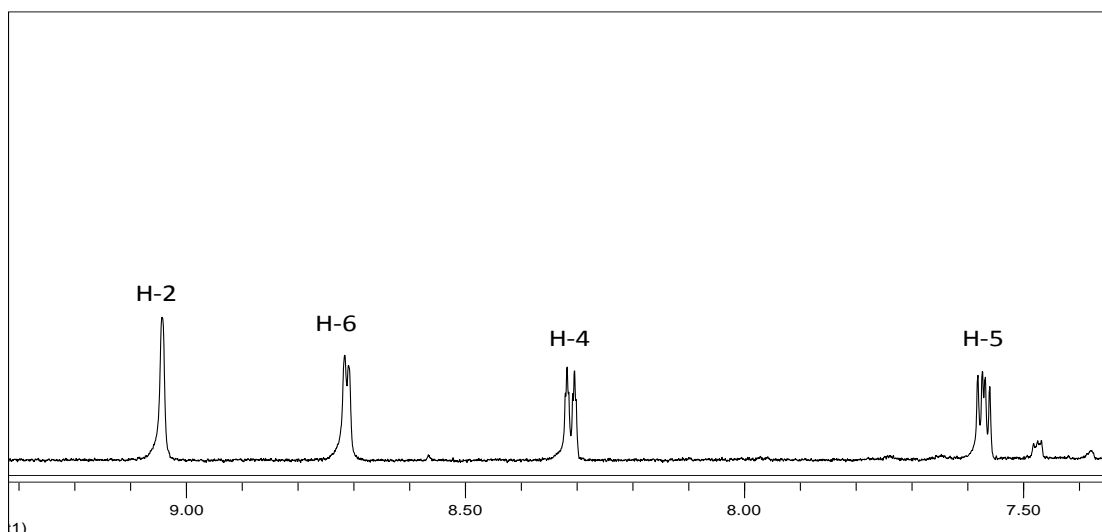
Εικόνα 7.38 Συγκεντρωτικό Χρωματογράφημα TLC κανονικής φάσης για τα κλάσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό διαχωρισμό του LPXM7 σε στήλη Sephadex LH-20

7.5.1.2.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός κλάσματος LPPRE

Το κλάσμα LPPRE (31.6 mg) υποβλήθηκε σε παρασκευαστική TLC σε γυάλινη πλάκα με επίστρωση γέλης πυριτίου τύπου Silica gel 60 F254. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ACN /CH₂Cl₂ /MeOH (75:5:25). Μετά την παρατήρηση του χρωματογραφήματος αποφασίσθηκε η λήψη δύο ουσιών (LPPRE1 και LPPRE2), που παρουσίαζαν απορρόφηση στο UV. Μετά από φασματοσκοπική μελέτη με τη λήψη φάσματος πρωτονίου ¹H-NMR (σε CD₃OD) για την ουσία LPPRE1, και τη σύγκριση με το φάσμα πρότυπης ουσίας από τη βιβλιοθήκη φασμάτων της Aldrich (FT-NMR spectra) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το νικοτινικό οξύ (3-πυριδινοκαρβοξυλικό οξύ) (**18**). Η δομή του μορίου παρουσιάζεται στην Εικ. 7.39.



Εικόνα 7.39 Νικοτινικό οξύ (**18**)



Εικόνα 7.40 Φάσμα ¹H-NMR του νικοτινικού οξέος (**18**) σε CD₃OD

Χαρακτηριστικό του φάσματος ¹H-NMR για το νικοτινικό οξύ (Εικ. 7.40) είναι ότι αποτελείται μόνο από τέσσερις κορυφές οι οποίες εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή. Μάλιστα οι υψηλές τιμές των χημικών μετατοπίσεων είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι στον αρωματικό δακτύλιο υπάρχει άζωτο (πρωτόνια πυριδινικού τύπου). Πιο συγκεκριμένα σε δ 9.04 και 8.71 ppm εμφανίζονται μία απλή και μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 5.0 / 1.9$ Hz)

που αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι γειτονικά στο ετεροάτομο (H-2 και H-6, αντίστοιχα). Τα πρωτόνια H-4 και H-5 εμφανίζονται στα 8.30 ppm (*dt*, $J = 7.9 / 1.7$ Hz) και στα 7.56 ppm (*dd*, $J = 5.0 / 7.8$ Hz) αντίστοιχα. Οι προαναφερόμενες τιμές των σταθερών σύζευξης είναι σε συμφωνία με την ύπαρξη 3-μονοϋποκατεστημένου πυριδινικού δακτυλίου. Στον Πιν. 7.24 παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου.

Οι ουσίες που στο μόριο τους περιέχουν δακτύλιο πυριδίνης παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, για αυτό και συναντώνται ως συστατικά φαρμάκων, βιταμινών, τροφίμων, αρωμάτων, χρωστικών, εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων. Το νικοτινικό οξύ, γνωστό ακόμα και ως νιασίνη ή βιταμίνη Β3, συγκαταλέγεται στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Το νικοτινικό οξύ είναι ένα άγχρωμο, υδατοδιαλυτό παράγωγο της πυριδίνης, με ένα καρβοξυλικό οξύ στη 3-θέση και συναντάται σε πολλούς φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, αφού αποτελεί πρόδρομο μόριο των NADH, NAD⁺, NADP⁺, NADPH και έτσι διαδραματίζει ουσιαστικό μεταβολικό ρόλο στα ζωντανά κύτταρα, αφού περιπλέκεται στην παραγωγή ενέργειας, ως σήμα μεταγωγής και ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων, αλλά και στη σύνθεση των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης και των στεροειδών (Lougenzo et al. 2007). Ουσιαστικά, το νικοτινικό οξύ αποτελεί δομικό συστατικό του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NAD⁺/NADH), που αποτελεί συνένζυμο στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων (οξειδωτική φωσφορυλίωση). Αποτελεί, επίσης, δομικό συστατικό του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADP/NADPH₂), που παίζει σημαντικό ρόλο, ως συνένζυμο μεταφοράς υδρογόνου. Το νικοτινικό οξύ μπορεί να συντεθεί στο ήπαρ από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Ωστόσο το παραγόμενο με αυτή την οδό νικοτινικό οξύ ποσοτικά δεν επαρκεί (Kniir et al. 2000).

Πίνακας 7.24 Φασματοσκοπικά δεδομένα του νικοτινικού οξέος (**18**) σε CD₃OD

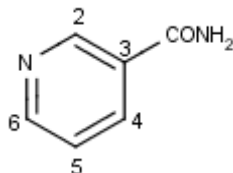
Άτομο	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
2	9.04 (1H, <i>brs</i>)	148.58
3	-	128.8
4	8.30 (1H, <i>dt</i> , $J = 7.9 / 1.7$ Hz)	135.06
5	7.56 (1H, <i>dd</i> , $J = 5.0 / 7.8$ Hz)	125.0
6	8.71 (1H, <i>dd</i> , $J = 5.0 / 1.9$ Hz)	153.4
3-COOH	-	167.7

Τα παράγωγα του νικοτινικού οξέος καθώς και τα ισομερή αυτού, έχει διαπιστωθεί ότι αποτελούν μέσα πρόληψης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Επίσης, έχουν επιδείξει

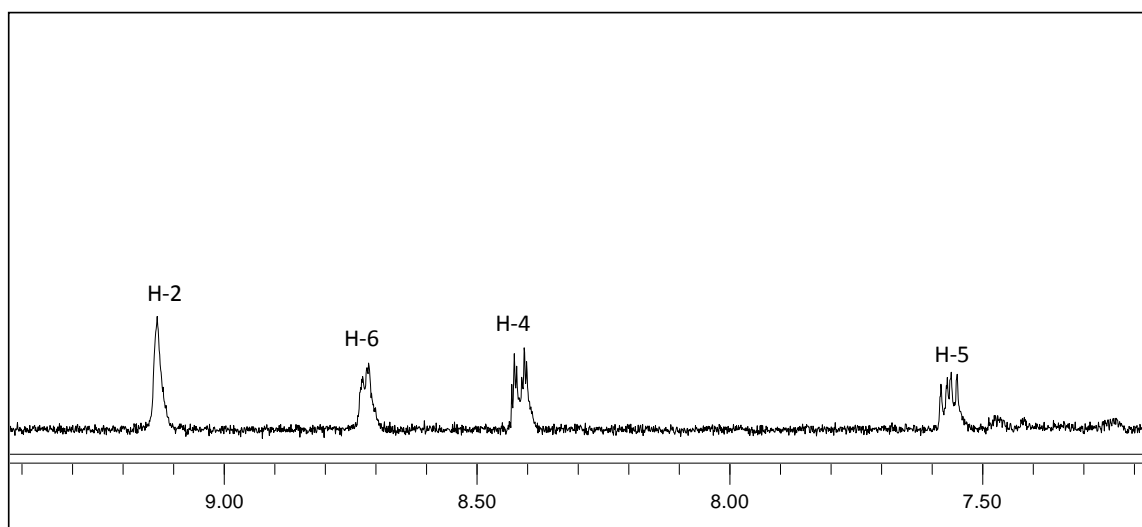
αντιβακτηριδιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, αλλά και θεραπευτική δράση εναντίον της οστεοαρθρίτιδας (Lourenco et al. 2007). Το ανάλογο μόριο του ισονικωτικού, ένα ισομερές του νικοτινικού οξέος, που είναι γνωστό ως ισονιαζίδιο αποτελεί το πιο διαδεδομένο φάρμακο κατά της φυματίωσης (De Souza 2006).

Η έλλειψη του νικοτινικού οξέος προκαλεί πελλάγρα, μία ασθένεια της οποίας τα κύρια χαρακτηριστικά είναι η ανορεξία, αδυναμία, διάρροια, δερματίτιδα και νοητικές διαταραχές. Το νικοτινικό οξύ χρησιμοποιείται ακόμα, για τη μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος σε μεγάλες δόσεις (Robinson 1973). Οι μακρομύκητες αποτελούν πολύ καλή πηγή νικοτινικού οξέος (Matilla et al. 2001). Μάλιστα ειδικά το *P. ostreatus* έχει διαπιστωθεί ότι είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε νικοτινικό οξύ (Çağlarirmak 2007, Matilla et al. 2001).

Τέλος, για την ουσία LPPRE2 πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ (σε CD_3OD). Μετά από σύγκριση του με το φάσμα πρότυπης ουσίας από τη βιβλιοθήκη φασμάτων της Aldrich (FT-NMR spectra, Volume I) αλλά και με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα (Yamashita et al. 1989), διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το νικοτιναμίδιο (3-πυριδινοκαρβοξαμίδιο) (**19**). Η δομή του μορίου φαίνεται στην Εικ. 7.41.



Εικόνα 7.41 Νικοτιναμίδιο (**19**)



Εικόνα 7.42. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του νικοτιναμιδίου (**19**) σε CD_3OD

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του νικοτιναμιδίου (Εικ. 7.42) παρατηρήθηκαν τέσσερις κορυφές που αντιστοιχούν σε αρωματικά πρωτόνια. Το πρωτόνιο H-5 συντονίζεται στα 7.56 ppm και δίνει μία διπλή διπλών κορυφή, λόγω της σύζευξης με τα γειτονικά πρωτόνια H-6 και H-4, που βρίσκονται σε όρθο-θέση. Επίσης, τα πρωτόνια H-4 (1H, *dt*, $J = 7.8 / 1.9$ Hz) και H-6 (1H, *dd*, $J = 5.2 / 7.9$ Hz) συντονίζονται αντίστοιχα στα 8.41 και 8.71 ppm, ενώ η κορυφή που εμφανίζεται στα 9.13 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2. Όλα τα πρωτόνια του νικοτιναμιδίου, όπως και του νικοτινικού οξέος, εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένα λόγω της παρουσίας του αζώτου στον αρωματικό δακτύλιο. Στον Πιν. 7.25 φαίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου.

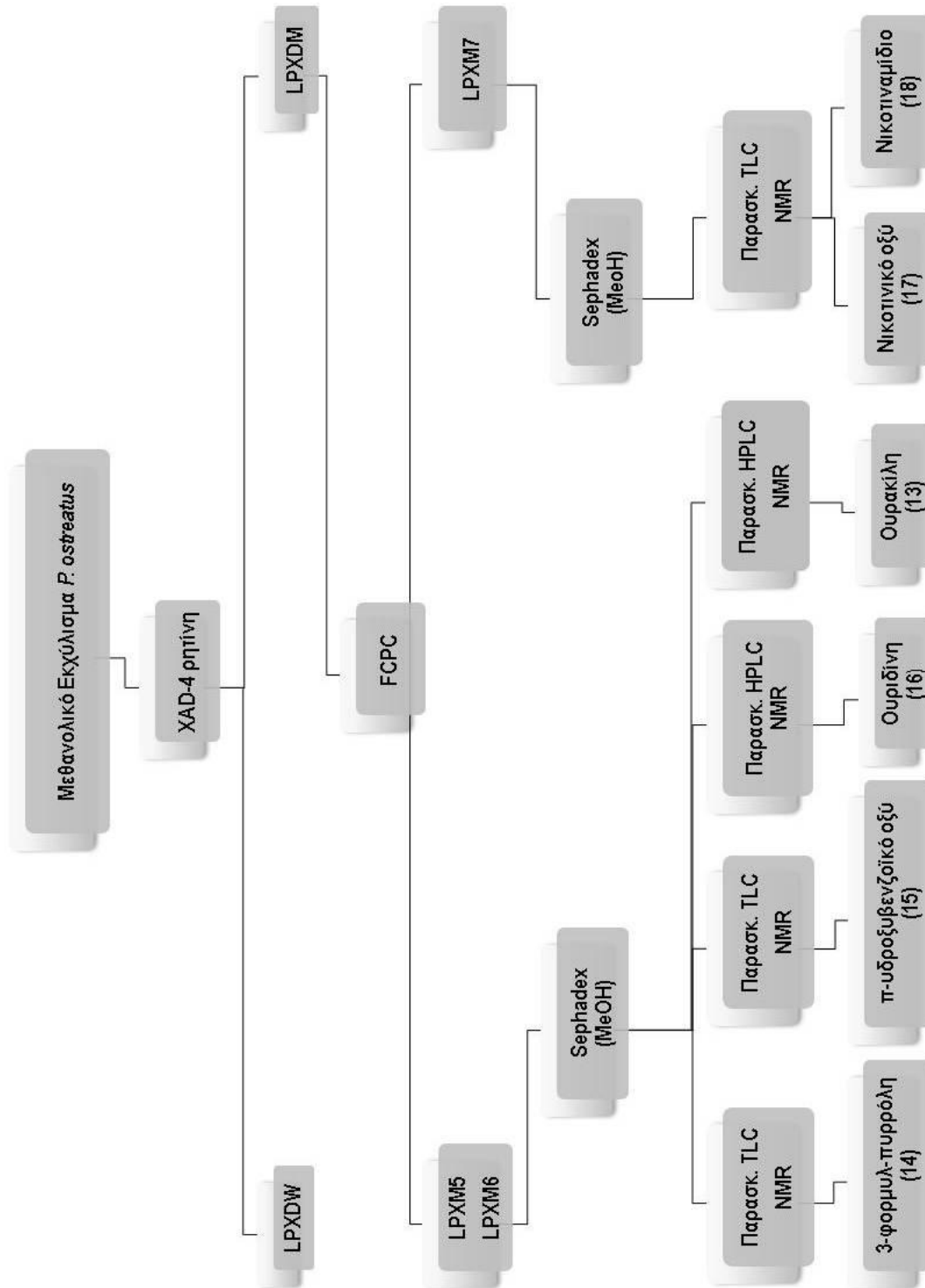
Πίνακας 7.25 Φασματοσκοπικά δεδομένα του νικοτιναμιδίου (**19**) σε CD_3OD

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
2	9.13 (1H, <i>brs</i>)	150.8
3	-	129.56
4	8.41 (1H, <i>dt</i> , $J = 7.8 / 1.9$ Hz)	139.0
5	7.56 (1H, <i>dd</i> , $J = 5.2 / 7.9$ Hz)	123.29
6	8.71 (1H, <i>brd</i> , $J = 5.2$ Hz)	151.77
3- CONH_2		166.42

Το νικοτιναμίδιο γνωστό και ως νιασιναμίδιο είναι το αμίδιο του νικοτινικού οξέος (βιταμίνη Β3/νιασίνη). Συγκαταλέγεται στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες του συμπλέγματος Β. Το νικοτινικό οξύ μετατρέπεται σε νικοτιναμίδιο *in vivo*. Αν και οι δύο μορφές είναι ταυτόσημες ως προς τις βιταμινούχες λειτουργίες τους, δεν επιδεικνύουν κοινές φαρμακευτικές ιδιότητες. Το νικοτιναμίδιο, μέσω του κύριου μεταβολίτη NAD, εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες, όπως στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, τη σύνθεση λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και στεροειδών μορίων. Σε αντίθεση με το νικοτινικό οξύ, το νικοτιναμίδιο δεν έχει αντι-υπερλιπιδαιμικές ιδιότητες (Jacopello 1992). Ωστόσο, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών φαρμακολογικών μελετών. Οι σημαντικότερες βιολογικές δράσεις που έχουν αναφερθεί είναι αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινογενετικές και αντιδιαβητικές. Ακόμα, έχει διαπιστωθεί ότι προλαμβάνει την ανοσοκαταστολή που προκαλούν οι UVA και οι UVB ακτινοβολίες, ενώ δρα και εναντίον της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Επίσης, έχει αποδειχτεί η παρεμποδιστική δράση του νικοτιναμιδίου στην ενζυμική δράση συγκεκριμένων ειδών μυκήτων που προκαλούν μόλυνση της επιδερμίδας (Ciebada-Adamiec et al. 2010). Τέλος, το νικοτιναμίδιο έχει λευκαντική δράση στην επιδερμίδα όταν εφαρμόζεται τοπικά (Jacopello

1992, Niren 2006). Οι Wang et al. (2004) έχουν απομονώσει νικοτιναμίδιο από το Βασιδιομύκητα *Lactarius subplinthogalus*, ενώ πρόσφατα οι Kanagasabapathy et al. (2011) το απομόνωσαν από το *P. sajor-caju*.

Τέλος στο Σχ. 7.2 απεικονίζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση ή/και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών από το μεθανολικό εκχύλισμα του *P. ostreatus*.



Σχέδιο 7.2. Συνοπτική διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης των μεταβολιτών από μεθανολικό εκχύλισμα του *P. ostreatus* ATHUM 4438

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Οι σύγχρονες διαιτητικές τάσεις στα πλαίσια της παγκοσμιοποιημένης διατροφικής κουλτούρας οδηγούν στην κατανάλωση προϊόντων υψηλής θρεπτικής αλλά και γαστρονομικής αξίας. Μεταξύ των τροφίμων αυτών συγκαταλέγονται οι εδώδιμοι μακρομυκήτες, των οποίων η διατροφική αποδοχή την τελευταία δεκαετία αυξάνεται ραγδαία, όχι μόνο για γαστρονομικούς αλλά και για θεραπευτικούς λόγους. Στο φάσμα των βιομηχανικών εφαρμογών των μακρομυκήτων περιλαμβάνονται οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους για παραγωγή ενζύμων, βιολογικά ενεργών ενώσεων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς και βιολειτουργικών συστατικών. Ακόμα, οι μακρομυκήτες βρίσκουν εφαρμογές στη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων και σε διεργασίες που στοχεύουν στην ανακύκλωση βιομηχανικών και αγροτικών απορριμάτων, χάρη στο πλούσιο ενζυμικό δυναμικό τους και την ικανότητά τους να αποδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις.

Στις μέρες μας, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα στην αγορά προϊόντα μακρομυκήτων προέρχονται από τα καρποσώματα, των οποίων η ανάπτυξη γίνεται σε κορμούς δέντρων, σε υποστρώματα από πριονίδι και άλλα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά. Η διεργασία αυτή είναι χρονικά ασύμφορη και ταυτόχρονα όχι πολύ αποδοτική, δεδομένου ότι η τελική σύσταση των καρποσωμάτων είναι εξαιρετικά ασταθής, ενώ υπάρχει μεγάλη διακύμανση στο περιεχόμενό τους σε βιολογικά ενεργές ουσίες. Απεναντίας, η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων είναι μια ταχύτερη και ευκολότερη ελεγχόμενη μέθοδος που έχει προσανατολιστεί στην παραγωγή μυκηλίων μακρομυκήτων με σκοπό την αξιοποίησή τους ως πηγές πρωτεϊνών και ουσιών με βιολογική δράση. Οι υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες των μυκήτων εξάλλου χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή εμπορικά σημαντικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών ουσιών φαρμακολογικού ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα λοιπόν εργασία, βασιζόμενοι στην ελκυστική προοπτική που προσφέρουν οι υγρές βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων για τη βιοτεχνολογική παραγωγή ουσιών με φαρμακοδιατροφικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον, μελετήθηκαν για πρώτη φορά στις συνθήκες αυτές δύο στελέχη μακρομυκήτων που συλλέχτηκαν από τον ελλαδικό χώρο, κατατεθειμένα στη Συλλογή Καλλιεργειών ATHUM του Πανεπιστημίου Αθηνών (*P. ostreatus* ATHUM 4438 και *G. australe* ATHUM 4345). Η επιλογή αυτών των δύο έγινε ύστερα από αξιολόγηση 14 συνολικά ελληνικών στελεχών της ATHUM συλλογής (γέννη *Agaricus*,

Agrocybe, *Clitocybe*, *Ganoderma*, *Pleurotus* και *Polyporus*) ως προς την παραγωγή βιομάζας σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες σε φιάλες, με τη χρησιμοποίηση ενός μέσου ανάπτυξης γενικής εφαρμογής για διαφορετικά είδη Βασιδιομυκήτων (Hagen μέσο). Επιπλέον, τα επιλεγόμενα για περεταίρω μελέτη στελέχη ανήκουν σε είδη διαφορετικού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Το *P. ostreatus* είναι ένα κοσμοπολιτικό εδώδιμο είδος, που η διάδοση του οφείλεται στις οργανοληπτικές και φαρμακολογικές του ιδιότητες καθώς και στην ταχεία ανάπτυξή του σε μη απαιτητικές συνθήκες καλλιέργειας. Σχετικά με τους μακρομύκητες του γένους *Ganoderma* είναι μοναδικοί ως προς την κατανάλωσή τους για την φαρμακευτική τους αξία, παρά ως τροφή. Στην ομάδα των μη εδώδιμων μακρομυκήτων, τα είδη του γένους *Ganoderma*, συμπεριλαμβανομένου και του *G. australe* είναι πολύ σημαντικά όσον αφορά την παραγωγή ενώσεων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον και θεωρούνται σήμερα μια πηγή βιοδραστικών ενώσεων που δεν έχει ερευνηθεί αρκετά και μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων μορίων τα οποία θα αποτελέσουν την βάση πολύτιμων φαρμάκων.

8.1. Συνοπτικά Συμπεράσματα Διδακτορικής Διατριβής

8.1.1 Παραγωγή λειτουργικών διατροφικών συστατικών και βιοενεργών μεταβολιτών από το *G. australe* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας

Με σκοπό την αρχική χαρτογράφηση του μεταβολισμού του *G. australe* για περεταίρω ορθότερο σχεδιασμό του μέσου ανάπτυξης για παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκε η υψηλής απόδοσης μεταβολική ανάλυση με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog η οποία διεξάχθηκε για πρώτη φορά για το συγκεκριμένο είδος μακρομύκητα. Βρέθηκε ότι το μέσο επίπεδο αφομοίωσης (AS_{lev}) των αμινοξέων και των υδατανθράκων από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με των άλλων εξεταζόμενων χημικών ενώσεων της μικροσυστοιχείας που χρησιμοποιούνται σαν πηγές άνθρακα. Εξάλλου, όπως έχει αναφερθεί και στη διεθνή βιβλιογραφία οι υδατάνθρακες αποτελούν τις πιο σημαντικές πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα είδη του γένους *Ganoderma* και χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε αυτού του είδους διεργασίες.

Συγκεκριμένα, οι πηγές άνθρακα με την υψηλότερη μιτοχονδριακή ενεργότητα ($\bar{A} > 1.2$) ήταν 25 υδατάνθρακες, 7 αμινοξέα, 4 καρβοξυλικά οξέα και ένας πολυσακχαρίτης (γλυκογόνο). Η περιορισμένος βαθμός αφομοίωσης των ενδοιάμεσων μεταβολιτών του ΚΚΟ, όπως για παράδειγμα του α -κετογλουταρικού, του μηλικού και του φουμαρικού οξέος από το *G. australe* υποδεικνύουν μια σχετική μεταβολική ανενεργότητα του κύκλου του κιτρικού

οξέος (ΚΚΟ) κατά τη φάση ανάπτυξής του. Ενδιαφέρον είναι ότι για το γλουταμινικό οξύ σημειώθηκε πολύ υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα, γεγονός που φανερώνει ότι προτιμήθηκε περισσότερο από τα άλλα αμινοξέα από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Βασιζόμενοι σε δημοσιευμένα στοιχεία άλλων ερευνητών σχετικά με την απουσία της NADP-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του γλουταμινικού (*NADP-GDH*) από το μεταβολικό μηχανισμό σε άλλο είδους μακρομυκήτα (*P. ostreatus*), συμπεραίνεται ότι τελικά το γλουταμινικό οξύ διοχετεύεται απευθείας στον χαμηλής ενεργότητας ΚΚΟ με σκοπό να τον ενισχύσει αφού ο μεταβολισμός του οδηγεί στη βιοσύνθεση α -κετογλουταρικού οξέος, μέσω της NAD-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του γλουταμινικού (*NAD-GDH*). Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι το *G. australe* αναπτύσσεται καλά σε ένα σύνολο διαφορετικών α - και β - γλυκοζιτών, γεγονός που υποδεικνύει και την παραγωγή διαφορετικών γλυκοζυλ-υδρολασών που απαιτούνται για την υδρόλυση τους με σκοπό την μεταβολική αξιοποίησή τους. Μάλιστα, το συγκεκριμένο στέλεχος φάνηκε να αφομοιώνει καλύτερα τους α -γαλακτοζίτες, (π.χ. σταχυόζη μελιβιόζη, α -μεθυλ-D-γαλακτοζίτης) από ότι τους β -γαλακτοζίτες (π.χ. λακτόζη και β -μεθυλ-D-γαλακτοζίτης).

Με σκοπό τον προσδιορισμό ενός κατάλληλου μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *G. australe*, αρχικά δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικά μέσα που αναφέρονται στη σύγχρονη διεθνή βιβλιογραφία. Το μέσο που περιείχε 12.4 g/L γλυκόζη, 14.0 g/L SM, 2.2 g/L KH_2PO_4 και 0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ επιλέχθηκε για την περαιτέρω πειραματική διαδικασία. Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης εννέα διαφορετικών πηγών άνθρακα (μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες) οι οποίες επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής μιτοχονδριακής ενεργότητας τους που προσδιορίστηκε από την μεταβολική ανάλυση με την FF Biolog μικροσυστοιχεία. Όπως διαπιστώθηκε, η χρησιμοποίηση της γλυκόζης, η μαλτόζης και η μαννόζης είχαν σαν αποτέλεσμα την υψηλότερη παραγωγή βιομάζας συγκριτικά με την χρησιμοποίηση των υπόλοιπων σακχάρων, , χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Η προτίμηση της γλυκόζης από το μικροοργανισμό που έχει εξάλλου αναφερθεί και για άλλα είδη του γένους *Ganoderma*, αποδίδεται στην άμεση ενσωμάτωσή της στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης.

Μετά από δοκιμή διαφορετικών πηγών αζώτου σε υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *G. australe*, διαπιστώθηκε ότι οι σύνθετες πηγές όπως το εκχύλισμα ζύμης (YE), το εκχύλισμα επεξεργασίας σπόρων καλαμποκιού (CSL) και η αλεσμένη σόγια (SM) οδήγησαν σε καλύτερη μυκηλιακή ανάπτυξη σε σχέση με τα δοκιμαζόμενα αμινοξέα και την ουρία. Το γεγονός αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με

προηγούμενες μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι οι περισσότεροι Βασιδιομύκητες, μεταξύ των οποίων και τα είδη του γένους *Ganoderma* προτιμούν τις σύνθετες πηγές αζώτου μιας και αυτές περιέχουν αμινοξέα που δεν μπορούν οι ίδιοι μικροοργανισμοί να τα συνθέσουν. Ανάμεσα στις οργανικές πηγές αζώτου, οι διαφορές που υπάρχουν όσον αφορά τη συνθεση πρωτεϊνών και αμινοξέων ευθύνονται για τις διαφορές που παρατηρούνται σχετικά με της αποδόσεις βιομάζας. Η υψηλότερη μυκηλιακή βιομάζα σημειώθηκε για το μέσο που περιείχε ΥΕ ως πηγή αζώτου, και ακολούθησαν κατά σειρά τα μέσο με το CSL και το SM. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι οι παραπάνω πηγές είναι πλούσιες σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα, όπως γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ, προλίνη, αλανίνη και ασπαραγίνη που μάλιστα φάνηκε αυτά να αφομοιώνονται αποτελεσματικά από το *G. australe*, όπως κιόλας αποδείχτηκε από τις υψηλές τιμές μιτοχονδριακής ενεργότητας που σημειώθηκαν με την FF Βιολογ ανάλυση. Η θετική επίδραση του ΥΕ στην μυκηλιακή ανάπτυξη του *G. australe* πιθανόν να οφείλεται κιόλας στην υψηλή περιεκτικότητα που έχει σε υδατάνθρακες (4-13%) και βιταμίνες. Η προτίμηση του ΥΕ σε σχέση με άλλες πηγές αζώτου έχει αναφερθεί για το *G. lucidum* αλλά και για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων.

Μελετώντας διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και ΥΕ στο δοκιμαζόμενο μέσο ανάπτυξης με σκοπό την εύρεση των άριστων τιμών για μέγιστη παραγωγή βιομάζας, διαπιστώθηκε ότι παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (> 10 g/L), η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρεμποδιζόταν, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης ΥΕ επέδρασε θετικά στην μυκηλιακή ανάπτυξη με άριστη συγκέντρωση τα 25 g/L. Σχετικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με άλλες μελέτες σχετικά με είδη του γένους *Ganoderma*, που αναφέρουν ότι υψηλότερη παραγωγή βιομάζας πετυχαίνεται με αύξηση της χρησιμοποιούμενης αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα, αν και είναι γνωστό ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρου, η μυκηλιακή ανάπτυξη παρεμποδίζεται λόγω ανάπτυξης φαινομένων όσμωσης. Αντιθέτως, η θετική επίδραση της αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης πηγής αζώτου στη μυκηλιακή ανάπτυξη που σημειώθηκε, έχει διατυπωθεί και για άλλους Βασιδιομύκητες.

Για τη μελέτη της συνδυαστικής επίδρασης των συγκεντρώσεων γλυκόζης και ΥΕ στην παραγωγή βιομάζας από το *G. australe* χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (RSM). Έτσι προσδιορίστηκε η επιφανειακή απόκριση της παραγωγής βιομάζας συναρτήσει των αρχικών συγκεντρώσεων γλυκόζης και ΥΕ. Η σχηματιζόμενη επιφάνεια απόκρισης παρουσίασε ένα μέγιστο σημείο. Το άριστο ζεύγος τιμών συγκεντρώσεων γλυκόζης

και YE για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό βρέθηκε να είναι 13.7 g/L γλυκόζη και 30 g/L YE με μέγιστη προβλεπόμενη παραγωγή ξηρής βιομάζας 11.8 g/L. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε την έβδομη ημέρα της κύριας καλλιέργειας, ενώ η παραγωγικότητα έφτασε τα $0.07 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Η παραγόμενη βιομάζα χρησιμοποιώντας το τελικό μέσο ανάπτυξης (13.7 g/L γλυκόζη, 30 g/L YE, 2.2 g/L KH_2PO_4 και 0.4 g/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) αυξήθηκε κατά 75% σε σχέση με τη βιομάζα που ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας το αρχικό μέσο Hagen. Επιπλέον, η παραγόμενη βιομάζα μετά τη διαδικασία αριστοποίησης του μέσου αυξήθηκε κατά 48%. Να αναφερθεί ότι για το συγκεκριμένο είδος μακρομύκητα καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης του μέσου ανάπτυξης στην παραγωγή βιομάζας σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια δεν είναι διαθέσιμη μέχρι σήμερα.

Το άριστο μέσο ανάπτυξης όπως προσδιορίστηκε από τις μικρής κλίμακας πειραματικές σειρές, δοκιμάστηκε και σε καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου βυθισμένης καλλιέργειας όγκου 20 L. Η παραγωγή βιομάζας έλαβε τη μέγιστη τιμή της $10.1 \pm 0.4 \text{ g/L}$ στις 112 h της καλλιέργειας. Η τιμή αυτή σχεδόν συμπίπτει με την αντίστοιχη που σημειώθηκε στις φιάλες, αν και ο απαιτούμενος χρόνος για τη μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη στην περίπτωση της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα υπολογίστηκε κατά 33.3 % λιγότερος σε σχέση με αυτόν στην περίπτωση των υγρών αναδευόμενων καλλιεργειών σε φιάλες. Έτσι, ο ολικός ρυθμός ανάπτυξης (R_x) αυξήθηκε σημαντικά προσεγγίζοντας τα $2.2 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ έναντι της τιμής $1.4 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ για την καλλιέργεια σε φιάλες. Ο αερισμός πιθανόν να είναι ο πλέον σημαντικός παράγοντας για την παρατηρηθείσα αύξηση της παραγωγικότητας όταν η διεργασία πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα, όπου η παροχή αερισμού ρυθμιζόταν ώστε το διαλυτό οξυγόνο να είναι πάνω από το 10% του κορεσμού του. Η εγκυρότητα αυτής της υπόθεσης επιβεβαιώνεται λαμβάνοντας υπόψη ότι ο αερισμός ευνοεί την μυκηλιακή ανάπτυξη καθώς και τη συμπεριφορά των μικροβιακών κυττάρων αφού βελτιώνει τις συνθήκες μεταφοράς μάζας που σχετίζεται με τα υποστρώματα, τα προϊόντα και το οξυγόνο. Επιπλέον, η τιμή $Y_{x/s}$ βρέθηκε κατά 73% περίπου υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που έχει αναφερθεί έως σήμερα για το ίδιο είδος σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας.

Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα βυθισμένης καλλιέργειας, η κυτταρική μάζα αποτελείτο ο από διαφορετικής διαμέτρου, σφαιρικά με λεία επιφάνεια μυκηλιακά συσσωματώματα, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του υγρού της καλλιέργειας στο τέλος της διεργασίας γεγονός που φαίνεται να αποδίδεται στην αύξηση της βιομάζας αλλά και στην παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερικών μεταβολιτών.

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη το ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση των μακρομυκήτων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον, όπως του *G.australe* στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων ως πηγή φαρμακοδιατροφικών συστατικών σε διατροφικά συμπληρώματα, μελετήθηκε η χημική σύσταση της βιομάζας από την ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα σε σχέση με του αντίστοιχου φυσικά απαντώμενου καρποσώματος. Να σημειωθεί ότι αυτή είναι η πρώτη σχετική αναφορά για το συγκεκριμένο είδος *Ganoderma*. Από τη σύγκριση, αποδείχτηκε το μυκήλιο πλουσιότερο σε πρωτεΐνες, λίπος, τέφρα και ολικές γλουκάνες (α - και β -γλουκάνες) από του αντίστοιχου καρποσώματος. Συγκεκριμένα, το μυκήλιο βρέθηκε να είναι περίπου κατά 79%, 76%, 60% και 15% πλουσιότερο σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ολικό λίπος, τέφρα και ολικές γλουκάνες, αντίστοιχα. Η σημαντική μείωση κατά 50% των διαιτητικών ινών που συναντώνται στο μυκήλιο σε σχέση με το αντίστοιχο καρπόσωμα, αφορά τη ύπαρξη της χιτίνης, η οποία αποτελεί και τον επικρατέστερο ανθεκτικό στην πέψη υδατάνθρακα των διαιτητικών ινών. Η παρατηρούμενη όμως αύξηση των διατροφικά πολύτιμων ολικών γλουκανών οδηγεί τελικά και στην παραγωγή διαιτητικών ινών με υψηλότερη βιολογική σημασία. Σε ένα ποσοστό, τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα έως τώρα δεδομένα της βιβλιογραφίας που σχετίζονται με άλλα είδη εδώδιμων μακρομυκήτων, σύμφωνα με τα οποία παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των διαιτητικών ινών και μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο μυκήλιο σε σχέση με το αντίστοιχο καρπόσωμα. Επιπλέον, οι από βιολογικής άποψης πολύτιμες β -γλουκάνες φάνηκε να επικρατούν σε ποσοστιαία βάση των α -γλουκανών και στις δύο μορφές ανάπτυξης του *G. australe* (μυκήλιο και καρπόσωμα) αλλά και στο εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας.

Οι παραπάνω διαφορές που σημειώθηκαν σχετικά με τη χημική σύσταση του μυκηλίου και του αντίστοιχου καρπόσματος του συγκεκριμένου στελέχους, ίσως να δικαιολογούνται λαμβάνοντας υπόψη ότι αντιπροσωπεύουν διαφορετικές φάσεις του βιολογικού κύκλου του Βασιδιομύκητα, μιας και το καρπόσωμα αντιπροσωπεύει την βλαστική, ενώ το μυκήλιο την αναπαραγωγική φάση. Επιπλέον το μυκήλιο αναπτύχθηκε *in vitro* σε απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες που δύσκολα ταυτίζονται με τις πραγματικά υφιστάμενες συνθήκες ανάπτυξης που επικρατούν στην φύση.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης διαφορετικών πηγών άνθρακα και αζώτου στην παραγωγή διαιτητικών ινών και β -γλουκανών σε συνθήκες υγρής βυθισμένης καλλιέργειας του *G. australe* σε αναδευόμενες φιάλες, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά από τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα και αζώτου

στο μέσο ανάπτυξης. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή των βιολογικά ενεργών β-γλουκανών από το *G. australe* βρέθηκε υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη των α-γλουκανών για όλα τα δοκιμαζόμενα μέσα με διαφορετικές πηγές άνθρακα που ελέχθηκαν. Συγκεκριμένα, η γλυκόζη από τα δοκιμαζόμενα σάκχαρα θα μπορούσε να επιλεγεί ως καταλληλότερη πηγή άνθρακα για την ταυτόχρονα υψηλή παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών. Λαμβάνοντας δε υπόψη την υψηλή βιολογική σημασία των β-γλουκανών, η καταλληλότερη πηγή αζώτου φαίνεται να είναι το YE καθώς προήγαγε την παραγωγή διαιτητικών ινών, ενώ συγχρόνως οδήγησε και σε υψηλότερη παραγωγή των β-γλουκανών από το μελετώμενο στέλεχος, σε σύγκριση μάλιστα με το CSL που ενώ έδωσε παραγωγή διαιτητικών ινών στα ίδια επίπεδα με του YE, η παραγωγή των φαρμακοδιατροφικά πολύτιμων β-γλουκανών φάνηκε να υστερεί σημαντικά. Πάντως, συγκρίνοντας τις αποδόσεις διαιτητικών ινών και γλουκανών που ανακτήθηκαν μεταξύ της βυθισμένης καλλιέργεια του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα και στις φιάλες, σε βάση % (w/w) του ξηρού μυκηλίου δεδομένου ότι το μέσο ανάπτυξης έχει την ίδια σύσταση και στις δύο περιπτώσεις, προέκυψε ότι η παραγωγή τους ευνοήθηκε στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα (αύξηση περίπου κατά 20%), γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις ευνοϊκότερες συνθήκες αερισμού που επικράτησαν.

Εν συνεχεία, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων του *G. australe* πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία του μη πολικού λιπαρού εκχυλίσματος που προήλθε από το μυκήλιο και το καρπόσωμα του *G. australe*. Από την ανάλυση, διαπιστώθηκε η παρουσία 31 διαφορετικών λιπαρών οξέων με μήκος ανθρακικής αλυσίδας από 10-22 άτομα άνθρακα. Σε συμφωνία με σχετικές αναφορές για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων, τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα ήταν το λινελαϊκό, το ελαϊκό, το παλμιτικό και το στεαρικό οξύ· τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Μεταξύ των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν, βρέθηκαν στο καρπόσωμα αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα (πενταδεκανοϊκό, επταδεκανοϊκό και κύκλο-επταδεκανοϊκό οξύ), που απουσιάζαν όμως από το προφίλ λιπαρών οξέων του μυκηλίου, με εξαίρεση το επταδεκανοϊκό οξύ, που ανιχνεύτηκε και στις δύο δομές του μακρομύκητα.

Επιπλέον, το λινελαϊκό και το ελαϊκό οξύ, ενώ ανακτήθηκαν σε ίσες περίπου συγκεντρώσεις σε σχέση με το σύνολο των λιπαρών οξέων στο καρπόσωμα, με τη βυθισμένη καλλιέργεια του μακρομύκητα στο βιοαντιδραστήρα, τροποποιήθηκε η παραπάνω αναλογία αφού το λινελαϊκό οξύ επικράτησε σημαντικά έναντι των άλλων λιπαρών οξέων. Απεναντίας,

το στεαρικό και το παλμιτικό οξύ ανιχνεύτηκαν στις ίδιες σχετικές αναλογίες και για τις δύο δομές του μύκητα, γεγονός που αποδεικνύει την απουσία της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας στο συναντόμενο ποσοστό αυτών των κύριων κορεσμένων λιπαρών οξέων. Επίσης, η βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* φάνηκε να ευνόησε την παραγωγή των *trans* λιπαρών οξέων, ενώ παρεμποδίσε την παραγωγή των διατροφικών πολύτιμων α-λινολενικού (ALA), γ-λινολενικού (GLA), αραχιδονικού (ARA), και δεκαεξανοϊκού (DHA) που ανιχνεύτηκαν όμως στο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμα του *G. australe*.

Με τη βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* σε βιοαντιδραστήρα δε φαίνεται να επηρεάστηκε ο λόγος ακόρεστων / κορεσμένων λιπαρών οξέων (UFA / SFA). Παρόλα αυτά, μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) το ποσοστό των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) αλλά αυξήθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) σε σχέση με αυτά του καρποσώματος. Επίσης, αυξήθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) το ποσοστό των ω-6 λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το καρπόσωμα, αφού ο λόγος ω-6 / ω-3 βρέθηκε πάνω από 10 φορές μεγαλύτερος στο μυκήλιο. Αναφορικά με την απόδοση των λιπαρών οξέων ανά μονάδα ξηρού βάρους καρποσώματος ή μυκηλίου του *G. australe*, παρατηρήθηκε 3 και 4 φορές αυξημένη ποσότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αντίστοιχα, στο μυκήλιο του *G. australe*, σε σχέση με το καρπόσωμα.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, γίνεται τελικά φανερό ότι η διεργασία ανάπτυξης του *G. australe* αποτελεί κατευθυντήρια δύναμη της σύνθεσης λιπαρών οξέων, δεδομένου ότι το προφίλ λιπαρών οξέων για όλους τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με την επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών συνθηκών. Μάλιστα, η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου (ME, NADP⁺εξαρτώμενο) που αποτελεί κλειδί ελέγχου για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων από τους μύκητες, είναι γνωστό ότι αυξάνεται όταν χρησιμοποιούνται σύνθετες πηγές αζώτου.

Με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών που παράχθηκαν από το *G. australe* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα, η βιομάζα συλλέχθηκε, πραγματοποιήθηκε διάρρηξη των κυττάρων σε διάλυμα αιθανόλης 50% (v/v) παρουσία 5% (w/v) KOH και κατόπιν εκχύλισή της με οξικό αιθυλεστέρα και κυκλοξάνιο. Από το χρωματογραφικό έλεγχο του ολικού εκχυλίσματος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), παρατηρήθηκε ότι είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα και παράγωγα αυτών μόρια.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκε κλασματοποίηση του αρχικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας τεχνικές υγρής χρωματογραφίας [υγρή χρωματογραφία στήλης

ανοιχτού τύπου υπό κενό (VLC) και παρασκευαστική TLC]. Για την ταυτοποίηση των ουσιών που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν φασματοσκοπικές τεχνικές (^{13}C -NMR, ^1H -NMR και 2D NMR, ESI-HRMS) καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη με τα ήδη δημοσιευμένα σχετικά δεδομένα στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 5 μεταβολίτες και μάλιστα 3 λιπαρά οξέα και 2 τερπενοειδή μόρια. Ειδικότερα, απομονώθηκαν η εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη (**1**), το λινολεϊκό οξύ (**2**), το 19-οκτακοσενοϊκό οξύ (**3**), ένα ανάλογο της αυστρολακτόνης (**4**) και το 9-παλμιτολεϊκό οξύ (**5**).

Το λινολεϊκό οξύ έχει ανιχνευτεί στα καρποσώματα του ίδιου μικροοργανισμού από άλλους ερευνητές και μάλιστα έχει βρεθεί ότι αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ στο προφίλ λιπαρών οξέων αυτού του μακρομύκητα. Εξάλλου και στην παρούσα διατριβή αποδείχτηκε ότι το μυκήλιο που προέκυψε από την βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα ήταν ιδιαίτερα πλούσιο στο διατροφικά πολύτιμο αυτό λιπαρό οξύ. Η παρουσία του στο μυκήλιο δικαιολογείται επίσης από το γεγονός ότι αποτελεί πρόδρομη ουσία πτητικών συστατικών που αποτελούν τα κύρια αρωματικά συστατικά πολλών ειδών μυκήτων.

Επιπλέον, το 19-οκτακοσενοϊκό και το 9-παλμιτολεϊκό οξύ αποτελούν δύο μακράς αλυσίδας ακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία συναντώνται στους μακρομύκητες. Μάλιστα το 9-παλμιτολεϊκό οξύ αποτελεί ένα ιδιαίτερα φαρμακοδιατροφικού ενδιαφέροντος λιπαρό οξύ που ενώ έχει ανιχνευτεί στα καρποσώματα του *G. australe* από άλλους ερευνητές στο παρελθόν, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η παρουσία του στο μυκήλιο του μακρομύκητα από την ανάπτυξή του σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα. Είναι δε αξιοσημείωτο ότι η παρουσία του 19-οκτακοσενοϊκού οξέος που αποτελεί ένα πολύ μακράς αλυσίδας ακόρεστο λιπαρό οξύ, δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν για το *G. australe*, αφού το μεγαλύτερο μήκος ανθρακικής αλυσίδας λιπαρό οξύ που έχει ανιχνευτεί έως σήμερα σε αυτό το είδος είναι το πεντακοσενοϊκό οξύ (C25:1). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα λιπαρά οξέα που απομονώθηκαν είναι σημαντικής φυσιολογικής σημασίας για το *G. australe*, αφού είναι γνωστό ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που συναντώνται στους Βασιδιομύκητες συμβάλλουν στην προσαρμογή τους στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης, καθώς επίσης και στην αποδόμηση της λιγνίνης από αυτούς τους μικροοργανισμούς.

Η εργοστα-5,7,22-τριεν-3β-όλη (εργοστερόλη) που αποτελεί ένα εργοστανικού τύπου τερπένιο είναι η πιο διαδεδομένη στερόλη στους μύκητες και αποτελεί δομικό και λειτουργικό συστατικό της κυτταρικής τους μεμβράνης. Η εργοστερόλη γενικά αποτελεί ένα σημαντικό μεταβολίτη με πολλές εφαρμογές στη χημική, αλλά κυρίως στη φαρμακευτική βιομηχανία

αφού προβάλλει πολλές αξιόλογες φαρμακευτικές ιδιότητες. Στεροειδείς ενώσεις και παράγωγα της εργοστερόλης έχουν απομονωθεί από καρποσώματα αλλά και από τα σπόρια του *G. lucidum*. Αν και η απομόνωση της εργοστερόλης από τα καρποσώματα του *G. australe* έχει αναφερθεί και στο παρελθόν από άλλους ερευνητές, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η παρουσία της στο μυκήλιο του μακρομύκητα προερχόμενο από την ανάπτυξή του σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα. Τέλος, η αυστρολακτόνη που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα καρποσώματα του *G. australe* έχει επιδείξει κυτταστατική δράση. Ένα πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής και των δύο αυτών τερπενοειδών μορίων είναι το μεβαλονικό μονοπάτι (MEV).

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η βυθισμένη καλλιέργεια του *G. australe* οδήγησε στην παραγωγή ήδη γνωστών μεταβολιτών, γεγονός που ενισχύει την εφαρμογή της για την ανάκτηση πολύτιμων φυσικών προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπροσθέτως, η παραγωγή του 19-οκτακοσενοϊκού οξέος που δεν έχει αναφερθεί ξανά για αυτό το είδος, αλλά και του ανάλογου της αυστρολακτόνης που ενδεχομένως να αποτελεί νέο φυσικό προϊόν υποδεικνύει την δυνατότητα αυτής της προτεινόμενης διεργασίας στην παραγωγή νέων χρήσιμων για τον άνθρωπο μεταβολιτών.

8.1.2 Παραγωγή λειτουργικών διατροφικών συστατικών και βιοενεργών μεταβολιτών από το *P. ostreatus* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας

Με βάση την μεταβολική ανάλυση με τη μικροσυστοιχεία FF Biolog που διεξάχθηκε για πρώτη φορά για το *P. ostreatus* με σκοπό την μελέτη της αφομοίωσης διαφορετικών πηγών άνθρακα για τον περαιτέρω ορθότερο σχεδιασμό του μέσου ανάπτυξης, διαπιστώθηκε ότι για τους υδατάνθρακες που αποτελούν και τις πλέον διαδεδομένες πηγές άνθρακα στις διεργασίες ανάπτυξης του γένους *Pleurotus* παρατηρήθηκε ένα υψηλό μέσο επιπέδο αφομοίωσης (AS_{lev}) μαζί με τα δοκιμαζόμενα αμινοξέα, πολυμερείς ενώσεις και καρβοξυλικά οξέα. Συγκεκριμένα, οι πηγές άνθρακα με την υψηλότερη τιμή κανονικοποιημένης μιτοχονδριακής ενεργότητας ($\bar{A}>1.2$) ήταν 18 υδατάνθρακες, 14 καρβοξυλικά οξέα, 10 αμινοξέα και 2 πολυσακχαρίτες (δεξτρίνη και γλυκογόνο).

Η υψηλή αφομοίωση των ενδοιάμεσων μορίων του ΚΚΟ από το *P.ostreatus* όπως και των μεταβολικών παραγώγων τους αποδεικνύουν την υψηλή μεταβολική ενεργότητα του ΚΚΟ κατά τη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, γεγονός που συνηγορεί με τα έως τώρα δεδομένα ότι οι μεταβολικοί κύκλοι της γλυκόλυσης και του ΚΚΟ αποτελούν τις σημαντικότερες

οδούς καταβολισμού των υδατανθράκων κατά τη φάση ανάπτυξης των καρποσωμάτων του *P. ostreatus*. Επιπλέον, η υψηλή μιτοχονδριακή ενεργότητα που σημειώθηκε για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) φανέρωσε την πιθανότητα για λειτουργική GABA παράκαμψη του κύκλου του ΚΚΟ. Είναι ενδιαφέρον ακόμα να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του *P. ostreatus* επέδειξε περιορισμένη ανάπτυξη στα υποστρώματα που ανήκουν στους β-γαλακτοζίτες, σε σχέση με αυτούς που ανήκουν στους α-γαλακτοζίτες. Ακόμα, ο μικροοργανισμός φάνηκε να μεταβολίζει τη ξυλόζη μέσω της αναγωγής της σε ξυλιτόλη από την αναγωγή της ξυλόζης, δεδομένου ότι αναπτύχθηκε τόσο στην ξυλόζη όσο και στην ξυλιτόλη. Επίσης, η μιτοχονδριακή ενεργότητα για τα δοκιμαζόμενα αλκοολικά σάκχαρα με εξαίρεση της D-σορβιτόλης και της D-μαννιτόλης βρέθηκε χαμηλή, γεγονός που πιθανό να οφείλεται στην απουσία κατάλληλων υδρολυτικών ενζύμων από το μεταβολικό μηχανισμό του *P. ostreatus* για την μετατροπή τους σε απλά σάκχαρα πριν αφομοιωθούν. Ειδικότερα, η παρουσία του κύκλου της μαννιτόλης στο μεταβολισμό του *P. ostreatus* έχει αναφερθεί πάλι, αφού αποτελεί γενικότερα το πλέον κατάλληλο αλκοολικό σάκχαρο για την ανάπτυξη των μακρομυκήτων που οφείλεται στο σχηματισμό φρουκτόζης μέσω οξειδωσης της και την επακόλουθη ενσωμάτωσή της στο αναπνευστικό μονοπάτι μετά την φωσφορυλίωση. Τέλος, η προτίμηση της δεξτρίνης από το *P. ostreatus* έχει ξανα-αναφερθεί και από άλλους ερευνητές.

Με σκοπό τον προσδιορισμό του κατάλληλου μέσου ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus*, αρχικά δοκιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά μέσα που αναφέρονται στη σύγχρονη διεθνή βιβλιογραφία. Το μέσο που περιείχε 60 g/L γλυκόζη, 1 g/L πεπτόνη, 2 g/L YE, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L K_2HPO_4 και 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ επιλέχθηκε για την περαιτέρω πειραματική μελέτη.

Σχετικά με την αξιολόγηση διαφορετικών πηγών άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης, διαπιστώθηκε ότι παρουσία ξυλόζης, σημειώθηκε μεγαλύτερη μυκηλιακή ανάπτυξη. Η ξυλόζη έχει αναφερθεί ξανά ως καταλληλότερη πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη άλλων Βασιδιομυκήτων, αν και για τα είδη *Pleurotus* προτείνεται συνήθως η γλυκόζη. Με τη ξυλόζη ως χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του *P. ostreatus*, το σημείο έναρξης του μεταβολισμού φαίνεται να είναι το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η απαίτηση για τον συμπαραγόνα NADPH για την αναγωγή της ξυλόζης σε ξυλιτόλη είναι πιθανό να ικανοποιείται μέσω του κύκλου της μαννιτόλης του οποίου μάλιστα η παρουσία επιβεβαιώθηκε με την FF Biolog μεταβολική ανάλυση. Η αύξηση της βιομάζας που παρατηρήθηκε με τη ξυλόζη ως υπόστρωμα ανάπτυξης του *P. ostreatus* δικαιολογείται και από την έντονη αναπνευστική

δραστηριότητα που απαιτείται για την επανοξειδωση του NADH που παράγεται κατά την οξείδωση της ξυλιτόλης σε ξυλουλόζη.

Επιπλέον, η αποδοτικότερη αφομοίωση των δισακχαριτών (π.χ. μαλτόζη και σουκρόζη) σε σχέση με εκείνη των μονοσακχαριτών (π.χ. γλυκόζη) που παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, πιθανό να οφείλεται σε ένα εξειδικευμένο προφίλ κατανάλωσης των δισακχαριτών από το *P. ostreatus* με τη χρήση κατάλληλων μεταφορέων των σακχάρων μέσα στο μεταβολικό μηχανισμό του μικροοργανισμού καθώς και υδρολυτικών ενζύμων για τη διάσπασή τους, όπως έχει διαπιστωθεί εξάλλου για την αποδοτικότερη αφομοίωση της μαλτόζης από τον *Aspergillus oryzae*. Ακόμα κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα έντονο το φαινόμενο της αυτόλυσης στην περίπτωση της ξυλόζης και της μαλτόζης παρά στις γλυκόζης και της τρεχαλόζης. Η μειωμένη ένταση της αυτόλυσης για την περίπτωση της γλυκόζης πιθανό να οφείλεται στο ότι οι διεργασίες που στενά συνδέονται με τον πρώιμο μεταβολισμό της (π.χ. μεταφορά, φωσφορυλίωση) παρεμποδίζουν την αυτόλυση και την παραγωγή εξωκυτταρικής υδρολάσης, γεγονός που έχει αναφερθεί για τις βυθισμένες καλλιέργειες του *Aspergillus nidulans*. Παράλληλα, σχετικά με την μειωμένη ένταση της αυτόλυσης με την τρεχαλόζη ως πηγή άνθρακα, είναι γνωστό ότι η υψηλή συγκέντρωση τρεχαλόζης στο μέσο ανάπτυξης προστατεύει τα μικροβιακά κύτταρα από την αυτόλυση. Πάντως, συμπεραίνεται ότι η συλλογή της παραγόμενης μυκηλιακής βιομάζας με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα στο μέσο ανάπτυξης τη ξυλόζη δεν πρέπει να ξεπεράσει την έκτη μέρα σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε φιάλες για την αποφυγή της λύσης των κυττάρων.

Σχετικά με την αξιολόγηση διαφορετικών πηγών αζώτου ως προς την παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus*, διαπιστώθηκε όπως και για την περίπτωση του *G. australe*, η προτίμηση των σύνθετων οργανικών πηγών για τους ίδιους λόγους βέβαια που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ανάμεσα στις σύνθετες οργανικές πηγές αζώτου που δοκιμάστηκαν, η χρήση CSL στο μέσο ανάπτυξης οδήγησε σε σημαντικά υψηλή παραγωγή βιομάζας. Η πρότιμηση αυτής της οικονομικά συμφέρουσας πηγής αζώτου από το *P. ostreatus* έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Αυτό ίσως οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση του CSL σε άζωτο, υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ελεύθερα αμινοξέα, (π.χ. προλίνη, σερίνη, αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, θρεονίνη, ασπαρτικό οξύ, φαινυλανίνη και ασπαραγίνη) τα οποία μάλιστα με βάση τα αποτελέσματα της μεταβολικής ανάλυσης με την FF Biolog μικροσυστοιχεία αφομοιώθηκαν ικανοποιητικά από το εξεταζόμενο στέλεχος του *P. ostreatus*.

Από τα πειράματα μελέτης της επίδρασης διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων ξυλόζης του μέσου ανάπτυξης στην παραγωγή μυκηλιακής βιομάζας από το *P. ostreatus*, διαπιστώθηκε ότι ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης της ξυλόζης, η μυκηλιακή ανάπτυξη αυξανόταν, παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων ξυλόζης (>60 g/L) σημειώθηκε σημαντική μείωση (περίπου κατά 83%), εξαιτίας προφανώς της ανεπιθύμητης ανάπτυξης οσμωτικών φαινομένων στην καλλιέργεια. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και για άλλους Βασιδιομύκητες με το όριο για την εκδήλωση παρεμποδιστικής δράσης λόγω όσμωσης να κυμαίνεται από 40 έως 70 g/L σακχάρου. Από την άλλη, η αύξηση της συγκέντρωσης CSL, επηρέασε θετικά την παραγωγή βιομάζας, με άριστη τιμή τα 40 g/L, πέρα από την οποία σημειώθηκε σημαντική μείωση της απόδοσης. Η παρουσία ορισμένων παρεμποδιστών ανάπτυξης στη σύσταση του CSL μάλλον ευθύνονται για αυτό το αποτέλεσμα.

Μέσω της μεθοδολογίας της επιφανειακής απόκρισης, μελετήθηκε και η συνδυαστική επίδραση των συγκεντρώσεων ξυλόζης και CSL στην παραγωγή βιομάζας του *P. ostreatus*, με σκοπό τον ορισμό της άριστης σύστασης του μέσου για μυκηλιακή ανάπτυξη. Το άριστο ζεύγος τιμών συγκεντρώσεων ξυλόζης και CSL για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό βρέθηκε να είναι: 57 g/L ξυλόζη και 37 g/L CSL με μέγιστη προβλεπόμενη παραγωγή ξηρής βιομάζας 24.5 g/L. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε την έβδομη ημέρα της κύριας καλλιέργειας. Συμπερασματικά, η παραγόμενη βιομάζα χρησιμοποιώντας το τελικό μέσο ανάπτυξης (57g/L ξυλόζη, 37g/L CSL, 1 g/L K_2HPO_4 και 0.2g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) αυξήθηκε περίπου κατά 87 % σε σχέση με την βιομάζα που ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας το αρχικό μέσο Hagen. Επιπλέον, με την αριστοποίηση του μέσου η παραγόμενη βιομάζα αυξήθηκε περίπου κατά 15 %.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το άριστο μέσο ανάπτυξης που προσδιορίστηκε σε υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου 20-L, επιτεύχθηκε μια μέγιστη παραγωγή βιομάζας 39.2 g/L μετά από 68h καλλιέργειας. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης υπολογίστηκε ότι ήταν μεγαλύτερος κατά 22 % περίπου σε σχέση με τον αντίστοιχο που έχει αναφερθεί ξανά για τον ίδιο μικροοργανισμό. Επιπλέον, η τιμή $Y_{x/s}$ καθώς και της παραγωγικότητας που υπολογίστηκε για την παρούσα μελέτη, βρέθηκε υψηλότερη από τα έως σήμερα δεδομένα για τον ίδιο μικροοργανισμό σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα. Ακόμα, η παραγωγή ξηρής βιομάζας που ανακτήθηκε από την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα ήταν κατά 38% μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν που ανακτήθηκε στις υγρές αναδευόμενες καλλιέργειες μικρής κλίμακας, ενώ ο χρόνος που

απαιτήθηκε για την μέγιστη παραγωγή ήταν σχεδόν ο μισός. Σημαντικός παράγοντας για αυτήν την αυξημένη παραγωγή βιομάζας, αλλά και της παραγωγικότητας (κατά 71.3% περίπου) που προέκυψε από την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τις φιάλες, είναι προφανώς οι ευνοϊκότερες συνθήκες αερισμού κατά τη διεργασία στο βιοαντιδραστήρα.

Ακόμα, να σημειωθεί ότι όταν ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε, και συγκεκριμένα στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα, διαφοροποιήθηκαν τα μυκηλιακά συσσωματώματα, αφού προσέλαβαν ένα σκούρο χρωματισμό και έγιναν πιο σκληρά, γεγονός που δεν είχε παρατηρηθεί στις υγρές αναδεδυόμενες καλλιέργειες σε φιάλες. Η παρατήρηση των μυκηλιακών συσσωματωμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο αποκάλυψε σκουρόχρωμους μικροϊνώδεις σχηματισμούς στο εσωτερικό τους. Η μαύρη χρωστική που παράχτηκε πιθανόν να είναι μελανίνη, και έχει μάλιστα αναφερθεί ξανά για το μυκήλιο και το καρποσώμα του *Pleurotus cystidiosus*. Επίσης, όπως και στην περίπτωση της ανάπτυξης του *G. australe* στο βιοαντιδραστήρα, στο τέλος της καλλιέργειας του *P. ostreatus* παρατηρήθηκε αύξηση του ιξώδους του υγρού καλλιέργειας που αποδίδεται στην παραγωγή εξωπολυσακχαριτών.

Από την συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης της βιομάζας του *P. ostreatus* από την ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα και του φυσικά απαντώμενου καρποσώματος του συγκεκριμένου στελέχους, διαπιστώθηκε το μυκήλιο να είναι πλουσιότερο σε διαιτητικές ίνες και λιπαρές ενώσεις. Συγκεκριμένα, το μυκήλιο βρέθηκε περίπου κατά 30% και 76% πλουσιότερο σε διαιτητικές ίνες και ολικό λίπος, αντίστοιχα. Απεναντίας, σημειώθηκε περίπου 42%, 61% και 36% μείωση των ολικών γλουκανών, των πρωτεϊνών και της τέφρας στο μυκήλιο αντίστοιχα. Παρόμοια διαφορά στη χημική σύσταση του μυκηλίου σε σχέση με του φυσικά απαντώμενου καρποσώματος είναι γνωστή για διάφορα είδη του γένους *Pleurotus*. Άρα, είναι φανερό ότι και το ελληνικό στέλεχος *P. ostreatus* που μελετήθηκε υπακούει στα ως τώρα σχετικά δεδομένα όπως έχουν καταγραφεί για το γένος *Pleurotus*. Βέβαια, το ποσοστό διαιτητικών ινών που ανακτήθηκε από την ανάπτυξη του εξεταζόμενου μικροοργανισμού σε βυθισμένη καλλιέργεια, είναι το υψηλότερο σε σχέση με τα έως σήμερα δεδομένα για το μυκήλιο του γένους *Pleurotus*. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι στις ολικές διαιτητικές ίνες της μυκηλιακής δομής του μακρόμυκητα μάλλον προτεύοντα ρόλο παίζει η χιτίνη έναντι των γλουκανών. Επιπλέον, οι από βιολογικής άποψης πολύτιμες β-γλουκάνες φάνηκε να επικράτουν έναντι των α-γλουκανών και στις δύο μορφές ανάπτυξης του *P. ostreatus* (μυκήλιο

και καρπόσωμα) αλλά και στο εξωκυτταρικό υγρό της καλλιέργειας. Βέβαια, σε σύγκριση με το περιεχόμενο ολικών γλουκανών στο μυκήλιο, στο εξωκυτταρικό υγρό ανακτήθηκε υποτετραπλάσια συγκέντρωση αυτών. Πάντως, οι παραπάνω διαφορές που σημειώθηκαν σχετικά με τη χημική σύσταση του μυκηλίου και του αντίστοιχου καρποσώματος, οφείλονται στους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν για την αντίστοιχη μελέτη του *G. australe*.

Η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών σε συνθήκες υγρής βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* σε αναδεδυόμενες φιάλες, διαπιστώθηκε ότι επηρεάζεται σημαντικά από τη χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα και αζώτου. Έτσι, για οικονομικά συμφέρουσα μέγιστη απόδοση των διατροφικά πολύτιμων και βιολογικά ενεργών αυτών πολυσακχαριτών, η μαλτόζη και το ΥΕ κρίθηκαν οι καταλληλότερες πηγές άνθρακα και αζώτου αντίστοιχα, μεταξύ αυτών που δοκιμάστηκαν. Έχει αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες ότι η χρήση πολυμερών σακχάρων (δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες) σε σχέση με μονοσακχαρίτες ως πηγές άνθρακα σε βυθισμένες καλλιέργειες των μακρομυκήτων προωθεί την παραγωγή πολυσακχαριτών, γεγονός που πιθανόν να αποδίδεται στην ύπαρξη μοριακών μηχανισμών πολυμερισμού. Η ξυλόζη και η τρεχαλόζη φάνηκε να προάγουν την παραγωγή χιτίνης εις βάρος όμως της παραγωγής γλουκανών. Είναι αξιοσημείωτο ότι για όλα τα δοκιμαζόμενα μέσα, με εξαίρεση αυτό που περιείχε ως πηγή άνθρακα τη σουκρόζη, παράχθηκε αναλογικά υψηλότερη συγκέντρωση β-γλουκανών σε σχέση με τις α-γλουκάνες. Ακόμα, η προτίμηση σύνθετων πηγών αζώτου από το *P. ostreatus* για μυκηλιακή ανάπτυξη και παραγωγή πολυσακχαριτών, φανέρωσαν την παρουσία πρωτεολυτικού μηχανισμού για την υδρόλυση πρωτεϊνών κατά τη διεργασία ζύμωσης του, καθώς είναι γνωστό ότι στους Βασιδιομύκητες, συγκεκριμένα απαραίτητα αμινοξέα δεν είναι δυνατό να συντεθούν από απλές ανόργανες πηγές αζώτου. Ενώ το CSL έδωσε υψηλότερη παραγωγή διαιτητικών ινών, διαπιστώθηκε ότι ενθάρρυνε τελικά περισσότερο τη συσσώρευση χιτίνης από την παραγωγή γλουκανών, σε σύγκριση με το ΥΕ. Τέλος, συγκρίνοντας τις αποδόσεις διαιτητικών ινών και γλουκανών που ανακτήθηκαν μεταξύ της βυθισμένης καλλιέργειας του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα και στις φιάλες σε βάση % (w/w) του ξηρού μυκηλίου δεδομένου ότι το μέσο ανάπτυξης έχει την ίδια σύσταση και στις δύο περιπτώσεις, προέκυψε το ίδιο συμπέρασμα με την αντίστοιχη περίπτωση του *G. australe*. Συγκεκριμένα, η παραγωγή διαιτητικών ινών και γλουκανών ευνοήθηκε στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα (αύξηση κατά μέσον όρο 40.5% και 35.8%, αντίστοιχα) όπου επικράτησαν κατάλληλες συνθήκες αερισμού.

Συνεχίζοντας, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της βυθισμένης καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα στο προφίλ λιπαρών οξέων του *P. ostreatus* πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση με GC του μη πολικού λιπαρού εκχυλίσματος που προήλθε από το μυκήλιο και το καρπόσωμα του μικροοργανισμού. Το συμπέρασμα ήταν ότι η βυθισμένη καλλιέργεια του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα επηρέασε τα ποσοστά των λιπαρών οξέων τα οποία παρατηρήθηκαν στο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμα, αφού σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) μεταξύ των ποσοστών των λιπαρών οξέων μεταξύ των δύο δομών, γεγονός που πιθανόν αποδίδεται στο διαφορετικό υλικό που αναλύθηκε (καρπόσωμα/μυκήλιο) αλλά και στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν. Δεδομένου ότι η χρήση σύνθετων πηγών αζώτου, όπως CSL που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση στην υγρή αναδευόμενη καλλιέργεια του *P. ostreatus* πιθανά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να αύξησε τη δραστικότητα του μηλικού ενζύμου (ME, NADP^+ -εξαρτώμενο) που ελέγχει τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, δικαιολογείται η παραπάνω παρατήρηση.

Συγκεκριμένα, από την ανάλυση διαπιστώθηκε η παρουσία 28 και 20 διαφορετικών λιπαρών οξέων στο μυκήλιο και στο καρπόσωμα αντίστοιχα, με μήκος ανθρακικής αλυσίδας από 10-24 άτομα άνθρακα. Σε συμφωνία με σχετικές αναφορές για το ίδιο είδος άλλα και για άλλα είδη Βασιδιομυκήτων, τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα και στις δύο δομές ήταν το λινελαϊκό, το ελαϊκό, το παλμιτικό και το στεαρικό οξύ. Μάλιστα, το λινελαϊκό οξύ αποδείχτηκε το επικρατέστερο λιπαρό οξύ στο καρπόσωμα του *P. ostreatus*. Ωστόσο, η βυθισμένη καλλιέργεια του μακρομύκητα στο βιοαντιδραστήρα, φαίνεται να διαφοροποίησε τις σχετικές αναλογίες των λιπαρών οξέων, αφού στο μυκήλιο επικράτησαν το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ σε περίπου ίσα ποσοστά. Η αναλογική μείωση του ποσοστού του λινελαϊκού οξέος που παρατηρήθηκε στο μυκήλιο σε σχέση με το καρπόσωμα είναι περίπου ίση με αυτήν που έχει αναφερθεί παλαιότερα σε αντίστοιχη μελέτη για το ίδιο είδος. Μεταξύ των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν, βρέθηκαν στο καρπόσωμα λιπαρά οξέα με μονό αριθμό ατόμων άνθρακα (πενταδεκανοϊκό, επταδεκανοϊκό και κύκλο-επταδεκανοϊκό οξύ), που απουσιάζαν όμως από το προφίλ λιπαρών οξέων του μυκηλίου, με εξαίρεση το επταδεκανοϊκό οξύ, που ανιχνεύτηκε και στις δύο δομές του μακρομύκητα. Η παρουσία τέτοιων λιπαρών οξέων για το καρπόσωμα αυτού του μακρομύκητα είναι ήδη γνωστή. Επιπροσθέτως, με τη βυθισμένη καλλιέργεια του μικροοργανισμού, φαίνεται να μειώθηκε σημαντικά ($P < 0.05$) η συγκέντρωση του α -λινολενικού, γ -λινολενικού, του αραχιδονικού και του δοκοσαεξανοϊκού οξέος σε σχέση με των αντίστοιχων λιπαρών οξέων του καρποσώματος, μάλλον λόγω παρεμπόδισης της σύνθεσής

τους. Απεναντίας, στο μυκήλιο φαίνεται να συντέθηκε το διατροφικά πολύτιμο εικοσιπεντανοϊκό οξύ, που απουσίασε όμως από το προφίλ λιπαρών οξέων του φυσικά απαντώμενου καρποσώματος.

Η βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* σε βιοαντιδραστήρα επέφερε 50% σχεδόν αύξηση στο ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων, σε σχέση με αυτό που περιέχει ο μακρομύκητας στο φυσικά απαντώμενο καρπόσωμά του. Το αποτέλεσμα είναι η σημαντική μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο μυκήλιο σε σχέση με του καρποσώματος. Η παρατηρούμενη αύξηση των κορεσμένων και μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο μυκήλιο σε σχέση με του καρποσώματος έχει αναφερθεί παλαιότερα και από άλλους ερευνητές για το ίδιο είδος. Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι το καρπόσωμα του *P. ostreatus* περιείχε σημαντικά ($P < 0.05$) υψηλότερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που το οφείλει βεβαίως στην κύρια παρουσία του λινελαϊκού οξέος, σε αντίθεση με το μυκήλιο που περιείχε σημαντικό υψηλότερο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων λόγω της υψηλής αναλογίας του ελαϊκού οξέος στο σύνολο των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν.

Με σκοπό την απομόνωση των μεταβολιτών που παράχτηκαν από το *P. ostreatus* σε υγρή βυθισμένη καλλιέργειά του σε βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκε μια αρχική δοκιμαστική εκχύλιση ενός μέρους της βιομάζας με οξικό αιθυλεστέρα-κυκλοεξάνιο όπως εφαρμόστηκε στην αντίστοιχη μελέτη του *G. australe*. Μετά την ανάλυση του εκχυλίσματος που προέκυψε με υγρή χρωματογραφία στήλης ανοιχτού τύπου υπό κενό (VLC) και το χρωματογραφικό έλεγχο των κλασμάτων με TLC, πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος έλεγχος του προφίλ των εκχυλιζόμενων ενώσεων. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι τα λιπαρά οξέα κυριαρχούν, γεγονός που καθιστά δυσχερή την απομόνωση των μορίων με περισσότερο ενδιαφέρον. Έτσι αποφασίστηκε τελικά η εκχύλιση της βιομάζας με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE), κατά την οποία παρελήφθησαν τέσσερα εκχυλίσματα, το κυκλοεξανικό, που ήταν πλούσιο σε λιπαρά οξέα, το διχλωρομεθανικό, το μεθανολικό και το υδατικό που ήταν πλούσιο σε σάκχαρα. Η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών και η εφαρμογή πίεσης κατά τη μέθοδο αυτή, συντέλεσε στην επιτάχυνση της διαδικασίας παραλαβής των ουσιών. Επιπλέον, η ασκούμενη πίεση στο δοχείο εκχύλισης του δείγματος επέτρεψε στο διαλύτη να εισχωρήσει αποτελεσματικότερα στους ιστούς του δείγματος, ενώ η δυνατότητα για διαδοχική χρήση διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης προσέφερε αφενός μεν την εκχύλιση ολόκληρου του φάσματος των μεταβολιτών και αφετέρου μια πρώτη καλή κλασμάτωση, ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία απομόνωσης.

Από το διχλωρομεθανικό και μεθανολικό εκχύλισμα απομονώθηκαν οι κυριότεροι μεταβολίτες του *P. ostreatus* με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών. Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπικές τεχνικές 1D/2D NMR (HMQC, HMBC), συγκρίσεις φασμάτων NMR και χημικές συσχετίσεις σε συνδυασμό με GC/MS αναλύσεις.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος βασίστηκε κυρίως στις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης (MPLC), του μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20, καθώς και της παρασκευαστικής TLC. Βασικά συστατικά του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του είδους *P. ostreatus* αποτέλεσαν λιπαρά οξέα και παράγωγά τους, καθώς και δύο φαινολικούς μεταβολίτες, ένα αλκαλοειδές και ένα νουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα: το παλμιτικό οξύ (**1**), ο μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος (**2**), ο μεθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος (**3**), ο αιθυλεστέρας του λινολεϊκού οξέος (**4**), το στεαρικό οξύ (**5**), ο αιθυλεστέρας του στεαρικού οξέος (**6**), το ελαϊκό οξύ (**7**), ο μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος (**8**), το βενζοϊκό οξύ (**9**), η *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη (**10**), η π-υδροξυβενζαλδεΐδη (**11**), το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ (**12**) και η ουρακίλη (**13**).

Για την αποτελεσματική εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφική τεχνική της προσρόφησης, χρησιμοποιώντας ρητίνη τύπου XAD-4. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα ήταν ιδιαίτερα πλούσιο σε σάκχαρα αφού μόλις το 13.7% περίπου αυτού συνίσταντο από φαινολικά συστατικά. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του φαινολικού κλάσματος που προέκυψε βασίστηκε κυρίως στη χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (FCPC), του μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex LH-20, καθώς και της παρασκευαστικής TLC και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Στο συγκεκριμένο εκχύλισμα του *P. ostreatus* απομονώθηκαν 3 αλκαλοειδή, 2 νουκλεοτίδια και ένας φαινολικός μεταβολίτης. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν τα εξής προϊόντα: η 3-φορμύλ-πυρρόλη (**14**), το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (**15**), η ουριδίνη (**16**), η ουρακίλη (**13**), το νικοτινικό οξύ (**17**) και το νικοτιναμίδιο (**18**).

Βασιζόμενοι σε σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα, όλοι οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το μυκήλιο του *P. ostreatus* φαίνεται να είναι ιδιαίτερου φαρμακοδιατροφικού ενδιαφέροντος. Το λινολεϊκό και ελαϊκό οξύ αποτελούν σημαντικά διατροφικά πολύτιμα λιπαρά οξέα, ενώ το παλμιτικό και το στεαρικό οξύ, αν και κορεσμένα

λιπαρά οξέα, έχει πρόσφατα διαπιστωθεί ότι φέρουν πολλές ωφέλιμες ιδιότητες από ιατροφαρμακευτική άποψη. Η απομόνωση των παραπάνω λιπαρών οξέων από το μυκήλιο του *P. ostreatus* δικαιολογείται αφού είναι και τα κύρια λιπαρά οξέα με βάση και τη μελέτη του προφίλ λιπαρών οξέων που πραγματοποιήθηκε για το συγκεκριμένο είδος στην παρούσα μελέτη.

Το βενζοϊκό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό, έχει ταυτόχρονα πολλές βιολογικές δράσεις. Αυτό το φυσικό προϊόν έχει απομονωθεί από πολλά είδη μακρομυκήτων, όπως και από τα καρποσώματα του *P. ostreatus* από άλλους ερευνητές, επιδुकνειόντας μάλιστα αντιβακτηριακές ιδιότητες. Είναι φανερό ότι η καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα δεν επέδρασε στην παραγωγή αυτού του φαινολικού μεταβολίτη. Η *trans*-3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυναφθαλεν-1(2H)-όνη που αποτελεί μια πολύ-υδροξυλιωμένη α -τετραλόνη είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της DHN-μελανίνης στους μύκητες. Η παρουσία της στο μυκήλιο δικαιολογείται αφού κατά την υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα τα μυκηλιακά συσσωματώματα διαφοροποιήθηκαν και έλαβαν έλαβαν σκούρο μαύρο χρώμα εξαιτίας μάλλον της παραγωγής μελανίνης. Παρόμοιοι ναφθαλενικοί μεταβολίτες έχουν απομονωθεί από Ασκομύκητες σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας, με δράση μάλιστα έναντι του ιού *Herpes simplex*. Παρόλα αυτά, η παρουσία αυτού του βιοενεργού μεταβολίτη αναφέρεται πρώτη φορά για το *P. ostreatus*.

Σχετικά με την π-υδροξυ-βενζαλδεΐδη, είναι γνωστό ότι βρίσκει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών, αρωμάτων και φαρμάκων. Η π-υδροξυ-βενζαλδεΐδη αποτελεί ένα φαινολικό μεταβολίτη που σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα συναντάται σε διάφορα είδη μακρομυκήτων, μεταξύ των οποίων είναι και το *P. ostreatus*. Επιπλέον, το ινδολο-3-καρβοξυλικό οξύ, ως αλκαλοειδές με πυρήνα ινδολίου έχει πολλές φαρμακευτικές ιδιοτητές. Αν και έχει απομονωθεί από διάφορα είδη Βασιδιομυκήτων και Ασκομυκήτων, δεν έχει αναφερθεί έως σήμερα η παρουσία του στο *P. ostreatus*. Η παρουσία της πάντως δικαιολογείται βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων που περιέχουν στο μόριο τους ινδολικό πυρήνα συνήθως χρησιμεύουν ως βιοσυνθετικοί πρόδρομοι της τρυπτοφάνης. Η τρυπτοφάνη αποδείχθηκε σε σχέση με άλλα αμινοξέα που δοκιμάστηκαν καταλληλότερη πηγή άνθρακα για μέγιστη παραγωγή βιομάζας από το *P. ostreatus* σε υγρές βυθισμένες καλλιέργειες και επιπλέον η

τρυπτοφάνη είναι συστατικό του CSL που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου κατά την ανάπτυξη του μελετώμενου στελέχους στο βιοαντιδραστήρα.

Τέλος, η ουρακίλη που αποτελεί ένα κοινό παράγωγο της πυριμιδίνης εμπλέκεται σε πρωταρχικής σημασίας λειτουργίες των κυττάρων ενώ χρησιμοποιείται και ως φαρμακοδιατροφικό, για το οποίο έχει αναφερθεί η παρουσία του σε πολλά είδη μακρομυκήτων.

Από την άλλη, η 3-φορμύλ πυρρόλη ως αλκαλοειδές με πυρήνα πυρρολίου έχει επιδείξει βιολογικές δράσεις, και αποτελεί ένα φυσικό προϊόν που απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *P. ostreatus*. Επιπλέον, το π-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών, αποτελεί ένα κοινό φαινολικό δευτερογενή μεταβολίτη των μακρομυκήτων. Αν και έχει ανιχνευτεί σε είδη του γένους *Pleurotus*, δεν έχει αναφερθεί ειδικά για το *P. ostreatus*. Για τη συγκεκριμένη περίπτωση μάλιστα, ένα πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής του είναι μέσω της βιομετατροπής της L-φαινυλανίνης που αποτελεί ένα αρωματικό αμινοξύ, συστατικό του CSL που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου κατά την ανάπτυξη του *P. ostreatus* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα. Τέλος, η ουριδίνη και τα αλκαλοειδή νικοτινικό οξύ και νικοτιναμίδιο που ανιχνεύτηκαν στο μυκήλιο του *P. ostreatus* αποτελούν γνωστούς μεταβολίτες των μακρομυκήτων, και είναι γνωστό ότι επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η υγρή βυθισμένη καλλιέργεια του *P. ostreatus* στο βιοαντιδραστήρα οδήγησε στην ικανοποιητική σύνθεση και παραγωγή ήδη γνωστών μεταβολιτών του είδους και συγκεκριμένα λιπαρών οξέων, φαινολικών μεταβολιτών, αλκαλοειδών και νουκλεοτιδίων που συναντώνται και στα αντίστοιχα καρποσώματά του. Επιπλέον όμως η παρουσία της *trans* 3,4-διυδρο-3,4,8-τριυδροξυαφθαλεν-1(2H)-όνης, του ινδολο-3-καρβοξυλικού οξέος, της 3-φορμυλ-πυρρόλης και του 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος στο μυκήλιο του *P. ostreatus* που σημειώθηκε για πρώτη φορά, φανερώνει ότι η μέθοδος βιοδιεργασίας για την ανάπτυξη του μακρομύκητα πιθανόν να αποτελεί κατευθυντήρια δύναμη στη μεταβολική σύνθεση. Ταυτόχρονα, επιβεβαιώνεται ότι η βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα προβάλλει μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για τη βιομηχανική παραγωγή νέων φυσικών προϊόντων.

8.2 Μελλοντικές Προκλήσεις

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή, συμπεραίνεται ότι η προτεινόμενη διεργασία ανάπτυξης του *G. australe* και του *P. ostreatus* σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας οδήγησε σε υψηλή παραγωγή βιομάζας πλούσια σε βιοενεργούς μεταβολίτες και πολύτιμα διατροφικά συστατικά. Έτσι, έχοντας υπόψη αφενός μεν, ότι οι δύο αυτοί μακρομύκητες αποτελούν εξαιρετική πηγή βιοενεργών μεταβολιτών και αφετέρου ότι η βυθισμένη καλλιέργεια σε κλίμακα βιοαντιδραστήρα προβάλλει σήμερα μια νέα προοπτική για την εμπορική παραγωγή τους, τα ευρήματα αυτής της εργασίας θέτουν τα θεμέλια για την περεταίρω μελέτη της διεργασίας ανάπτυξης των, στοχεύοντας όμως κυρίως στις υψηλότερες αποδόσεις των πολύτιμων φυσικών προϊόντων τους με θετικό αντίκρουσμα σε βιομηχανική κλίμακα.

Εξάλλου, είναι γνωστό ότι η βυθισμένη καλλιέργεια των μακρομυκήτων προβάλλει ως μια σημαντική εναλλακτική στη βιομηχανία, αλλά η επιτυχία της εφαρμογής της σε εμπορική κλίμακα εξαρτάται από το κόστος της σε σύγκριση με της υπάρχουσας τεχνολογίας παραγωγής καρποσωμάτων μακρομυκήτων. Έτσι, η αύξηση της παραγωγικότητας μέσω της αριστοποίησης των συθηκών καλλιέργειας και των στρατηγικών διαχείρισης της διεργασίας στο βιοαντιδραστήρα θα επέτρεπε την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα.

Οι μελλοντικοί λοιπόν στόχοι της παρούσας διατριβής, αφορούν την μελέτη των μεταβολικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παραγωγή των βιοδραστικών φυσικών προϊόντων με σκοπό την κατεύθυνση του μεταβολισμού μέσω βιοτεχνολογικών και επιγενετικών χειρισμών. Ακόμα, σε αυτήν τον προσανατολισμό, δεδομένου των δευτερογενών μεταβολιτών και των λειτουργικά διατροφικών συστατικών που διαπιστώθηκε ότι παράγουν οι συγκεκριμένοι μακρομύκητες σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας, κρίνεται σκόπιμο η αριστοποίηση του μέσου ανάπτυξης αλλά και των συθηκών καλλιέργειας (π.χ. θερμοκρασία, αερισμός, ανάδευση, συγκέντρωση εμβολίου, τιμή pH) ως προς την παραγωγή αυτών. Έτσι, θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των διαφορετικών παραμέτρων καλλιέργειας στην παραγωγή βιοενεργών μεταβολιτών και διατροφικά πολύτιμων συστατικών για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση αυτής της προοπτικής.

Ακόμα, θα ήταν ενδιαφέρον η μελέτη της συμπεριφοράς των μακρομυκήτων σε βιοαντιδραστήρες διαφορετικού σχεδιασμού, μιας και οι διαθέσιμες γνώσεις για τον τρόπο συμπεριφοράς τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα είναι λιγοστές. Έτσι, θα επιτρεπόταν ο

σχεδιασμός των διεργασιών αλλά και των βιοαντιδραστήρων ανάλογα με τις δυνατότητες των μακρομυκήτων, γεγονός που προϋποθέτει βέβαια την επιστημονική συνεργασία χημικών μηχανικών και βιολόγων.

Στα κεφάλαια 6 και 7 πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ταυτοποίηση βιονεργών μεταβολιτών από τη βιομάζα των δύο μακρομυκήτων που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες βυθισμένης καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα. Στο σημείο αυτό, μια μελλοντική πρόκληση θα ήταν η διερεύνηση της παραγωγής αυτών των μεταβολιτών από τα αντίστοιχα καρπόσωματά τους. Η σύγκριση του κόστους και χρόνου παραγωγής αυτών από το μυκήλιο ή το καρπόσωμα, ίσως να ενίσχυαν την άποψη που διατυπώθηκε με βάση τα αποτελέσματα της διατριβής, σχετικά με την ελκυστική προοπτική της βυθισμένης καλλιέργειας των μακρομυκήτων για εμπορική παραγωγή πολύτιμων από φαρμακολογική και διατροφική άποψη φυσικών προϊόντων.

Επιπλέον, με βάση τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, το *G. australe* φαίνεται να είναι μια εξαιρετικά πλούσια πηγή βιονεργών μεταβολιτών και κυριώς τριτερπενίων. Ίσως αν η εκχύλιση της βιομάζας πραγματοποιούταν μέσω του συστήματος επιταχυνόμενης εκχύλισης που εφαρμόστηκε στην περίπτωση του *P. ostreatus*, να είχαμε καταφέρει την αποδοτικότερη εκχύλιση ολόκληρου του φάσματος των μεταβολιτών και κατά προέκταση την απομόνωση περισσότερων μεταβολιτών φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Επιπροσθέτως, η βιολογική μελέτη όλων των εκχυλισμάτων (π.χ. για αντιμικροβιακή, κυτταροτοξική, αντιοξειδωτική δράση) και για τους δύο μακρομύκητες θα μας παρείχαν χρήσιμες πληροφορίες για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση αυτών ως πηγές βιολογικά ενεργών ουσιών. Ακόμα, θα ήταν ενδιαφέρον ο εκτεταμένος έλεγχος της βιολογικής δράσης των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν, και ειδικά αυτών που απομόνωθηκαν για πρώτη φορά από τους συγκεκριμένους μακρομύκητες.

Τέλος, τα ευρήματα από την παρούσα διατριβή θέτουν το σημείο έναρξης για την μελλοντική μελέτη και άλλων στελεχών μακρομυκήτων που έχουν συλλεχτεί από το ελλαδικό χώρο για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με σκοπό τη βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση ως φυσικά φάρμακα και διατροφικά πολύτιμα συστατικά.

I. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, B.G., Berger, R.G. (1994).** Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *J. Food Agric. Chem.* 42: 2344–2348.
- Abraham, W.R. (2001).** Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Curr. Med. Chem.* 8(6): 583-606.
- Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, K., Oikawa, S. Yadomae, T. (1990).** Change of biological activities of (1-3)- β -D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1838-1843.
- Adamovic, M., Grubic, G., Milenkovic, I., Jovanovic, R., Protic, R., Sretenovic, L. (1998).** The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 357–362.
- Aiello, A., D’Esposito, M., Fattorusso, E., Menna, M., Müller, W.E.G., Perović-Ottstadt, S., Tsuruta, H., Gulder, T.A.M., Bringmann G. (2005).** Daminin, a bioactive pyrrole alkaloid from the Mediterranean sponge *Axinella damicornis*. *Tetrahedr.* 61(30): 7266-7270.
- Akinyele, B.J., Adetuyi, F.C. (2005).** Effect of agrowastes, pH and temperature variation on the growth of *Volvariella volvacea*. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (12): 1390-1395.
- Alarcón, J., Águila, S. (2006).** Lovastatin Production by *Pleurotus ostreatus*: Effects of the C:N Ratio. *Z. Naturforsch.* 61c: 95-98.
- Alarcón, J., Águila, S., Arancibia-Avila, P., Fuentes, O., Zamorano-Ponce, E., Hernández, M. (2003).** Production and Purification of Statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) Strains. *Z. Naturforsch.* 58c: 62-64.
- Amartey, S., Jeffries, T.W. (1994).** Comparison of corn steep liquor in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnol. Lett.* 16: 211–214.
- Ambrósio, S.T., Campos-Takaki, G.M. (2004).** Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresour. Technol.* 91(1): 69-75.
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haratounian, S.A., Skaltsounis, A.-L., Micros, E. (2009).** 1H NMR-Based Metabolomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Village. Comparison with HPLC data. *J. Agric Food Chem.* 57: 11067-11074.
- Andlauer, W., Furst, P. (2002).** Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Int.* 35: 171–176.
- AOAC (1990).** Protein (Crude) in animal feed. Copper catalyst Kjeldahl method. In: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (984.13), 15th Edition, AOAC, Arlington, Virginia, p. 74.
- AOAC (1995).** Official methods of analysis (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Atkinson, B, Daoud, I. (1976).** Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. *Adv. Biochem. Eng.* 4: 41– 124.
- Avtonomova, A. V., Krasnopol’skaya, L. M., Maksimov, V. N. (2006).** Optimization of Nutrient Medium for Submerged cultivation of *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Microbiology.* 75(2): 148-153.
- Ayodele, S.M. (2008).** Studies on the vegetative growth requirements of *Psathyrella atroumbonata*, pegler, an edible mushroom in Nigeria. *Afr. J. Plant Sci.* 2 (5): 28-33.
- Balazs, R., Machiyama, Y., Hammond, B.J., Julian, T., Richter, D. (1970).** The operation of the 4-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in the brain tissue in vitro. *Biochem. J.* 116: 445–467.

- Banga, J., Tripathi, C. K. M. (2009).** Response Surface Methodology for optimization of medium components in submerged culture of *Aspergillus flavus* for enhanced heparinase production. *Let. Appl. Microbiol.* 49 (2): 204-209.
- Bano, S., Ahmad, V.U., Perveen, S., Bano, N., Shameel, S.M. (1987).** Marine Natural Products; II. Chemical Constituents of Red Alga *Botryocladia leptopoda*. *Pl. Med.* 53: 117-118.
- Bao, H.N., Ushio, H., Ohshima, T. (2008).** Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (*Flammulina velutipes*) extract added to beef and fish meats. *J. Agric. Food Chem.* 56 (21): 10032–10040.
- Bao, X.F., Wang, X.S., Dong, Q., Fang, J.N., Li, H.W. (2002).** Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 59: 175-181.
- Barros, L., Baptista, P., Correira, D.M., Casa, S., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R. (2007a).** Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chem.* 105: 140-145.
- Barros, L., Baptista, P., Correira, D.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2007b).** Effects of conservation and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food. Chem.* 55: 4781-4788.
- Barros, L., Calhelha, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M. (2007d).** Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *Eur. Food Res. Technol.* 225: 151–156.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. (2008b).** Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2742–2747.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos Buelga, C. (2009).** Phenolic acid determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem. Toxicol.* 47(6): 1076-1079.
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiros, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P. (2007c).** Total phenols, ascorbic acid, carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.* 103: 413–419.
- Barros, L., Venturini, B.A., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. (2008a).** Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *J. Agric. Food. Chem.* 56 (10): 3856-3862.
- Basarab, G.S., Steffens, J.J., Wawrzak, Z., Schwartz, R.S., Lundqvist, T., Jordan, D.B. (1999).** Catalytic mechanism of scytalone dehydratase: site-directed mutagenesis, kinetic isotope effects, and alternate substrates. *Biochemistry* 38(19): 6012-6024.
- Bauer-Petrovska, B., Jordanoski, B., Stefov, V., Kulevanova, S. (2001).** Investigation of dietary fibre in some edible mushrooms from Macedonia. *Nutr. Food Sci.* 31: 242–246.
- Beare-Rogers, J., Dieffenbacher, A., Holm, J.V. (2001).** Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 73: 685-744.
- Bednareka, E., Dobrowolskia, J.Cz., Dobrosz-Teperekc, K., Kozerskia, L., Lewandowskia, W., Mazureka, A.P. (2000).** Theoretical and experimental ¹H, ¹³C, ¹⁵N, and ¹⁷O NMR chemical shifts for 5-halogenouracils. *J. Molec.r Struct.* 554: 233-243.
- Belitz, H.D., Grosch, W. (1999).** Food Chemistry. Berlin: Springer.
- Beltran-Garcia, M.J., Estarron-Espinosa, M., Ogura, T. (1997).** Volatile Compounds Secreted by the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and Their Antibacterial Activities. *J. Agric. Food Chem.* 45 (10): 4049–4052.

- Bergmeyer, H. U., Bernt, E. (1974).** Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie. Berlin, 3 pp. 1205-1214.
- Bernaś E, Jawarska, G. Lisiewska, Z. (2006).** Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 5: 5-20.
- Berne, S., Križaj, I., Pohleven, F., Turk, T., Maček, P., Sepčić, K. (2002).** *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolycins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1570(3): 153-159.
- Berne, S., Pohleven, J., Vidic, I., Rebolj, K., Pohleven, F., Turk, T., Maček, P., Sonnenberg, A., Sepčić, K. (2007).** Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycol. Res.* 111 (12): 1432-1436.
- Berović, M., Habijanić, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B., Pohleven, F. (2003).** Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J. Biotechnol.* 103(1): 77-86.
- Bettin, F., Queli Montanari, Q., Calloni R., Gaio T.A., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P. (2009).** Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1–9.
- Bijev, A. (2008).** Synthesis, In Vitro Evaluations and Structure-Activity Assessment of Pyrrole Hydrazones as Potential Tuberculostatics. *Lett. Drug Des. Discovery* 5: 15–24.
- Birhanli, E. Yesilada, O. (2006).** Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1286-1293.
- Blackwood, A.D., Salter, J., Dettmar, P.W., et al. (2000).** Dietary fiber, physicochemical properties and their relationship health. *J. Roy. Soc. Promot. Health.* 120(4): 242-247.
- Bobek, P., Galbavy, S. (2001).** Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British J. Biomed. Sci.* 58 (3): 164–168.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L. (2007).** *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol. Ann. Rev.* 13: 265-301.
- Bohn, J. A., BeMiller, J. N. (1995).** (1-3)-β-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carboh. Polymers* 28: 3–14.
- Bok, JW, Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, HG, Neil Towers, GH. (1999).** Antitumor sterols from the mycelia of *Cordiceps sinensis*. *Phytochemistry* 51(7): 891 - 898.
- Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H.M., Furlan, S.A. (2004).** Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chem.* 88: 425–428.
- Borchers, A.T., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (2004).** Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update. *Experim. Biol. Med.* 229: 393-406.
- Braca, A., Tommasi, N., Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. (2001).** Antioxidant principles from *Bauchinia tarapotensis*. *J. Nat. Prod.* 64: 892-895.
- Brandt, C.R., Piraino, F. (2000).** Mushroom antivirals. *Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 11-26.
- Brosi, A. (1971-1980).** The Alkaloids, vol. 21-29, Acad. Press, New York.
- Brüchne, F., Wright, E. (2002).** Benzaldehyde. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim.

- Brzin, J., Rogeli, B., Popovic, T., Strukeli, B., Ritonja, A. (2000).** Clitocyprin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J.Biol. Chem.* 275(26): 20104-20109.
- Burns, P.J., Yeo, P., Keshavarz, T., Roller, S., Evans, C.S. (1994).** Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus sp. Florida*; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. *Enzyme Microbial Technol.* 34: 566–572.
- Çağlarirmak, N. (2007).** The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chem.* 105: 1188–1194.
- Cao, L.Z., Lin, Z.B. (2003).** Regulatory effect of *Ganoderma lucidum polysaccharides* on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells *in vitro*. *Acta Pharmacol. Sin.* 24: 312-326.
- Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Rosa, M.C.C., Torri, G., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. (2008).** Unusual partially 3-O-methylated α -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Phytochemistry* 69 (1): 252-257.
- Carlisle, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001).** The Fungi. Academic Press, London, UK.
- Certik, M., Megova, J., Horenitzky, R. (1999).** Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45: 289-293.
- Certik, M., Baltiesova, L., Sajbidor, J. (1997).** Lipid formation and γ -linoleic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 101–105.
- Chairul S.M., Hayashi, Y. (1994).** Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* 35: 1305–1308.
- Chairul, S.M., Tokuyama, T., Hayashi, Y., Nishizawa, M., Tokuda, H., Chairul, S.M., et al. (1991).** Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. *Phytochemistry* 30: 4105–4109.
- Chakraborty, T.K., Basu, D., Das, N., Sengupta, S., Mukherjee, M. (2004).** The mannitol cycle in *Pleurotus ostreatus* (Florida). *FEMS Microbiol. Lett.* 236 (2): 307–311.
- Chakraborty, T.K., Das, N., Mukherjee, M. (2003).** Evidences of high carbon catabolic enzyme activities during sporulation of *Pleurotus ostreatus* (Florida). *J. Basic Microbiol.* 43: 462–467.
- Chandra, A., Purkayastha, R.P. (1977).** Physiological Studies on Indian Mushrooms. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69: 63–70.
- Chang, M.Y., Tsai, G.J., Houg, J.Y. (2006).** Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microb. Technol.* 38(3–4): 407–414.
- Chang, S. T., Buswell, J.A. (2008).** Development of the world mushroom industry: Applied mushroom biology and international mushroom organization. *Int. J. Med. Mush.* 10(3): 195-208.
- Chang, S. T., Chiu, S.W. (1992).** Mushroom production-an economic measure in maintenance of food security. In: *Biotechnology: Economic and social Aspects*. DaSilva, E. J., Ratledge, C., Sasson, A. (Eds). Cambridge University Press. pp. 110-141.
- Chang, S.T. (1995).** *Ganoderma*-The leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. In: *Recent advances in Ganoderma lucidum research*. Kim, B.K, Kim, Y.S. (Eds). The Pharmaceutical Society of Korea. Seoul, Korea. pp. 43-52.
- Chang, S.T. (1998).** Development of novel agrosience industries based on bioconversion technology. In: *Frontiers in Biology: the Challenges of Biodiversity*. Chou, C.H. Shao, K.T. (Eds). Academia Sinica, Taipei. pp 217-222.

- Chang, S.T. (1999).** Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: Nongreen revolution. *Int. J. Med. Mushrooms*. 1: 1–7.
- Chang, S.T. (2005).** Witnessing the development of the mushroom industry in China. *Acta Edulis Fungi* (Suppl.). 12: 3–19
- Chang, S.T. (2006).** The need for scientific validation of culinary–medicinal mushroom products. *Int. J. Med. Mush.* 8: 187-195.
- Chang, S.T., Buswell, J.A. (1999).** *Ganoderma lucidum* (Curt:Fr) P. Karst (aphyllophoromycetidae)- a mushrooming medicinal mushroom. *Int. J. Med. Mush.* 1: 139-146.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (1989).** *Edible mushrooms and their Cultivations*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (1992).** Mushroom Biology- A new discipline. *Mycologist*. 6 (2): 64-65.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (2004).** *Mushrooms. Cultivation, Nutritional value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. 2nd Edition, CRC Press. USA. pp. 17-23.
- Chang, U.M., Li, C.H., Lin, L.I., Huangm C.P., Kan, L.S., Lin, S.B. (2006).** Ganoderiol F, a ganoderma triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. *Life Sci*. 79(12): 1129-1139.
- Chen, A.W. (2002).** Cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst (Reishi) in North America (3) [online]. MushWorld-Cultivation, available at http://www.mushworld.com/sub_en.html
- Chen, A.W. (2004).** Natural-log cultivation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Reishi) [online]. MushWorld-Cultivation, available at http://www.mushworld.com/sub_en.html
- Chen, A.W., Miles, P.G. (1996).** Biomedical research and the application of mushroom nutraceuticals from *Ganoderma lucidum*. In: *Proc. 2nd Int. Conf. Mush. Biol. Mush Prod* (ed. D.J. Royle), University Park, Pennsylvania, 161-175.
- Chen, C.C., Wu, C.M. (1984).** Volatile components of mushroom (*Agaricus subrufecens*). *J. Food Sci.* 49(4): 1208-1209.
- Chen, J., Seviour, R. (2007).** Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol. Res.* 111: 635–652.
- Chen, R.Y., Yu, D.Q. (1991).** Studies on the triterpenoid constituents of the spores from *Ganoderma lucidum* Karst. *Yao Xue Xue Bao* 26(4): 267-273.
- Chen, Y., Xie, M.Y., Nie, S.P., Li, C., Wang, Y.X. (2008).** Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chem.* 107(1): 231-241.
- Cheng, M.J., Tseng, M., Chen, I.S., Liao, C.C., Yuan, G.F. (2009).** Secondary metabolites from the culture broth of actinomycete *Acrocarpospora sp. firdi* 001 and their antimicrobial activity. *J. Chil. Chem. Soc.* 54 (2): 198-200.
- Cheung, P.C.K. (1996a).** Dietary Fiber Content and Composition of some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *J. Agric. Food. Chem.* 44 (2): 468-471
- Cheung, P.C.K. (1996b).** The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. *Nutr. Res.* 16:1953–1957.
- Cheung, P.C.K. (1997a).** Chemical evaluation of some lesser known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soy milk waste. *Food Chem.* 96: 61–65.
- Cheung, P.C.K. (1997b).** Dietary fiber content and composition of some edible fungi determined by two methods of analysis. *J. Sci. Food Agric.* 73 (2):255-260.
- Cheung, P.C.K., Lee, M.Y. (2000).** Fractionation and characterization of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) as potential nutraceuticals from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. *J. Agric. Food Chem.* 48 (8): 3148-3151.

- Chihara, G., Himuri, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. Fukuoka, F. (1970).** Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) SING. *Cancer Res.* 30: 2776-2781.
- Cho, E.J., Oh, J.Y., Chang, H.Y., Yun, J.W. (2006).** Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *J. Biotechnol.* 127(1): 129–140.
- Cho, I.H., Namgung, H.J., Choi, H.K., Kim, Y.S. (2008).** Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chem.* 106(1): 71-76.
- Ciebada-Adamiec, A., Eugeniusz, M., Ireneusz, C. (2010).** Inhibitory effect of nicotinamide on enzymatic activity of selected fungal strains causing skin infection. *Mycoses* 53(3): 204-207.
- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. (2002).** Biotechnological applications and potential wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Mini Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 582-594.
- Colak, A., Faiz, O., Sesli, E. (2009).** Nutritional Composition of some Wild Edible Mushrooms. *Turk. J. Biochem.* 34 (1): 25-31.
- Cole, R.J., Jarvis, B.B., Schweikert, M.A. (2003).** Handbook of Fungal Secondary Metabolites. vol. 3. Academic Press, California.
- Confortin, F.G., Marchetto, R., Bettin, F., Camassola, M., Salvador, M., Dillon, A.J. (2008).** Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35(10): 1149-1155.
- Connolly G.P., Duley J.A. (1999).** Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 218-225.
- Couché, E., Fkyerat, A., Tabacchi, R. (2009).** Stereoselective Synthesis of *cis*- and *trans*-3, 4-Dihydro-3, 4, 8-trihydroxynaphthalen-1(2H)-one. *Helv. Chim. Acta* 92(5): 903-917.
- Crisan, E.B., Sands, A. (1978).** Nutritional value. In: Chang, S.T. and Hayes, W.A. (Eds). The biology and cultivation of mushrooms. *Academic Press*, New York. p. 137.
- Crognale, S., Federici, F., Petruccioli, M. (2003).** Beta-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters. *Biotechnol. Lett.*: 25(23): 2013–2015.
- Cui, F. J., Li, Y., Xu, Z. H., Xu, H. Y., Sun, K., Tao, W. Y. (2006).** Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 97: 1209–1216.
- Cui, J., Chisti, Y. (2003).** Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol. Adv.* 21: 109-122.
- Cui, Z.H. (2004).** The production, import and export of edible mushrooms in S. Korea. The proceedings of “The coordinative forum on the development of Chinese mushroom industry”. Zhejiang, China, 31-34.
- D’Ischia, M., Napolitano, A., Pezzella, A. (2008).** In Comprehensive Heterocyclic Chemistry III, Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Scriven, E.F.V., Taylor, R. J., (Eds.), Elsevier: Oxford, UK, Vol. 3, p. 353.
- Daba, A.S., Ezeronye, O.U. (2003).** Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher Basidiomycete mushrooms. *Afr. J. Biotechnol.* 2(12): 672–678.
- Danell, E., Eaker, D. (1992).** Amino acid and total protein content of the edible mushroom *Cantharellus cibarus* (Fries). *J. Sci. Agric.* 60: 333-337.
- Darmstadt, G.L., Mao-Qiang, M., Chi, E., Saha, S.K., Ziboh, V.A., Black, R.E., Santosham, M., Elias, P.M. (2002).** Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries. *Acta Paediatrica* 91 (5): 546–554.
- Dart, R.K., Stretton, R.J. (1976).** Fatty acid composition of *Sporotrichum* species. *Trans. British Mycol. Soc.* 66: 529–532.

- Das, S.K., Masuda, M., Hatashita, M., Sakurai, A., Sakakibara, M. (2010).** Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation. *Process Biochem.* 45 (1): 129-132.
- De Souza, M.V.N. (2006).** Promising Drugs against Tuberculosis. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery.* 1: 33-44.
- Del Toro, G.V., Vega, R.C., Garín-Aguilar, M.E., Lara, H.L. (2006).** Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus spp.* *Food Chem.* 94 (4): 494-497.
- Delcaire, J.R. (1978).** Economics of cultivated mushrooms. In: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. Chang, S. T. and H. A. Hayes, (Eds). *Academic Press*, New York. p. 726-793.
- Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M., Benítez, T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: Cloning and characterization. *Microbiology* 148(5): 1305–1315.
- Demirbas, A. (2002).** Metal ion uptake by mushrooms from natural and artificially enriched soils. *Food Chem.* 78: 89–93.
- Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., Nielsen, J. (2006).** Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 899–908.
- Díez, A.A., Alvarez, A. (2001).** Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem.* 75: 417-422.
- Diolock, A.T. Charleux, J.L. Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. (1998).** Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* 80: 77-112.
- Du, Y., Gu, G., Hua, Y., Wei, G., Ye, X., Yu, G. (2004).** Synthesis and antitumor activities of glucan derivatives. *Tetrahedron* 60: 6345–6351.
- Dubost, N.J., Ou, B., Beelman, R.B. (2007).** Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.* 105: 727–735.
- Dundar, A., Acay, H., Yildiz, A. (2008).** Yield performances and nutritional contents of three oyster mushroom species cultivated on wheat stalk. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3497-3501.
- Eggum, B.O., Beames, R.M., Bach Knudsen, K.E. (1985).** The effect of provision of the first limiting amino acid, gastrointestinal microbial activity and the level of nitrogen intake on protein utilization and energy digestibility in rats. *Br. J. Nutr.* 54: 727–739.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Nerud, F. (2006).** Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calypttratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochem.* 41 (4): 941-946.
- El-Enshasy, H., Kleine, J. Rinas, U. (2006).** Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 41: 2103-2112.
- Elisashvili, V.I., Kachlishvili, E.T., Wasser, S.P. (2009).** Carbon and Nitrogen Effects on Basidiomycetes Exopolysaccharide Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45 (5): 531-535.
- Elissetche, J.P., Ferraz, A., Freer, J., Rodrigues, J. (2006).** Influence of forest soil on biodegradation of *Drimys winteri* by *Ganoderma australe*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57: 174–178.
- Elissetche, J.P., Ferraz, A., Freer, J., Rodrigues, J. (2007).** Enzymes produced by *Ganoderma australe* growing on wood and in submerged cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 429-434.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N. (2007).** Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Comp. Anal.* 20: 337–345.

- El-Mekkawy, S., Meselhy, M.R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., et al. (1998).** Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 49: 1651–1657.
- Emelyanova, E.V. (2005).** Effects of cultivation conditions on the growth of the basidiomycete *Coriolus hirsutus* in a medium with pentose wood hydrolysate. *Process Biochem.* 40: 1119–1124.
- Emri, T., Molnar, Z., Veres, T., Pusztahelyi, T., Dudas, G., Pocs, I. (2006).** Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol. Res.* 110: 1172–1178.
- Enman, J., Rova, U., Berglund, K.A. (2007).** Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agric. Food Chem.* 55 (4): 1177–1180.
- Erwin, J. (1973).** Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. In: *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms*. Ed. J. Erwin, Academic Press, New York, NY (USA). pp. 141–143.
- Esbensen, K. H. (2002).** The Introductor Package: Multivariate Data Analysis in Practice. CAMO Process AS, Aalborg University, Esbjerg, Denmark.
- Ey, J., Schömig, E., Taubert, D. (2007).** Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J. Agric. Food Chem.* 55 (16): 6466–6574.
- Eyal, J. (1991).** Mushroom mycelium grown in submerged culture-Potential food applications. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. Goldberg, I.W. (ed.). Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 31–64.
- Fan, L., Pan, H., Soccol, A.T., Pandey, A., Soccol, C.R. (2006).** Advances in Mushroom Research in the last Decade. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3): 303–311.
- Fan, L., Soccol, A.T., Pandey, A., Soccol, C.R. (2007).** Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT* 40: 30–35.
- Fang, Q.H., Tang, Y.J., Zhong, J.J. (2002).** Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 37: 1375–1379.
- Fang, Q.H., Zhong, J.J. (2002).** Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharides. *Biochem. Engin. J.* 10: 61 – 65.
- Farghaly, A.R. (2010).** Synthesis of some new indole derivatives containing pyrazoles with potential antitumor activity. *Arkivoc* xi: 177–187.
- Fasidi, I.O., Akwakwa, D.O. (1996).** Growth requirements of *Volvariella speciosa* (Fr.Ex.Fr.) Singer, as Nigerian Mushroom. *Food Chem.* 55(2): 165–168.
- Fasidi, I.O., Olorunmaiye, K.S. (1994).** Studies on the requirements for vegetative growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian mushroom. *Food Chem.* 50: 397–401.
- Fazenda, M.L., Seviour, R., McNeil, B., Harvey, L.M. (2008).** Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 63: 33–92.
- Feng, Y.L., Li, W.Q., Wu, X.Q., Cheng, J.W., Ma, S.Y. (2010).** Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochem. Eng. J.* 49 (1): 104–112.
- Ferreira, I.C., Barros, L., Abreu, R.M. (2009).** Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.* 16 (12): 1543–60.
- Figueiredo, E., Soares, M.E., Baptista, P., Castro, M., Bastos, M.L. (2007).** Validation of an electrothermal atomization atomic absorption spectrometry method for quantification of total chromium and chromium (VI) in wild mushrooms and underlying soils. *J. Agric. Food. Chem.* 55: 7192–7198.

- Flegg, P.B., Maw, G. (1977).** Mushrooms and their possible contribution to world protein needs. *Mushroom J.* 48: 395-403.
- Foda, M.S., Salem, S.A., Hegazi, S.M., Badr-Eldin, S.M. (1973).** Biochemical studies for utilization of corn steep liquor in production of protein. *J. Sci. Food Agric.* 24: 17-22.
- Fortes, R.C., Novaes, M.P., Recôva, V.L., Melo, A.L. (2009).** Immunological, hematological, and glycemia effects of dietary supplementation with *Agaricus sylvaticus* on patients' colorectal cancer. *Exper. Biol. Med.* 234 (1): 53-62.
- François, J., Parrou, J.L. (2001).** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 125-145.
- Fu, L.Q., Guo, X.S., Liu, X., He, H.L., Wang, Y.L., Yang, Y.S. (2010).** Synthesis and antibacterial activity of C-2(S)-substituted pleuromutilin derivatives. *Chinese Chem. Lett.* 21 (5): 507-510.
- Fu, Y., Viraraghavan, T. (2001).** Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. *Bioresour. Technol.* 79(3): 251-262.
- Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y., Sugahara, T. (1995).** Nitrogen-to Protein conversion factors for some common edible mushrooms. *J. Food Sci.* 60: 1045-1047.
- Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T., Motai, H. (1991).** Stimulation of protease production by *Aspersillus oryzae* with oils in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 586-590.
- Furlani, R.P.Z., Godoy H.T. (2008).** Vitamins B₁ and B₂ contents in cultivated mushrooms. *Food Chem.* 106: 816-819
- Gao, J.J., Min, B.S., Ahn, E.M., Nakamura, N., Lee, H.K., Hattori, M. (2002).** New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 837-40.
- Gao, J.L., Leung, K.S.Y., Wang, Y.T., Lai, C.M., Li, S.P., Hu, L.F., Lu, G.H., Jiang, Z.H., Yu, Z.L. (2007).** Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma spp.* by HPLC-DAD-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44(3): 807-811.
- Gao, X.X., Wang, B.X., Fei, X.F., Zhang, J., Gong, Y.J., Minami, M., Nagata, T., Ikejima, T. (2000).** Effects of polysaccharides (F10-c) from mycelium of *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cells and human PBMC (II). *Acta Pharmacol. Sin.*, 21: 1186-1192.
- Gao, Y., Zhoo, S., Wen, J., Huang, M., Xu, A. (2002).** Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. *Life Sci.* 72: 731-745.
- Garland, J.L., Mills, A.L. (1991).** Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 2351-2359.
- Garraway, O.M., Evans, C.R. (1984).** *Fungal nutrition and physiology*. John Wiley, New York .
- Garrett, R.H., Grisham, C.M. (1997).** Principals of Biochemistry with a Human Focus. United States: Brooks/Cole Thomson Learning.
- Gbolagade, J., Ajayi, A., Oku, I., Wankasi D. (2006a).** Nutritive Value of Common Wild Edible Mushrooms from Southern Nigeria. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 1 (1): 16-21.
- Gbolagade, J., Sobowale, A., Adejoye, D. (2006b).** Optimization of sub-merged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (16): 1464-1469.
- Gehrig, I., Bart, H.J., Anke, T., Germerdonk, R. (1998).** Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnol. Bioeng.* 59(5): 525-533.
- Gerber, A.L., Smania, A. Jr., Monache, F.D., Biacchi, N. Jr., Smania, E.F.A. (2000).** Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mush.* 2: 303-311.

- Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, J.R., Ninow, J.L., Furlan, S.A. (2008).** Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresour. Technol.* 99 (1): 76-82.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F. (2000).** Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20(1): 17–48.
- Gibney, M.J., Vorster, H.H., Kok, F.J. (2002).** Introduction to Human Nutrition. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Gomes, J., Menawat, A.S. (2000).** Precise control of dissolved oxygen in bioreactors: A model-based geometric algorithm. *Chem. Eng. Sci.* 55: 67–78.
- Gonzalez, A.G., Leon, F., Rivera, A., Padron, J.I., Gonzalez-Plata, J., Zuluaga, J.C., Quintana, J., Estevez, F., Bermejo, J. (2002).** New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. *J. Nat. Prod.* 65: 417–421.
- Gregori, A., Švagelj, M., Pahor, B., Berovič, M., Pohleven, F. (2008).** The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnol.* 25: 157-161.
- Gregori, A., Švagelj, M., Pohleven, J. (2007).** Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp.. *Food Technol. Biotechnol.* 45(3): 238-249.
- Griffin, D.H. (1994).** Chemical Requirements for growth, In: D. H. Griffin (Ed.), *Fungal Physiology*, Wiley-Liss Inc., New York, pp.131-157.
- Griffiths, K.M., Basic, A., Howlett, B.J. (2003).** Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* 62: 147-153.
- Grimm, L.H., Kelly, S., Krull, R., Hempel, D.C. (2005).** Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 375–384.
- GSFA Online Food Additive Group Details: Benzoates (2006).**
- Gu, W., Ding, H. (2008).** Two new tetralone derivatives from the culture of *Xylaria hypoxylon* AT-028. *Chin. Chem. Lett.* 19(11): 1323-1326.
- Gu, Y.H., Sivam, G. (2006).** Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells, *J. Med. Food.* 9: 196–204.
- Gu, Y.X., Wang, Z.S., Li, S.X., Yuan, Q.S. (2007).** Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chem.* 102: 1304–1309.
- Guettler, S., Jackson, E.N., Lucchese, S.A., Honaas, L., Green, A., Hittinger, C.T., Tian, Y., Lilly, W. W. (2003).** Ests from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media. *Fungal Genet. Biol.* 39: 191–198.
- Guha, A.K., Banerjee, A.B. (1971).** Effect of different carbon compounds on submerged production of *Agaricus campestris*. *J. Food Sci. Tech.* 8: 82–83.
- Gunde-Cimerman, N., Cimerman, A. (1995).** *Pleurotus* Fruiting Bodies Contain the Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase-Lovastatin. *Exp. Mycol.* 19 (1): 1-6.
- Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., Benicki, A. (1993).** Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG-CoA reductase: production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 203 - 206.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. (2001).** Hyporcholesterolemic activity of the genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricales s. l., Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mush.* 3: 395–397.
- Guo, L., Xie, J., Ruan, Y., Zhou, L., Zhu, H., Yun, X., Jiang, Y., Lü, L., Chen, K., Min, Z., Wen, Y., Gu, J. (2009).** Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Int. Immunopharmacol.* 9(10): 1175-1182.
- Guo, X., Zou, X., Sun, M. (2009).** Effects of phytormones on mycelial growth and exopolysaccharides biosynthesis of medicinal mushroom *Pellinus linteus*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 32 (5): 701-707

- Gupton, J.T. (2006).** Pyrrole natural products with antitumor properties, in Heterocyclic Antitumor Antibiotics: Topics in Heterocyclic Chemistry (Lee, M. ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 53-92.
- Gura, E., Rau, U. (1993).** Comparison of agitators for the production of branched β -1, 3-D-glucans by *Schizophyllum commune*. *J. Biotechnol.* 27: 193–201.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1994).** Anisaldehyde Production and Aryl-Alcohol Oxidase and dehydrogenase Activities in Ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6): 1783-1788.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez-Íñigo, M.J., Martínez, M.J., Martínez, Á.T. (2002).** Production of New Unsaturated Lipids during Wood Decay by Ligninolytic Basidiomycetes. *Appl. Environm. Microbiol.* 68 (3): 1344–135.
- Ha, M.A., Javris, M.C., Mann, J.I. (2000).** A definition for dietary fibre. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: 861-864.
- Habjanic, J. Berovic, M. (2002).** Process of cultivation of fungus *Ganoderma lucidum* on a solid cultivation substrate. Patent SI 20923.
- Hadar, Y., Cohen-Arazi, E. (1986).** Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1352-1354.
- Hagiwara, S.Y., Takahashi, M., Shen, Y., Kaihou, S., Tomiyama, T., Yazawa, M., Tamai, Y., Sin, Y., Kazusaka, A., Terazawa, M. (2005).** A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1603–1605.
- Hajjaj, H., Macé, C., Roberts, M., Niederberger, P., Fay, L.B. (2005).** Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Appl. Environm. Microbiol.* 71 (7): 3653–3658.
- Hall, I. R., Wang, Y., Amicucci, A. (2003).** Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Tr. Biotechnol.* 21: 433-438.
- Hamed, A., Vahid, H., Ghanati, F. (2007).** Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Agaricus blazei* Murill DPPH 131 using Response-Surface Methodology. *Biotechnology* 6: 456-464.
- Hao, L.M., Xing, X. H., Li, Z., Zhang, J.C., Sun, J.X., Jia, S.R., Qiao, C.S., Wu, T. (2010).** Optimization of Effect Factors for Mycelial Growth and Exopolysaccharide Production by *Schizophyllum commune*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2): 631-631.
- Harbourne, J.B. (1973).** Methods of Plant Analysis. *Phytochem, Methods* 1-32.
- Harvey, P.W., Everett, D.J. (2004).** Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24 (1): 1–4.
- Harvey, R., Champe, P., Fisher, B. (2006).** Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. 2nd Edition. Lippincott Williams and Wilkins. p. 204
- Hawksworth, D.L. (2001).** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited. *Mycol. Res.* 125 (2): 1422-1432.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Rooney, P.J., Loughrey, A., Rao, J.R., Moore, J.E. (2009).** An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complem. Therapies Clinic. Pract.* 15(1): 5-7.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2010).** Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chem.* 119 (4): 1443-1450.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W. (1999).** The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 447–471.

- Hilber, O. (1997).** The genus *Pleurotus* (Fr.) Kummer. Erchienen in Selbstverlag.
- Hidalgo, A., Pompei, C., Galli, A., Cazzola, S. (2005).** Uracil as an Index of Lactic Acid Bacteria Contamination of Tomato Products. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2): 349-55.
- Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M. (2000).** Degradation of Bisphenol A by the Lignin-Degrading Enzyme, Manganese Peroxidase, Produced by the White-rot Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (9): 1958-1962.
- Hirokawa, Y., Kinoshita, H., Tanaka, T., Nakamura, T., Fujimoto, K., Kashimoto, S., Kojima, T., Kato, S. (2009).** Pleuromutilin derivatives having a purine ring. Part 3: Synthesis and antibacterial activity of novel compounds possessing a piperazine ring spacer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (1):175-179.
- Hirotsani, M., Ino, C., Furuya, T. Shiro, M. (1986).** Ganoderic acids T, S, and R, new triterpenoids from the cultured media of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 2282-2285.
- Ho, M.S. Peng, J.T. (2006).** Edible mushroom production in Taiwan. Mushroom International (ISMS Newsletter) April Issue, 6-7.
- Hölker, U., Höfer M., Lenz J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175–186
- Hong, L., Xun, M., Wutong, W. (2007).** Anti-diabetic effect of an alpha-glucan from fruit body of maitake (*Grifola frondosa*) on KK-Ay mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (4): 575–582.
- Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E.K. (2003).** Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clinic. Experim. Pharmacol. Physiol.* 30 (7): 470–475.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A. (1998).** Preparative Chromatographique techniques: Application in Natural Products Isolation. Sptinger-Verlag, Berlin.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A. (1989).** Role of melanin in appressorium function. *Exper. Mycology* 13: 403-418.
- Hsieh, C., Hsu, T.H., Yang, F.C. (2005).** Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* by reusing thin stillage. *Proc. Biochem.* 40(2): 909-916.
- Hsieh, C., Tseng, M.H., Liu, C.J. (2006).** Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitation of nutrients. *Enzyme Microb. Technol.* 38(1–2): 109–117.
- Hsieh, C., Yang, F. C. (2004).** Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Technol.* 91: 105–109.
- Hsu, S.C., Ou, C.C., Chuang, T.C., Li, J.W., Lee, Y.J., Wang, V., Liu, J.Y., Chen, C.S., Lin, S.C., Kao, M.C. (2009).** *Ganoderma tsugae* extract inhibits expression of epidermal growth factor receptor and angiogenesis in human epidermoid carcinoma cells: *In vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* 281(1): 108-116.
- Hsu, S.C., Ou, C.C., Li, J.W., et al. (2008).** *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G (2)/M cell cycle arrest. *J. Ethnopharmacol.* 120 (3): 394–401.
- Hu, S.H., Liang, Z.C., Chia, Y.C., Lien, J.L., Chen, K.S., Lee, M.Y., Wang, J.C. (2006).** Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2103–2110.
- Huie, C.W., Di, X. (2004).** Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *J. Chromatogr. B* 812: 241–257.
- Hult, K., Gatenbeck, S. (1978).** Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternate*. *Eur. J. Biochem.* 88: 607–612.
- Humfeld, H., Sugihara, T.F. (1949).** Mushroom mycelium production by submerged propagation. *Food Technol.* 3: 335–356.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W., Yun, J.W. (2004).** Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1296–1305

- Hwang, H.J., Kim, S.W., Xu, C.P., Choi, J.W., Yun, J.W. (2004).** Production and molecular characteristics of four groups of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus gilvus*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 707-719.
- Hwang, S.S., Choi, H.T. Song, H.G. (2008).** Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 767-772
- Ikekawa, T. (2001).** Beneficial Effects of Edible and Medicinal Mushrooms on Health Care. *Inter. J. Medic. Mushr.* 3: 291-298.
- Israel, O.P., Shah Ali, M.D. (1964).** Effect of carbohydrates on the growth of *Rhizoctonia solani* KUHN. *Biol. Plant.* 6: 84-87.
- Ito, H., Kasama, K., Naruse, S., Shimura, K. (1982).** Antitumor effect of palmitoleic acid on Ehrlich ascites tumor. *Cancer Lett.* 17(2): 197-203.
- Jaconello, P. (1992).** Niacin versus niacinamide. *Can. Med. Assoc. J.* 147 (7).
- Jain, A.C., Gupta, S.K. (1984).** The isolation of lanosta-7,9(11),24-trien-3 β ,21-diol from the fungus *Ganoderma australe*. *Phytochemistry* 23(3): 686-687.
- Jasinghe, V.J., Perera, C.O. (2005).** Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chem.* 92: 541-546.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2007).** Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp. Gerontol.* 42: 183-191.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2009).** *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 10 (2): 228-234.
- Jia, J., Zhang, X., Hu, Y.S., Wu, Y., Wang, Q.Z., Li, N.N., Guo, Q.C., Dong, X.C. (2009).** Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chem.* 115(1): 32-36.
- Jia, L.E., Shunzhen, H.U., Xu, M., (2007).** Optimisation of submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Pleurotus nebrodensis*. *Ann. Microbiol.* 57(3): 389-391
- Jiang, H., Liang, C., Liu, X., Jiang, Q., He, Z., Wu, J., Pan, X., Ren, Y., Fan, M., Li, M., Wu, Z. (2010).** Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis*, 210(1): 71-77.
- Jiang, J., Grieb, G., Thyagarajan, A. Sliva D. (2008).** Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. *Int. J. Mol. Med.* 21(5): 577-584.
- Jinming G., Lin H., Jikai L. (2001).** A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum*. *Steroids*, 66: 771-775.
- Jonathan, S.G., Fasidi, I.O. (2001a).** Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chem.* 72: 479-483.
- Jonathan, S.G., Fasidi, I.O. (2001b).** Studies on phytohormones, vitamins, and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. *Food Chem.* 75(3): 303-307.
- Jonathan, S.G., Fasidi, I.O. (2003).** Studies on *Psathyrella atroumbonatai* (Pegler), a Nigerian edible fungus. *Food Chem.* 81: 481-484.
- Jong, S.C., Birmingham J.M. (1992).** Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* 37: 101-134.
- Jose, N., Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. (2004).** Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytother. Res.* 18: 43-46.

- Joseph, S., Sabulal, B., George, V., Smina, T.P., Janardhanan, K.K. (2009). Antioxidative and Antiinflammatory Activities of the Chloroform Extract of *Ganoderma lucidum* Found in South India. *Sci. Pharm.* 77: 111-121.
- Jumpathong, J., Peberby, J., Fujii, I., Lumyong, S. (2011). Chemical investigation of novel ascomycetes using PCR based screening approaches. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s11274-011-0651-4.
- Jun, Y.I., Ti-Qiang, C., Jin-Zhong, W. (2006). Studies on Dietary Fiber in Mushrooms. *J. Fung. Res.* 4 (2): 49-53.
- Juntes, P., Rebolj, K., Sepčič, K., Maček, P., Žužek, M.C., Cestnik, V., Frangež, R. (2009). Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle-and large-sized vessels. *Toxicon* 54(6): 784-792.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* 113: 9-16.
- Kanagasabapathy, G., Malek, S.N.A., Kuppusamy, U.R., Vikineswary, S. (2011). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts of Fresh Fruiting Bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2618–2626.
- Kanu, P.J., Zhu, K., Kanu, J.B., Zhou, H., Qian, H., Zhu, K. (2007). Biologically active components and nutraceuticals in sesame and related products: a review and prospect. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 599–608.
- Karácsanyi, Š., Kuniak, L. (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan, *Carbohydr. Polym.* 24: 307–312
- Kasahara, A. (1987). *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 62.* 153: 271.
- Katapodis, P., Christakopoulou, V., Kekos, D., Christakopoulos, P. (2007). Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using Response Surface Methodology. *Biochem. Eng. J.* 35: 136-141.
- Kavanagh, F., Hervey, A., Robbins, W.J. (1951). Antibiotic Substances from Basidiomycetes VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat. *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 37 (9): 570-574.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B.R., Shashirekha, M.N., Rajarathnam, S. (2008). Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chem.* 106: 597–602.
- Kawagishi, H., Mitsunaga, S., Yamawaki, M., Ido, M., Skimado, A., Kinoshita, T., Murata, T., Ushui, T., Kimura, A. and Chiba S. (1997). A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry.* 41: 1041-1046.
- Ker, Y.B., Chen, K.C., Chyau, C.C. (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. *J. Agric. Food Chem.* 53 (18): 7052–7058.
- Kettering, M., Valdivia, C., Sterner, O., Anke, H., Thines, E. (2005). Heptemerones A-G, seven novel diterpenoids from *Coprinus heptemerus*: producing organism, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antib.* 58 (6): 390-6.
- Khatun, K., Mahtab, H., Khanam, P.A., Sayeed, M.A., Khan, K.A. (2007). Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Med. J.* 16 (1): 94–99.
- Kidd, P.H. (2000). The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alt. Med. Rev.* 5: 4-27.
- Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S., Ukai, S. (1996). Polysaccharide in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of polysaccharide (CF-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 294-296.

- Kim, D.H., Yang, B.K., Jeong, S.C., Park, J.B., Cho, S.P., Das, S., Yun, J.W., Song, C.H. (2002). Production of hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.* 23: 513–517.
- Kim, G.Y., Kim, S.H., Hwang, S.Y., Kim, H.Y., Park, Y.M., Park, S.K. (2003). Oral administration of proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* in the prevention and treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 823–831.
- Kim, H.M., Paik, S.Y., Ra, K.S., Koo, K.B., Yun, J.W., Choi, J.W. (2006). Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *J. Microbiol.* 44(2): 233–242.
- Kim, H.M., Park, M.K., Yun, J.W. (2005). Culture pH affects the exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *G. lucidum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 134: 249–262.
- Kim, H.O., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W., Yun, J.W. (2005a). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresour. Technol.* 96: 1175–1182.
- Kim, H.O., Yun, J.W. (2005b). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *J. Appl. Microbiol.* 99(4): 728–738.
- Kim, H.W., Kim, B.K. (1999). Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt:Fr.) P.Karst. (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mush.* 1: 121–138
- Kim, M.Y., Chung, I.M., Lee, S.J., Ahn, J.K., Kim, E.H., Kim, M.J., Kim, S.L., Moon, H.I., Ro, H.M., Kang, E.Y., Seo, S.H., Song, H.K. (2009). Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chem.* 113: 386–393.
- Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *J. Agric. Food Chem.* 56 (16): 7265–7270.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H., Yun, J.W. (2002a). Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Let. Appl. Microbiol.* 34: 55–61.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C. P., Sung, G.H., Choi, J.W., Yun, J.W. (2003). Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *J. Appl. Microbiol.* 94: 120–126.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Na, Y.S., Song, S. K., Yun, J.W. (2002b). Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exo-biopolymer production in *Paecilomyces sinclairii*. *Let. Appl. Microbiol.* 34: 389–393.
- Kim, W.G., Lee, I.K., Kim, J.P., Ryoo, I.J., Koshino, H., Yoo, I.D. (1997). New indole derivatives with free radical scavenging activity from *Agrocybe cylindracea*. *J. Nat. Prod.* 60 (7): 721–723.
- Kim, Y.O., Han, S.B., Lee, H.W., Ahn, H.J., Yoon, Y.D., Jung, J.K. (2005). Immunostimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Lnonotus obliquus*. *Life Sci.* 77: 2438–2456.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi. 10th ed.* Wallingford, CABI. p. 272.
- Kleinwächter, P., Anh, N., Kiet, T.T., Schlegel, B., Dahse, H.M., Härtl, A., Gräfe, U. (2001). Colossolactones, new triterpenoid metabolites from a Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *J. Nat. Prod.* 64: 236–239.
- Knip, M., Douek, I.F., Moore, W.P., et al. (2000). Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 43 (11): 1337–1345.
- Ko, H.H., Hung, C.F., Wang, J.P., Lin, C.N. (2008). Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *Phytochemistry* 69(1): 234–239.

- Kobayashi, H., Matsunaga, K., Oguchi, Y. (1995).** Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent.* 4 (3): 275–81.
- Kogan, G. (2000).** (1->3, 1->6)- β -D-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 23: 107-152.
- Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M. (1985).** The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst, histamine release inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 1367–1374.
- Kokubun, T., Veitch, N.C., Bridge, P.D., Simmonds, M.S.J. (2003).** Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. *Phytochemistry* 62(5): 779-782.
- Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y., Sato, Y. (1989).** Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 531–533.
- Konuk, M., Afyon, A., Yağiz, D. (2006).** Chemical Composition of some naturally growing and edible Mushrooms. *Pak. J. Bot.* 38(3): 799-804.
- Kossen, N.W.F. (2000).** The morphology of filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 70: 1- 33.
- Kostelc, J.G., Hendry, L.B. (1981).** Hydrocarbon constituents from white strains of the mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Singer. *J. Agric. Food Chem.* 29: 185–186.
- Koyama, K., Imaizumi, T., Akiba, M., Kinoshita, K., Takahashi, L., Suzuki, A., et al. (1997).** Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. *Planta Med.* 63: 224–227.
- Kren, V., Rezanka, T., Sajdl, P., Rehacek, Z (1985).** Identification of fatty acids in submerged cultures of *Claviceps* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 30, 359-363.
- Kruger, C.L., Mann, S.W. (2003).** Safety evaluation of functional ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 41: 793–805.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* 38: 310–319.
- Kubota, T., Asaka, Y., Minura, I., Mori, H. (1982).** Structures of Ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Helv. Chim. Acta* 65:611-619.
- Kuforiji, O.O., Fasidi, I.O. (2009).** Biodegradation of agro-industrial wastes by an edible mushroom *Pleurotus tuber-regium* (Fr.). *J. Environ. Biol.* 30(3): 355-358.
- Kuo, M.C., Weng, C.Y., Ha, C.L., Wu, M.J. (2006).** *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- κ B. *J. Ethnopharmacol.* 103 (2): 217–222.
- Kupche É.L., Mikstais U.Ya. (1980).** Effect of the solvent on the ^{13}C NMR spectra of pyrimidine nucleosides. *Chem. Heterocycl. Compd.* 16: 1184-1186.
- Kurosumi, A., Kobayasi, F., Mtui, G., Nakamura, Y. (2006).** Development of optimal culture method of *Sparassis crispa* mycelia and a new extraction method of antineoplastic constituent. *Biochem. Eng. J.* 30: 109–113.
- Kurt, S., Buyukalaca, S. (2010).** Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 101 (9): 3164-3169.
- Lapadatescu, C., Giniès, C., Le Quèrè, J. -L., Bonarme, P. (2000).** Novel Sceme For Biosynthesis of Aryl Metabolites from L-Phenylanine in the Fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environm. Microbiol.* 66(4): 1517-1522.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., Biliaderis, C.G. (2007).** Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J. Food Eng.* 79: 1033-1047.

- Leconte, O., Bonfils, J.P., Sanvaire, Y. (1997).** Protective effect of iridals from saponin injury in *Candida albicans* cells. *Phytochemistry*, 44: 575-579.
- Lee, B.C., Bae, J.T., Pyo, H.B., Choe, T.B., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W. (2004).** *Enzyme Microbiol. Technol.* 35(5): 369–376.
- Lee, H., Song, M., Hwang, S. (2003).** Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 38: 1685–1693.
- Lee, I.K., Kim, Y.S., Jang, Y.W., Jung, J.Y., and Yun B.S. (2007).** New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorgan. Med.Chem. Lett.* 17: 6678–6681.
- Lee, K.M., Lee, S.Y., Lee, H.Y. (1999).** Bistage control of pH for improving exopolysaccharides production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 88(6): 646–650.
- Lee, S.H., Hwang, H.S, and Yun, J.W. (2009).** Production of polysaccharides by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* and their apoptotic effects on human neuroblastoma cell. *Korean J. Chem. Eng.*, 26(4): 1075-1083.
- Lee, W.Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K. H., and Park, S.Y. (2007).** Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 40(2): 249–254.
- Lee, Y.L., Huang, G.W., Liang, Z.C., Mau, J.L. (2007).** Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. *Lebensm. Wiss. Technol.* 40: 823–833.
- Leifa, F., Andra, T.S., Ashok P., Carlos, R.S. (2007).** Effect of nutritional and environmental conditions on production of exopolysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by sub-merged fermentation and its antifumor activity. *LWT* 40: 30-35.
- León, F., Valencia, M., Augusto, R., Nieto, I., Quintana, J., Estevez, F., et al. (2003).** Novel cytostatic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma australe*. *Helv. Chim. Acta* 86: 3088-3095.
- Levy, L.M., Cabrera, G.M., Wright, J.E., Seldes, A.M. (2000).** Indole alkaloids from a culture of the fungus *Aporpium caryae*. *Phytochemistry* 54(8): 941-943.
- Li, C., Yin, J., Guo, F., Zhang, D., Sun, H.H. (2005a).** Ganoderic acid Sz, a new lanostanoid from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Prod. Res.* 19(5): 461-465.
- Li, C.H., Chen, P.Y., Chang, U.M., Kan, L.S., Fang, W.H., Tsai, K.-S., Lin, S.B. (2005b).** Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sci.* 77: 252–265.
- Li, L., Ng, T.B., Song, M., Yuan, F., Liu, Z.K., Wang, C.L., Jiang, Y., Fu, M., Liu, F. (2007).** A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 863–869.
- Li, L.Y., Diang, Y., Groth, I., Menzel, K.D., Peschel, G., Voigt, K., Deng, Z.W., Sattler, I., Lin, W.H. (2008).** Pyrrole and indole alkaloids from an endophytic *Fusarium incarnatum* (HK100504) isolated from the mangrove plant. *J.Asian Nat.Prod. Res.*, 10(7-8): 775-780.
- Li, S.P., Zhang, G.H., Zeng, Q. (2006).** Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. *Phytomedicine* 13 (6): 428–33.
- Li, Y., Yang, Y., Fang, L., Zhang, Z., Jin, J., Zhang, K. (2006).** Anti-hepatitis activities in the broth of *Ganoderma lucidum* supplemented with a Chinese herbal medicine. *Am. J. Chin. Med.* 34 (2): 341–349.
- Li, Y.Q., Fang, L., Zhang, K.C. (2007).** Structure and bioactives of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Polym.* 68: 323-328.

- Li, Y.R., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780 (1): 51-57.
- Lin, E.S., Ko, H.C. (2005). Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible basidiomycetes *Antrodia cinnamomea*. *Enzyme Microb. Technol.* 37: 261–265.
- Lin, E.S., Wang, C.C., Sung, S.C. (2006). Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 98–102.
- Lin, J.H., Yang, S.S. (2006). Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murrill by submerged fermentation. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 39: 98–108.
- Lin, S.B., Li, C.H., Lee, S.S., Kan, L.S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci.* 72: 2381–2390.
- Lin, Z.B., Zhang, H.N. (2004). Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacol. Sin.* 25 (11): 1387–1395.
- Lindequist, U. (1995). Structure and biological activity of triterpenes, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*. In: Kim, B.K., Kim, I.H., Kim, Y.S. (Eds.), Proceedings of the 6th International Symposium on Recent Advances in *Ganoderma lucidum* Research. *The Pharmaceutical Society of Korea*, Seoul, pp. 61-91.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Julich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2: 285–299.
- Liu, C., Zhao, F., Chen, R.Y. (2010). A novel alkaloid from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang. *Chin. Chem. Lett.* 21(2): 197-199.
- Liu, D., Hu, Z., Liu, Z., Yang, B., Tu, W., Li, L. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*. *J. Nanjing Med. Univ.* 23 (3): 168-172.
- Liu, G.Q., Wang, X.L. (2007). Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1): 78–83.
- Liu, G.Q., Zhang, K.C. (2006). Enhancement of polysaccharides production in *Ganoderma lucidum* by the addition of ethyl acetate extracts from *Eupolyphaga sinensis* and *Catharsius molossus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(3): 572 – 577.
- Liu, J., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamoto, S., Kurashiki, K., Kondo, R. (2007). Antiandrogenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chem.* 100: 1691–1696.
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., Wang, S., Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 426-433.
- Liu, W., Wang, H., Pang, X., Wenbing, Y., Gao, X. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 46(4): 451-457.
- Liu, X., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Deng, P., Fan, K., Wang, G., Wang, L., Zhang, J. (2010). Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp.* mycelium. *Int. J. Biol. Macromol.* 47(2): 116-9.
- Liu, Y., Fukuwatari, Y., Okumura, K., Takeda, K., Ishibashi K., Furukawa, M., Ohno, N., Mori, K., Gao, M., Motoi, M. (2008). Immunomodulating Activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in Mice and in Human Volunteers. *eCAM* 5 (2): 205–219.

- Lo, H.C., Hsu, T.H., Chen, C.Y. (2008).** Submerged culture mycelium and broth of *Grifola frondosa* improve glycemic responses in diabetic rats. *American J. Chinese Med.* 36 (2): 265–285.
- Lo, H.C., Tu, S.T., Lin, K.C., Lin, S.C. (2004).** The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. *Life Sci.* 74 (23): 2897–2908.
- Lolk, L., Pøhlsgaard, J., Jepsen, A. S., Hansen, L. H., Nielsen, H., Steffansen, S. I., Sparving, L., Nielsen, A. B. et al. (2008).** A Click Chemistry Approach to Pleuromutilin Conjugates with Nucleosides or Acyclic Nucleoside Derivatives and Their Binding to the Bacterial Ribosome. *J. Medic. Chem.* 51 (16): 4957–4967.
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M., Lesage-Meesen, L. (1999).** Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for food industry. *Focus* 17: 282–289.
- Long, K.S. (2006).** Interaction of Pleuromutilin Derivatives with the Ribosomal Peptidyl Transferase Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (4): 1458–1462.
- Lopez-Huertas, E. (2010).** Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol. Res.* 61(3): 200-207.
- Lösel, D.M. (1988).** Fungal lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, Vol 1. Academic Press, London, pp. 699–805.
- Lou, S.N., Montag, A. (1994).** Changes in the nucleostatus of mushrooms during storage and thermal processing. *Deutsche Lebensmittel- Rundschau*, 90: 278–284.
- Lourenço, M.C.S., De Souza, M.V.N., Pinheiro, A.C., De Ferreira, M.L., Gonçalves, R.S.B., Noqueira, T.C.M., Peralta, M.A. (2007).** Evaluation of anti-tuberular activity of nicotinic acid and isoniazid analogues. *Arcivoc* xv: 181-191.
- Lv, H., Kong, Y., Yao, Q., Zhang, B., Leng, F.W., Bian, H.J., Balzarini, J., Damme, E.V., Bao, J.K. (2009).** Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. *Phytomedicine* 16: 198-205.
- Maas, R.H.W., Springer, J., Eggink, G., Weusthuis, R.A. (2008).** Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L (+)-lactic acid production. *J. Indian Microbiol. Biotechnol.* 35: 569–578.
- Machida, K., Trifonov, L.S., Ayer, W.A., Lu, Z.X., Laroche, A., Huang, H.C., Cheng, K.J., Zantige, J.L. (2001).** 3(2H)-benzofuranones and chromanes from liquid cultures of the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Phytochemistry* 58: 173-177.
- Maeda, K., Fukuda, M. (1991).** In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42: 361-368.
- Maga, J. (1981).** Mushroom flavor. *J. Agric. Food Chem.* 29: 1–4.
- Mahajan, R.G., Patil, S.I., Mohan, D.R.K., Shastry, P. (2002).** *Pleurotus eous* mushroom lectin (PEL) with mixed carbohydrate inhibition and antiproliferative activity on tumor cell lines. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 6: 341–345.
- Mahier, H.R., Cordes, E.H. (1971).** *Biological Chemistry* (2nd Ed.) New York Hamper and Row.
- Mahmood, Z.A., Ahmed, S.W., Azhar, I., Sualeh, M., Baig, M.T., Zaha, S. (2010).** Bioactive alkaloids produced by fungi. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23(3), 349-357.
- Maiti, S., Bhutia, S.K., Mallick, S.K., Kumar, A., Khadgi, N., Maiti, T.K. (2008).** Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26 (2): 187-191.
- Maliverney, C., Mulhauser, M. (2000).** Hydroxybenzaldehydes. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley-VCH, Weinheim.

- Mandeel, Q.A., Al-Laith, A.A., Mohamed, S.A. (2005).** Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21(4): 601-607.
- Mansur, M., Arias, M.E., Copa-Patiño, J.E., Flärdh, M., González, A.E. (2003).** The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* 96(6): 1013-1020.
- Mantle, P.G. (2009).** The role of tryptophan as a biosynthetic precursor of indole-diterpenoid fungal metabolites: Continuing a debate. *Phytochemistry* 70: 7-10.
- Mantzouridou, F., Roukas, T., Kotzekidou, P. (2002).** Effect of the aeration rate and agitation speed on β -karotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank bioreactor: mathematical modeling. *Biochem. Eng. J.* 10: 123-133.
- Manu-Tawiah, W., Martin, A.M. (1987).** Chemical Composition of *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass. *Food Microbiol.* 4: 303-310.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001).** Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 73: 321-325.
- Manzi, P., Pizzoferrato, L. (2000).** Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem.* 68: 315–318.
- Manzoni, M., Bergomi, S., Rollin, M., Cavazzoni, V. (1999).** Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett.* 21: 253 - 257.
- Manzoni, M., Rollini, M. (2001).** Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1491–1497.
- Mao, X. B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S., Zhong, J. J. (2005).** Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Proc. Biochem.* 40: 1667-1672.
- Margaill, I., Plotkine, K., Lerouet, D. (2005).** Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biol. Med.* 39: 429.
- Marquez-Rocha, F.J., Guillen, G.K., Sanchez, J.E., Vazquez-Duhalt, R. (1999).** Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactor. *Biotechnol. Technol.* 13: 29–32.
- Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Prieto, A., Blanco, M.N. (1991).** Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from southern Chile. *Mycol. Res.* 95: 782–784.
- Matos, A.J., Bezerra, R.M., Dias, A.A. (2007).** Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Lett. Appl. Microbiol.* 45 (3): 270–275.
- Matsuur, H., Asakawa, C., Kurimoto, M., Mizutani, J. (2002).** Alpha-glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (7): 1576–1578.
- Matsuura, R., Ukeda, H., Sawamura, M. (2006).** Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54(6): 2309-2313.
- Matthan, N.R., Dillard, A., Lecker, J.L., Ip, B., Lichtenstein, A.H. (2009).** Effects of Dietary Palmitoleic Acid on Plasma Lipoprotein Profile and Aortic Cholesterol Accumulation are similar to those of other Unsaturated Fatty Acids in the F1B Golden Syrian Hamster. *J. Nutr.* 139(2): 215-221.
- Mattila, P., Kónkó, K., Eurola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001).** Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2343-2348.
- Mattila, P., Lampi, A.M., Ronkainen, R., Toivo, J., Piironen, V. (2002a).** Sterol and vitamin D₂ contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chem.* 76: 293–298

- Mattila, P., Piironen, V., Uusi-Rauva, E., Koivistoinen, P. (1995).** Cholecalciferol and hydroxycholecalciferol contents in edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 42:2449-2454.
- Mattila, P., Suonpaa, K., Piironen V., (2000).** Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* 16 (7-8): 694-696.
- Mattila, P., Vaananen, P.S., Konko, K., Aro, H., Jalava, T. (2002b).** Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 6419–6422.
- Mau, J.L., Lin, Y.P., Chen, P.T., Wu, Y.H., Peng, J.T. (1998).** Flavour components in King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*. *J. Agric. Food Chem.* 46(11): 4587-4591.
- Mauger, J.F., Lichtenstein, A.H., Ausman, L. M., Jalbert, S.M., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Lamarche, B. (2003).** Effect of different dietary forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 370–375.
- Maura, T.T., Francisco, F.J., Monica, M.G.A., Carmen, S., Gerardo, D.G. (2009).** Laccases production by an atypical-behavior strain of *Pleurotus ostreatus* in solid-state and submerged fermentation. *New Biotechnol.* 25(1): S56.
- Mayr, P., Patschacher, B., Nidetzky, B. (2003).** Xylose reductase from the basidiomycetes fungus *Cryptococcus flavus*: purification, steady-state kinetic characterization, and detailed analysis of the substrate binding pocket using structure–activity relationships. *J. Biochem.* 133: 553–562.
- Maziero, R., Cavazzoni, V., Bononi, R.V.L. (1999).** Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Rev.Microbiol.*30: 77-84.
- McKee, L.H., Latner, T.A. (2000).** Under utilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 55 (4): 285-304.
- McKenna, D.J., Jones, K., Hughes, K. et al. (2002).** Reishi Botanical Medicines: The Desk reference for Major Herbal Supplements, 2nd Ed., *Haworth Herbal Press*, New York.
- McNeil, B., Kristiansen, B., Seviour, R.J. (1986).** Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 1210–1212.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O. (2008).** Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulotic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresour. Technol.* 99: 7842-7847.
- Mendez, J.A., Vellon, L., Colomer, R., Lupu, R. (2005).** Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann. Oncol.* 16: 359-371.
- Mendil, D., Uluözlü, O. D., Hasdemir, E., Çağlar, A. (2004).** Determination of trace elements on some wild edible mushroom samples from Kastamonou, Turkey. *Food Chem.* 88: 281–285.
- Mendonça, R.T., Jara, J.F., González, V., Elessetche, J.P., Freer, J. (2008).** Evaluation of the white rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1323-1330.
- Mikeš, V., Zofall, M., Chytil, M., Fulneček, J., Scháně, L. (1994).** Ammonia assimilating enzymes in the basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology* 140: 977-982.
- Mikiashvili, N. Wasser, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V. (2006).** Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 999–1002.
- Miles, P.G., Chang, S.T. (1997).** Mushroom Biology, Concise Basics and Current Developments. World Scientific: Singapore.
- Milfin, B.J. (1981).** Biochemistry of plants. (Amino acids and derivatives, Volume 5). New York, Academic Press.

- Miller, G. E. (1959).** Use of DNS a reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Min, B.S., Gao, J.J., Hattori, M., Lee, H.K., Kim, Y.H. (2001).** Anticomplement activity of triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Planta Med.* 67: 811–814.
- Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W., Hattori, M. (1998).** Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 46: 1607–1612.
- Mizuno, T. (1991).** Antitumor polysaccharides of polyporaceae fungi, *Ganoderma applanatum* and *Fomitopsis pinicola*. In: *3d Symp. Ganoderma lucidum*, Seoul, Korea, pp. 25-31.
- Mizuno, T., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H., Tsuchida, H. (1999).** Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47: 707–714.
- Mongi, F., Edward, C., William, H., Gwang-Hoon, G., Almadidy, A. (2005).** Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 855-862.
- Moon, B., Baker, B.J., McClintock, J.B. (1998).** Purine and Nucleoside Metabolites from the Antarctic Sponge *Isodictya erinacea*. *J. Nat. Prod.* 61: 116-118.
- Moreno, J.J., Mitjavila, M.T. (2003).** The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis [review]. *J. Nurt. Biochem.* 14: 182–195.
- Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, Y., Ikekawa, N. (1986).** Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 3025–3028.
- Mothana, R.A.A., Awadh, N.A.A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. (2003).** Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi* BRES. *Fitoterapia* 74: 177-180.
- Mothana, R.A.A., Jansen, R., Jülich, W.D., Lindequist, U. (2000).** Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.* 63: 416–418.
- Mradali, M.F., Mostafavi, H., Hejaroude, G.A., Tehrani, A.S., Abbasi, M., Ghods, S. (2006).** Investigation of potential antibacterial properties of methanol extracts from fungus *Ganoderma applanatum*. *Chemotherapy* 52 (5): 241–244.
- Mshandete, A.M., Cuff, J. (2007).** Proximate and nutrient composition of three types of indigenous edible wild mushrooms grown in Tanzania and their utilization prospects. *African J. Food Agr. Nutr. Develop.* 7(6):1-16.
- Mu, Y.M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C.H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H. (2001).** Saturated FFAs, Palmitic Acid and Stearic Acid, Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. *Endocrinology* 142(8):3590–3597.
- Mueller, C.I., Kumagai, T., Kelly, J.O., Seeram, N.P., Heber, D., Koeffler, H.P. (2006).** *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Res.* 30: 841–848.
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Guha, A. K. (2005).** Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. *Process Biochem.* 40(3–4): 1241–1244.
- Murugkar, D.A., Subbulakshmi, G. (2005).** Nutritional Value of Edible Wild Mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chem.* 89: 599-603.
- Mysyakina, I.S., Funtikova, N.S. (2007).** The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi. *Microbiology* 76: 1-13.
- Nasfey, S.K. (1988).** Carbon-13 NMR of biologically important aromatic acids. Chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 94: 8564-8566.
- National Research Council (1989).** *Recommended dietary allowances, 10th ed.* Washington, DC, National Academy Press

- Newman, J.D., Chappell, J. (1999).** Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34: 95- 106
- Ng, T.B., Wang, H.X. (2004).** A novel ribonuclease from fruiting bodies of the common edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25(8): 1365-1368.
- Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2003).** Lektin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci.* 73: 3363–3374.
- Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2004).** A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides* 25: 11–17.
- Ngai, P.H.K., Ng, T.B. (2006).** A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1185–1191.
- Niedermeyer, T.H.J., Lindequist, U., Mentel, R., Gördes, D., Schmidt, E., Thurow, K., Lalk, M. (2005).** Antiviral terpenoids constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.* 68: 1728–1731.
- Niemenma, O., Galkin, S., Hatakka, A. (2008).** Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. *Int. Biod. Biodegr.* 62: 125–134.
- Nieto, I.J., Chegwin, C.A. (2008).** Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *J. Chil. Chem. Soc.* 53 (2): 1515-1517.
- Niren, N.M. (2006).** Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review. *Cutis* 77 (1 Suppl): 11–6.
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1985a).** New terpenoids from *G.lucidum* and their bitterness. *Agric. Biol. Chem.* 49(5): 1547-1549.
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1985b).** New terpenoids, Ganoderic Acid J and Ganolucidic acid C from the fungus *G.lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49(12): 3637-3638
- Nishitoba, T., Sato, H., Sakamura, S. (1987).** Novel mycelial components, Ganoderic acid Mg, Mh, Mi and Mk from the fungus *G.lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 51(4): 1149-1153.
- Nishitoba, T., Sato, H., Shirasu, S., Sakamura, S. (1986).** Evidence on the strainspecific terpenoid pattern of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2151–2154.
- Nobre, A., Duarte, L.C., Roseiro, J.C., Gírio, F.M. (2002)** A physiological and enzymatic study of *Debaryomyces hansenii* growth on xylose- and oxygen-limited chemostats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:509–516.
- Noguchi, M., Kakum, T., Tomiyasu, K., Yamada, A., Itoh, K., Konishi, F., Kumamoto, S., Shimizu, K, Kondo, R., Matsuoka, K. (2008).** Randomized clinical trial of an ethanol extract of *Ganoderma lucidum* in men with lower urinary tract symptoms. *Asian J.Androl.* 10(5): 777-785.
- Nosál'ová, V., Bobek, P., Cerna, S., Galbavy, S., Stvrtina, S. (2001).** Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol. Res.* 50: 575–581.
- Novac, M., Vetricna, V. (2008).** β -Glucans, history, and present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J. Immunotoxicol.* 5: 47-57.
- Novaes M.R.C.G., Novaes, L.C.G., Taveira, V.C. (2007).** Natural Products from *Agaricales* Medicinal Mushrooms: Biology, Nutritional Properties, and Pharmacological Effects on Cancer *Revista Brasileira de Cancerologia* 53(4): 411-420.
- Nozawa, K., Takada, M., Udagowa, S.I., Nakajiima, S., Kawai, K.I. (1989).** Three *p*-hydroxybenzoic acid derivatives from *Talaromyces dextii*. *Phytochemistry* 28(2): 655-656.
- Oei, P. (2005).** Small scale Mushroom Cultivation. de Feijter, J. (Ed.). Agromisa Foundation and CTA.
- Ofofodile, L.N., Uma, N.U., Kokubun, T., Grayer, R.J., Ogundipe, O.T. Simmonds, M.S.J. (2005).** Antimicrobial Activity of Some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother. Res.* 19: 310–313.

- Oh, J.Y., Cho, E.J., Nam, S.H., Choi, J.W., Yun, J.W. (2007). Production of polysaccharide peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. *Process Biochem.* 42: 352–362.
- Olivieri, G., Marzocchella, A., Salatino, P., Giardina, P., Cennamo, G., Sannia, G. (2006). Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Eng. J.* 31: 180-187.
- Ooi, V.E., Liu, F.A. (1999). A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int. J. Med. Mushroom.* 1: 196–206.
- Outila, T., Mattila, P., Piironen, V., Lamberg-Allardt, C. (1999). Bioavailability of vitamin D from edible mushrooms (*Chanterellus tubaeformis*) as measured with human bioassay. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 95-98.
- Ouzouni, P., Petridis, D., Koller, W.D., Riganakos, K.A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chem.* 115: 1575-1580.
- Ouzouni, P., Riganakos, K.A. (2007). Nutritional value and metal content profile of Greek wild edible fungi. *Acta Alimentaria* 36: 99–110.
- Ozcan, M., Akgül, A. (1998). Influence of Species, Harvest Date and Size on Composition of Capers (*Capparis* spp.) Flower Buds. *Nahrung* 42: 102.
- Pan, Y., Hao, Y., Chu, T., Li, C., Zhang, Z., Zhou, Y. (2010). Ultrasonic-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on osteoblast cells. *Carbohydr. Polym.* 80 (3): 922-926.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2002). Purification and characterization of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from *Fusarium oxysporum*, *Biotechnol. Lett.* 24 : 2089–2092.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. *Biotechnol. Adv.* 22: 189–259.
- Papagianni, M., Matthey, M., Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 710–717.
- Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Biores. Technol.* 101(6): 1941-1946.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005). Diets and cardiovascular disease: an evidence-based assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45: 1379–1387.
- Park, C., Lim, J.S., Lee, Y., Lee, B., Kim, S.W., Lee, J., Kim S. (2007). Optimization and morphology for decolorization of reactive black 5 by *Funalia trogii*. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1758-1764.
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J., Yun, J.W. (2002). Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-polymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 250–255.
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W. (2001). Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 76-81.
- Pastrorova, I., de Koster, C.G., Boom, J.J. (1997). Analytic Study of Free and Ester Bound Benzoic and Cinnamic Acids of Gum Benzoin Resins by GC-MS HPLC-frit FAB-MS. *Phytochem. Anal.* 8: 63-73.
- Patel, G.B., Agnew, B.J. (1988). Growth and butyric acid production by *Clostridium populeti*. *Arch. Microbiol.* 150: 267–271.
- Paterson, R.M.M. (2006). *Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67: 1985-2001.
- Paulik, Š., Mojišová, J., Ďurove, A., Benišek, Z., Húska, M. (1996). The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. *J. Veter Med. Biol.* 43: 129–135.
- Pazouki, M., Panda, T. (2000). Understanding the morphology of Fungi. *Bioprocess Eng.* 22: 127-143.

- Pedneault, K., Angers, P., Avis, T.J., Gosselin, A., Tweddell, R.J. (2007).** Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. *citrino-pileatus* grown at different temperatures. *Mycol. Res.* 111: 1128-1234.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., Tweddell, R.J. (2006).** Fatty acid composition of lipids belonging to the family Boletaceae. *Mycol. Res.* 110: 1179–1183.
- Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F., Kennedy, J.F. (2005).** Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. *Carbohydr. Polym.* 59 (3): 385-392.
- Periasamy, K. (2005).** Novel antibacterial compounds obtained from some edible mushrooms. *Int. J. Med. Mush.* 7: 443–444.
- Petersen, R.H., Nicholl, D.B.G., Hughes, K.W. (1997).** Mating systems of some putative polypore-agaric relatives. *Plant Syst. Evol.* 201: 135-158.
- Philippoussis, A. Zervakis, G. (2000).** Cultivation of edible mushrooms in Greece: Presentation of the current status and analysis of future trends. *Proceedings of the XVth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*, Van Griensven, L.J.L.D. (Ed.), Balkema Publishing, Rotterdam, The Netherlands, pp. 843-848.
- Picardi, S.M., Issenberg, P. (1973).** Volatile constituents of mushrooms (*Agaricus bisporus*). Changes which occur during heating. *J. Agric. Food Chem.* 21 (6): 959–962.
- Pillai, T.G., Nair, C.K.K., Janardhanan, K.K. (2008).** Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. *Environm. Toxicol. Pharm.* 26(1): 80-85.
- Ping, C.X., Yan, C., ShuiBing, L., Guo, C.Y., Yun, L.J., Ping, L.L. (2009).** Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats. *Carb. Polym.* 77(2): 389-393.
- Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Sámi, L., Emri, T. (2006).** Autolysis of *Penicillium chrysogenum*-a holistic approach. *Indian J. Biotechnol.* 2: 293-301.
- Pokhrel, C.P., Ohga, S. (2007).** Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharide production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chem.* 105(2): 641-646.
- Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. (2006).** Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20-Year Retrospective Analysis. *Cryptog. Mycol.* 27 (4): 311-333.
- Pozharskii, A.F., Soldatenkov, A.T., Katritzky, A. (1997).** Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry and Biochemistry and the Role of Heterocycles in Science, Technology, Medicine, and Agriculture. New York, John Wiley and Sons.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, J.W. DeVreis, T.F., Furda, I. (1988).** Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaborate study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1017–1023.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, J.W., DeVries, T.F., Furda, I. (1992).** Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75: 360-367.
- Protiva, J., Skorkovska, H., Urban, J., Vystrcil, A. (1979).** Triterpenes and steroids from *Ganoderma applanatum*. *Collection Czechoslov Chem Commun* 45: 2710-2713.
- Purkarthofer, T., Gruber, K., Fechter, M., Grienge, H. (2005).** Asymmetric biocatalytic hydrocyanation of pyrrole carboxaldehydes. *Tetrahedron* 61: 7661-7668.
- Quang, D.N., Hashimoto, T., Nukada, M., Yamamoto, Y., Hitaka, Y., Tanaka, M., Asakawa, Y. (2003).** Thelephantins A, B and C: three benzoyl *p*-terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora aurantiotinct*. *Phytochemistry* 62: 109-113.

- Rai, M., Tidke, G., Wasser, S.P. (2005). Therapeutic Potential of Mushrooms. *Nat. Prod. Rad.* 4(4): 246-257.
- Raimondi, M. V., Cascioferro, S., Schillaci, D., Petruso, S. (2006). Synthesis and antimicrobial activity of new bromine-rich pyrrole derivatives related to monodeoxyxypoluteorin. *Eur. J. Med. Chem.* 41: 1439–1445.
- Rajakumar, K., Greenspan, S.L., Thomas, S.B., Holick, M.F. (2007). Solar ultraviolet radiation and vitamin D: a historical perspective. *Am. J. Public Health* 97 (10): 1746–1754.
- Rapior, S., Fous, F., Bessi re, J.M. (2003). Volatile Flavor constituents of *Lepista nebularis* (Clouded Clitocybe). *Cryptogamie, Mycol.* 24(2): 159-166.
- Rapior, S., Konska, G., Guillot, J., Andary, C., Bessiere, J.M. (2000). Volatile compounds of *Laetiporus sulphureus*. *Cryptogamie, Mycol.* 21(1): 67-72.
- Rasser, F., Anke, T., Sterner, O. (2002). Terpenoids from *Bovista* sp. 96042. *Tetrahedron* 58(39): 7785-7789.
- Rau, U. (1999). Production of Schizophyllan. In: Bucke C. (Ed.) *Methods in biotechnology, carbohydrate biotechnology protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 10: 43-57
- Rau, U. (2004). Glucans secreted by fungi. *Turk. Electron. J. Biotechnol.* 2: 30–36.
- Rau, U., Gura, E., Olszewski, E., Wagner, F. (1992). Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 9: 1.
- Regula, J., Siwulski, M. (2007). Dried Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*P.ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. *Acta Scientiarum Polonorum, Technol.Aliment.* 6 (4): 135-142.
- Reshetnikov, S.V., Wasser, S.P., Tan, K.K. (2001). Higher Basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides, review. *Int. J. Med. Mush.* 3: 361-394.
- Revankar, M.S., και Lele, S.S. (2007). Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresour. Technol.* 98: 775–780.
- Řezanka, T., Sigler, K. (2009). Odd numbered very-long chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Prog. Lipid Res.* 48: 206-238.
- Ribeiro, B., Guedes de Pinho, P., Andrade, P.B., Baptista, P., Valent o, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchem. J.* 93: 29–35.
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Gonçalves, R.F., Baptista, P., Quelhas, I., Valent o, P. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chem.* 110(1): 47-56.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valent o, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 54(22): 8530-8537.
- Ribeiro, B., Valent o, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food Chem. Toxicol.* 45: 1805–1813.
- Rigas, F., Dritsa, V. (2006). Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 120-124.
- Rigas, F., Papadopoulou, K., Dritsa, V., Doulia, D. (2007). Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *J. Hazard. Mater.* 140 (1-2): 325–332.
- Rizner, T.L., Wheeler, M.H. (2003). Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). *Can. J. Microbiol.* 49: 110–119.

- Roberts, L.M. (2004).** Australian *Ganoderma*: Identification, Growth and Antibacterial Properties. Ph.D. Thesis, Swinburne University of Technology, Australia.
- Rochais, C., Lisowski, V., Dallemagne, P., Rault, S. (2006).** Synthesis and biological evaluation of novel pyrrolopyrrolizinones as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 8162–8175.
- Rodwell, V.W., Beach, M.J., Bischoff, K.M., Bochar, D.A., Darnay, B.G., Friesen, J.A., Gill, J.F., Hedl, M., Jordan-Starck, T., Kennelly, P.J., Kim, D.Y., Wang, Y. (2000).** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Methods Enzymol.* 324: 259-280.
- Rogalski, J., Szczodrak, J., Janusza, G. (2006).** Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresour. Technol.* 97: 469-476.
- Roger P. (2006).** Mushrooms. Pub. McMillan, ISBN 0-330-44237-6.
- Rosado, F. R., Germano, S., Carbonero, E. R., Gomes da Costa, S. M., Iacomini, M., Kemmelmeier, C. (2003).** Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr) Kummer. *J. Basic Microbiol.* 43: 230-237.
- Rösecke, J., König, W.A. (2000).** Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, 54: 603-610.
- Rösecke, J., Pietsch, M., König, W.A. (2000).** Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* 54(8): 747-750.
- Rouhier, P.M., Bruneteau, M., Nichel, G. (1995).** Structure analysis on β -glucans from *Phytophthora capsici*. *J. Carbohydr. Chem.* 14: 247-254
- Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., Islam, S.S. (2005).** Chemical analysis of a new (1-3)-, (1-6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carboh. Res.* 340: 2533–2539.
- Rovenský, J., Stančíkova, M., Švík, K., Bauerová K., Jurčovičová, J. (2009).** The effects of β -glucan isolated from *Pleurotus ostreatus* on methotrexate treatment in rats with adjuvant arthritis. *Reumatol. Inter.* Epub ahead of print.
- Royse, D.J. (2005).** Foreword to the Fifth international conference on mushroom biology and mushroom products. *Acta Edulis Fungi* (Suppl.). 12: 1–2.
- Rudawska, M.L., Kieliszewska-Rokicka, B. (1997).** Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. *New Phytologist* 137(3): 509-517.
- Sabir, S.M., Hayat, I., Hussain, I., Gardezi, S.R.A. (2003).** Proximate Analysis of Mushrooms of Asad Kashmir. *Pak. J. Plant. Pathol.* 2(2): 97-101.
- Salminen, J.G., Streeter, S.O. (1990).** Periplasmic metabolism of glutamate and aspartate by intact *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1035: 257–265.
- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M., Zambonelli, A., Buffalini, M., Casadei, L., Vallorani, L., Stocchi, V. (2009).** Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma* from Central Italy. *Food Chem.* 116(1): 143-151.
- Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-García, M.J., Esqueda, M. (2002).** Biodegradation of Viticulture Wastes by *Pleurotus*: A Source of Microbial and Human Food and Its Potential Use in Animal Feeding. *J. Agric. Food Chem.* 50(9): 2537–2542.
- Sano, M., Yoshino, K., Matsuzawa, T., Ikekawa, T. (2002).** Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. *Int. J. Med. Mush.* 4: 37–41.
- Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., Baghel, R.K., Prasad, G.B.K.S., Bisen, P.S. (2009).** *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological Macrofungus. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10: 717-742.
- Sarang, I., Ghosh, D., Bhutia, S.K., Mallick, S.K., Maiti, T.K. (2006).** Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans, *Int. Immunopharmacol.* 6: 1287–1297.

- Sato, K., Aoki, M., Takagi, J., Zimmermann, K., Noyori, R. (1999). A practical Method for Alcohol Oxidation with Aqueous Hydrogen Peroxide under Organic Solvent-and Halide-Free Conditions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 72: 2287-2306.
- Sato, M., Tai, T., Nunoura, Y., Yajima, Y., Kawashima, S., Tanaka, K. (2002). Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 81–86.
- Schuler, M.L., Kargi, F. (2005). Μηχανική βιοδιεργασιών: Βασικές Έννοιες. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθηνά.
- Seckbach, J., Ikan, R., Ringelberg, D., White, D. (1993). Sterols and phylogeny of the acidophilic hot springs algae *Cyanidium caldarium* and *Galdieria sulphuraria*. *Phytochemistry* 34: 1345-1349.
- Selvakumar, P., Rajasekar, Z.S., Periasamy, Z.K., Raaman, Z.N. (2008). Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 2125-2131.
- Seo, S.Y., V.K. Sharma, Sharma, N. (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospect. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2837-2853.
- Sepčić, K., Berne, S., Rebolj, K., Batista, U., Plemenitaš, A., Šentjurc, M., Maček, P. (2004). Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Lett.* 575: 81-85.
- Seto, S.W., Lam, T.Y., Tam, H.L., Au, A.L.S., Chan, S.W., Wu, J.H., Yu, P.H.F., Leung, G.P.H., Ngai, S.M., Yeung, J.H.K., Leung, P.S., Lee, S.M.Y., Kwan, Y.W. (2009). Novel hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* water-extract in obese/diabetic (+db/+db) mice. *Phytomedicine* 16(5): 426-436.
- Shan, R., Stadler, M., Anke, H., Sterner, O. (1997). Naphthalenone and Phthalide Metabolites from *Lachnum papyraceum*. *J. Nat. Prod.* 60(8): 804-805.
- Sharon, N., Lis, H. (1989). Lectins. Chapman and Hall, New York. p. 20–25.
- Sherief, A.A., Abd, ElNaby, M.A., Mansour, F.A., ElSawah, M.A. (1993). On the Egyptian mushrooms. *Pakistan J. Biochem.* 26: 69–75.
- Shi, Y., Sun, J., He, H., Guo, H., Zhang, S. (2008). Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against D-galactosamine-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 117 (3): 415–419.
- Shi, Y.L., James, A.E., Benzie, I.F., Buswell, J.A. (2002). Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 22 (2): 103–111.
- Shih, I.L., Pan, K., Hsieh, C. (2006). Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* 41: 1129–1135.
- Shim, S.H., Ryu, J., Kim, J.S., Kang, S.S., Xu, Y., Jung, S.H., Lee, Y.S., Lee, S., Shin, K.H. (2004). New lanostane-Type Triterpenoids from *Ganoderma applanatum*. *J. Nat. Prod.* 67: 1110-1113.
- Shin, K.S., Kwon, N.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Kwon, G.S., Yu, J.H. (2009). Differential Roles of the ChiB Chitinase in Autolysis and Cell Death of *Aspergillus nidulans*. *Eycar. Cell.* 8(5): 738-749.
- Shlyakhovenko, V., Kosak, V., Olishevsky, S. (2006). Application of DNA from mushroom *Pleurotus ostreatus* for cancer biotherapy: A pilot study. *Experim. Oncol.* 28: 132–135.
- Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Jalilzadeh, A., Sanaei, H.R. (1999). Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. *Resour. Conserv. Recy.* 27: 125-138.
- Shu, C.H., Wen, B.J. (2003). Enhanced shear protection and increased production of an anti-tumor polysaccharide by *Agaricus blazei* in xanthan-supplemented cultures. *Biotechnol. Lett.* 25: 873–876.
- Shushni, M.A.M., Mentel, R., Lindequist, U., Jansen, R. (2009). Balticol A-F, new naphthalenone derivatives with antiviral activity from an Ascomycetous Fungus. *Chem. Biodivers.* 6(2): 127-137.

- Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S. (1998).** Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Res. Int.* 31: 467-473.
- Sinanoglou, V.J., Strati, I.F., Miniadis-Meimaroglou, S. (2011).** Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food Chem.* 124: 971-977.
- Singh, B.D. (1998).** Biotechnology. Kalyani Publishers, New Delhi.
- Singh, M.P. (2009).** Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *J. Microbiol. Methods.* 77: 102-108.
- Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim K.H., Song, C.H., Yun, J.W. (2001).** Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 88-92.
- Sivakumar, R., Vetrichelvan, T., Rajendran, N.N., Devi, M.I., Sundaramoorthi, K., Shankar, A., Shanmugam, S. (2006).** Antibacterial activity of mushroom *Osmoporus odoratus*. *Indian J. Pharm. Sci.* 68: 523-524.
- Sliva, D. (2006).** *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leukemia Res.* 30: 767-768.
- Sloan, A.E. (2001).** Dietary fiber moves back into manstream. *Food Technol.* 55 (1): 18.
- Smania, E.F.A., Delle Monache, F., Smania, Jr. A., Yunes, R.A., Cuneo, R.S. (2003).** Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. *Fitoterapia* 74: 375-377.
- Smania, E.F.A., Monache, F.D., Yunes, R.A., Paulert, R., Smania, A.Jr. (2007).** Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. *Braz. J. Pharmacogn.* 17(1): 14-16.
- Smania, Jr. A., Delle Monache, F., Smania, E.F.A., Cuneo, R.S. (1999).** Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) fruit body. *Int. J. Med. Mushr.* 1: 325-330.
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Carbonero, E.R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Santos, A.R.S., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. (2008a).** Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1->3), (1->6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *Eur. J. Pharmacol.* 597: 86-91.
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Carbonero, E.R., Marcon, R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Santos, A.R., Torri, G., Gorin, P.A., Iacomini, M. (2008b).** A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect. *Phytochemistry* 69 (15): 2731-2736.
- Smolinske, S.C. (1992).** *Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients.* pp. 247-248. ISBN 084933585X, 9780849335853.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., Misaki, A. (1985).** Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing fermentation of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 2641-2653.
- Song, C.H., Jeon, Y.J., Ra, K.S., Kim, H.I. (1998).** Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnol. Lett.* 20:741-744.
- Song, M. Kim, N., Lee, S., Hwang, S. (2007).** Use of Whey Permeate for Cultivating *Ganoderma lucidum* mycelia. *J. Dair. Sci.* 90(5): 2141-2146.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., Hadar, Y. (2007).** Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 41(1-2): 57-61.
- Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A. (2005).** Assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43(7): 985-1015.
- Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.J.P., Hendrickx, P.M., Kerrigan, R.W. (2005).** Breeding mushroom: State of the art. *Acta EdulisFungi* (Suppl.). 12: 163-173.

- Southgate, A.T., Waldron, K., Johnson, I.T., Fenwich, G.R. (1990).** Dietary fibre: chemical and biological aspects. Royal Society of Chemistry. Special Publication. No. 83.
- Soylak, M., Saraçolu, S., Tüzen, M., Mendil, D. (2005).** Determination of trace metals in mushroom samples from Kayseri, Turkey. *Food Chem.* 92: 649-652.
- Stahl, E. 1969.** Thin-Layer Chromatography. Berlin-Heidelberg- N.York. p. 904.
- Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P, Nevo, E., Vukojević (2006).** Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 65-73.
- Stamets, P. (1993).** *Ganoderma lucidum* (Wm, Curtis: Fries) Karsten. In: Growing and Medicinal Mushrooms. Stamets, P. (Ed). Ten Speed Press, Berkeley, CA. pp. 355-369.
- Stamets, P. (2005a).** Mycelium Running: How Mushroom Can Help Save the World. Ten Speed Press. Berkeley and Toronto. p. 574.
- Stamets, P. (2005b).** Notes on Nutritional Properties of Culinary-Medicinal Mushrooms. *Int. J. Med. Mushr.* 7: 103-110.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (1995).** Principles of Fermentation Technology, 2nd edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- Stancher, B., Procida, G., Calabrese, M. (1992).** Characteristics of the most common mushrooms cultivated in Italy. IV. Lipids: Determination of the content of free and bound fatty acids. *Industrie Alimentari* 31: 744-750.
- Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., Sliva, D. (2005).** *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (1): 46–52.
- Stefanidou, M., Alevisopoulos, G., Chatziioannou, A., Kouteslinis, A. (2003).** Assessing food additive toxicity using a cell model. *Vet. Hum. Toxicol.* 45: 103.
- Stijve T., de A Amazonas, M.A., Gille, V. (2002).** Flavour and taste components of *Agarius blazei* Murrill ss. Heinem.—a new gourmet and medicinal mushroom. *Dtsch Lebensm-Rundsch.* 98: 448–453.
- Stipanovic, R.D., Bell, A.A. (1977).** Pentakide metabolites of *Verticillium dahliae*. II. Accumulation of naphthol derivatives by the aberrant-melanin mutant BRM-2. *Mycologia*, 69(1): 164-172.
- Strigina, L.I., Elkin, Y.N., Elyakov, G.B. (1971).** Steroids metabolites of *Ganoderma applanatum* basidiomycete. *Phytochemistry* 10:2361-2365.
- Subbiah, M.T.R., Abplanalp, W. (2003).** Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73: 19-23.
- Sugijonto, N.E., Diesel, A., Ebel, R., Indrayanto, G., Zaini, N.C. (2009).** Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecythophora sp.* isolated from *Alyxia reinwardtii*. *Nat. Prod. Commun.* 4: 1485-1488.
- Sukarno N. (2004).** Development of *Ganoderma lucidum* on soft and hard wood logs and determination of organic germanium and ganoderic acid content of the fruiting body produced [online]. MushWorld – Cultivation, available at http://www.mushworld.com/sub_en.html
- Survase, S.A., Saudagar, P.S., Singhal, R.S. (2007).** Enhanced production of sclerotium by *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156 by use of metabolic precursors. *Bioresour. Technol.* 98(2): 410-415.
- Suutari, M. (1995).** Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). *Arch. Microbiol.* 164: 212–216
- Synytysya, A., Míčková, K., Jablonský, I., Sluková, M., Čopíková, J. (2008a).** Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements. *Czech. J. Food Sci.* 26: 441-446.

- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěvák, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. (2008b). Glucans from fruitbodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr. Polym.* 76: 548-556.
- Tagashi, S., Takahashi, N., Kubo, Y., Shigihara, A., Higashiyama, K., Watanabe, S., Fukui, T. (2000). Purification and identification of antioxidant substances in humanplacenta extracts. *J. Health Sci.* 46: 117-125.
- Takaku, T., Kimura, Y., and Okuda, H. (2001). Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. *J.Nutr.* 131: 1409 - 1413.
- Takamura, K., Hoshino, H., Sugahara, T., Amano, H. (1991). Determination of vitamin D₂ in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 545:201-206.
- Tan, J., Bednarek, P., Liu, J., Schneider, B., Svatoš, A., Hahlbrock, K. (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Aravidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* 65: 691-699.
- Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., Tsunoo, H. (1989). Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *J. Biol. Chem.* 264: 16372-17377.
- Tang, W., Liu, J.W., Zhao, W.M., Wei, D.Z., Zhong, J.J. (2006). Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sci.* 80: 205-211.
- Tang, Y.J., Zhang, W., Zhong, J.J. (2009). Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biores. Technol.* 100(5): 1852-1859.
- Tang, Y.J., Zhong, J.J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enz. Microb. Technol.* 31:20-28.
- Tang, Y.J., Zhong, J.J. (2003). Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 478-484.
- Tang, Y.Z., Zhu, L.L., Li, D.S., Mi, Z.Y., Li, H.M. (2008). Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and Tuber polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese Truffle *Tuber sinense*. *Process Biochem.* 43 (5): 576-586.
- Tang, Y.Z., Zhu, L.W., Li, H.M., Li, D.S. (2007). Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors-Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (3): 221-229.
- Tao, Y., Zhang, Y., Zhang, L. (2009). Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. *Inter. J. Biol. Macromol.* 45 (2): 109-115.
- Tao, Y.Z., Zhang, L., Cheung, P.C.K. (2006). Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 341(13): 2261-2269.
- Tasaka, K., Akagi, M., Miyoshi, K., Mio, M., Makino, T. (1988). Antiallergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*. (I). Inhibitory effect of oleic acid on histamine release. *Agents Actions* 23:153-156.
- Terés, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J., Escribá, P. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105 (37): 13811.
- Thakur, A., Rana, M., Lakhanpal, T.N., Ahmad, A., Khan, M.I. (2007). Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770 (9): 1404-1412.

- Thompson, J.E., Basarab, G.S., Andersson, A., Lindqvist, Y., Jordan, D.B. (1997).** Trihydroxynaphthalene reductase from *Magnaporthe grisea*: realization of an active center inhibitor and elucidation of the kinetic mechanism. *Biochemistry* 36 (7): 1852–1860.
- Tiefel, P., Berger, R.G. (1993).** In: *Progress in Flavour Precursor Studies*. Schreier, P. and Winterhalter, P., (Eds.), Allured Carol Stream, Berlin, Germany, p. 439,
- Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N. (2000).** Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.* 80: 1024-1032.
- Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., Sauleau, P., Beziniv, C., Boustie, J. (2004).** Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. *Pharmazie* 59(4): 290-293.
- Tomita, K., Murayama, T., Nakamura, T. (1984).** Effects of auxin and gibberellin on elongation of young hyphae in *Neurospora crassa*. *Plant Cell Physiol.* 25: 355–358.
- Tomoda, M., Gonda, R., Kasahara, Y., Hikino, H. (1986).** Glycan structures of ganoderans b and c, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry* 25: 2817–2820.
- Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D., Sun, X. (2009).** Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour. Technol.* 100 (4): 1682-1686.
- Toth, J.O., Luu, B., Beck, J.P., Ourisson, G. (1983b).** Chemistry and biochemistry of Oriental drugs. Part IX. Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae): structures of ganoderic acids U-Z. *J. Chem. Res. Synop.* 12: 299.
- Toth, J.O., Luu, B., Ourisson, G. (1983a).** Ganoderic acid T and Z: cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae). *Tetrahedron Lett.* 24:1081-1084.
- Trinder, P. (1969).** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24-27.
- Tsai, S.Y., Huang, S.J., Lo, S.H., Wu, T.P., Lian, P.Y., Mau, J.L. (2009).** Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chem.* 113: 578–584.
- Tsuchinari, M., Shimanuki, K., Hiramatsu, F., Murayama, T., Koseki, T., Shiono, Y. (2007).** Fusapyridons A and B, Novel Pyridone Alkaloids from an Endophytic Fungus, *Fusarium* sp. YG-45. *Z. Naturforschung* 62b:1203-1207.
- Turkekul, I., Elmastas, M., Tüzen, M. (2004).** Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chem.* 84: 389-392.
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murrill. *Food Chem.* 101: 267–273.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno, T., Tanaka, M., Shinkai, K., Arakawa, M. (1981).** Antitumor activity of water-soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric. Biol. Chem.* 45: 323-326.
- Vahidi, H., Kobarfard, F., Namjoyan, F. (2004).** Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptcephala*. *African J. Biotechnol.* 3 (11): 606-609.
- Vaidyanathan, S., Macaloney, G., Vaughan, J., McNeil, B., Harvey, L. M. (1999).** Monitoring of submerged bioprocesses. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19(4): 277–316.
- Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Sá Morais, J., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I.C.F.R. (2010).** Phenolic Profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *Food Sci. Technol.* 44(1): 343-346.
- Venkateshwarlu, G., Chandravada, M.V., Pandey, M., Tewari, R.P., Selvaraj, Y. (2000).** Volatile flavour compounds from oyster mushroom (*Pleurotus florida*) in submerged culture. *Flav. Fragn. J.* 15(5): 320 – 322.

- Venkateshwarlu, G., Chandravadana, Tewari, R.P. (1999). Volatile flavour components of some edible mushrooms (Basidiomycetes). *Flav. Fragn. J.* 14(3): 191-194.
- Vetter, J. (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chem.* 102: 6-9.
- Vij, N. (2010). Linoleic acid supplement in cystic fibrosis- Friend or Foe. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 299(5): L597-8
- Villas-Bôas, S.G., Esposito, E., Mitchell, D.A. (2002). Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98: 1–12.
- Voet, D., Voet, J.G. (2004). Biochemistry, 3rd ed. Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
- Volkman J. K. (2003). Sterols in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 495-506.
- Vongsangnak, W., Salazar, M., Hansen, K., Nielsen, J. (2009). Genome-wide analysis of maltose utilization and regulation in aspergilli, *Microbiology* 155: 3893–3902.
- Wagner, R., Mitchell, D. A., Sasaki, G. L., Lopes de Almeida Amazonas, M.A., Berovic, M. (2003). Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid, and polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* 41(4): 371–382.
- Wagner, R., Mitchell, D. A., Sasaki, G. L., Lopes de Almeida Amazonas, M.A. (2004). Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharides. *J. Biotechnol.* 114: 153-164.
- Walton, N.J., Mayer, M.J., Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry* 63: 505-515.
- Wang X.M., Yang M., Guana, S.H., Liu, R.X., Xia J.M., Bi K.S., Guoa, D.A. (2006). Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 41: 838–844.
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour. Technol.* 78: 293–300.
- Wang, H., Gao, J., Ng, T.B. (2000). A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 810–816.
- Wang, H., Ng, T.B. (2006). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27 (1): 27–30.
- Wang, H.X., Ng, T.B. (2001). Purification and characterization of a potent homodimeric guanine-specific ribonuclease from fresh mushroom (*Pleurotus tuber-regium*) sclerotia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (5): 483-490.
- Wang, H.X., Ng, T.B. (2003). Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Prot. Expres. Purific.* 29 (2): 156-160.
- Wang, M., Kikuzaki, H., Zhu, Ho, C.T. (2000). Isolation and structural elucidation of two new glycosides from Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48 (2): 235-238.
- Wang, X., Zhao, X., Li, D., Lou, Y.Q., Lin, Z.B., Zhang, G.L. (2007). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on CYP2E1, CYP1A2 and CYP3A activities in BCG-immune hepatic injury in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (9): 1702–1706.
- Wang, Y., McNeil, B. (1995). pH effects on exopolysaccharide and oxalic acid production in cultures of *Sclerotium glaucum*. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 124–130.
- Wang, Y., Yang, S.P., Wu, Y., Yue, J.M. (2004). Alkaloids from the fungus *Lactarius subplinthogalus*. *Nat. Prod. Res.* 18 (2): 159-162.
- Wang, Y.Y., Khoo, K.H., Chen, S.T., Lin, C.C., Wong, C.H., Lin, C.H. (2002). Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and

proteomic analyses of a fucose-glycoprotein fraction responsible for activities. *Biorg. Medic. Chem.* 10 (4): 1057-1062.

Wang, Z. J., Li, G. M., Nie, B. M., Lu, Y., Yin M. (2006). Neuroprotective effect of the stearic acid against oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Chem.-Biol. Interact.* 160(1): 80-87.

Warth, A.D. (1991). Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects on glycolytic metabolite levels, energy production, and intracellular pH. *Appl Environ Microbiol.* 57(12): 3410-3414.

Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 258-274.

Wasser, S.P., Elisashvili, V.I., Tan, K.K. (2003). Effects of carbon and nitrogen sources in the medium on *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. (Heterobasidiomycetes) growth and polysaccharide production. *Int. J. Med. Mushroom.* 5: 49–56.

Wasser, S.P., Nevo, E., Sokolov, D., Reshetnikov, S., Timot-Tismenetsky, M. (2000). Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. *Int. J. Med. Mushrooms* 2: 1–19.

Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *Int. J. Med. Mushrooms*:1: 31–62.

White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 1-14.

Wilson, C.O., Gisvold, O., Block, H.J. (2004). *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical.* Lippincott Williams & Wilkins. pp. 234. ISBN 0781734819.

Wong, J.Y., Chye, F.Y. (2009). Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *J. Food Comp. Anal.* 22 (4): 267-277.

Wong, K., Cheung, P.C.K., Wu, J. (2003). Biochemical and microstructural characteristics of insoluble and soluble dietary fiber prepared from mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*, *Polyporus rhinoceros*, and *Wolfiporia cocos*. *J. Agric. Food. Chem.* 51(24): 7197-7202.

Wong, S.M., Wong, K.K., Chiu, L.C.M., Cheung, P.C.K. (2007). Non--starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium* inhibited the growth of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction. *Carbohydr. Polym.* 68:206–217.

Worgan, J. T. (1968). Culture of the higher fungi. *Prog. Ind. Microbiol.* 8: 74–139.

Wu, C.Y., Liang, Z.C., Lu, C.P., Wu, S.H. (2008). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production and Carbohydrate Composition of Exopolysaccharide by Submerged Culture of *Pleurotus citrinopileatus*. *J. Food Drug Anal.* 16(2): 61-67.

Wu, J.Z., Cheung, P.C.K., Wong, K.H., Huang, N.L. (2003). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer—Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chem.* 81: 389-393.

Wu, J.Z., Cheung, P.C.K., Wong, K.H., Huang, N.L. (2004). Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2. Effect of carbon to nitrogen ration of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chem.* 85: 101–105.

Wu, P.L., Lin, F.W., Wu, T.S., Kuoh, C.S., Lee, K.H., Lee, S.J. (2004). Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 52(3): 345-349.

Wu, Y., Wang, D. (2009). A new class of natural glycopeptides with sugar moiety-dependent antioxidant activities derived from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J. Prot. Res.* 8 (2): 436–442.

Wuilloud, R.G., Kannamkumarath, S.S., Caruso, J.A. (2004). Speciation of essential and toxic elements in edible mushrooms: Size-exclusion chromatography separation with on-line-UV-inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Appl. Organomet. Chem.* 18: 156-165.

- Wymelenberg, A.V., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., Grigoriev, I., Shapiro, H., et al. (2006). Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genet. Biol.* 43: 343–356.
- Xia, L., Chu, K.T., Ng, T.B. (2005). A low-molecular mass ribonuclease from the brown oyster mushroom. *J. Pept. Res.* 66: 1–8.
- Xiao, J.H., Chen, D.X., Wan, W.H., Hu, X.J., Qi, Y., Liang, Z.Q. (2006). Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. *Process Biochem.* 41: 1887–1893.
- Xu, C.P., Yun, J.W. (2003). Optimization of submerged-culture conditions for mycelial growth and exo-polymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 193–199.
- Xu, J., Liu, W., Yao, W., Pang, X., Yin, D., Gao, X. (2009). Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances antioxidant activities in vitro. *Carbohydr. Polym.* 78 (2): 227-234.
- Xu, J.W., Zhao, W., Zhong, J.J. (2010). Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2): 457-66
- Xu, P., Ding, Z.Y., Qian, Z., Zhao, C.X., Zhang, K.C. (2008). Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enz. Microb. Technol.* 42(4): 325-331.
- Yamashita, N., Sakata, K., Ina, H, Ina, K. (1989). Isolation of Nicotinamide from *Mallotus* Leaves as an attaching Repellent against the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Agric. Biol. Chem.* 53(12): 3351-3352.
- Yang, B.K., Ha, J.Y., Jeong, S.C., Das, S., Yun, J.W., Lee, Y. S., Choi, J.W. Song, C.H. (2000). Production of exo-polymers by submerged mycelial culture of *Cordyceps militaris* and its hypolipidemic effect. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 10: 784-788.
- Yang, B.K., Jung, Y.S., Song, C.H. (2007). Hypoglycemic effects of *Ganoderma applanatum* and *Collybia confluens* exo-polymers in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytoth. Res.* 21 (11): 1066–1069.
- Yang, F.C., Ke, Y.F., Kuo, S.S. (2000). Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 27(3): 295–301.
- Yang, F.C., Liou, C.B. (1998a). Effects of cultivating conditions on the mycelia growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. *Bioprocess Eng.* 19(3): 233–236.
- Yang, F.C., Liou, C.B. (1998b). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochem.* 33(5): 547–553.
- Yang, F.C., Yang, M.J., Cheng, S.H. (2009). A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 40(2): 148-154.
- Yang, H.I. (2005). Ganoderic acid produced from submerged culture of *Ganoderma lucidum* induces cell cycle arrest and cytotoxicity in human hepatoma cell line BELL 7402. *Biotechnol. Lett.* 27: 835-838.
- Yazawa, Y., Yokota, M., Sugiyama, K. (2000). Antitumor promoting effect of an active component of polyporus, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biol. Pharm. Bull.* 23: 1298- 1302.
- Ye, M., Liu, J.K., Lu, Z.X., Zhao, Y., Liu, S.F., Li, L.L., Tan, M., Weng, X.X., Li, W., Cao, Y. (2005). Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro. *FEBS Lett.* 579(16): 3437-3443.

- Ye, X.Y., Ng, T.B. (2002).** A novel and potent ribonuclease from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 857-861.
- Yilmaz, N., Solmaz, M., Türkekul, I., Elmastaş, M. (2006).** Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chem.* 99: 168–174.
- Yoita, Y., Yoshihara, Y., Kakuda, R., Machida, K., Kikuchi, M. (2002).** New sterols from edible mushrooms, *Pleurotus eryngii* and *Panellus serotinus*. *Chem. Pharm. Bull.* 50(4): 551-553.
- Yokokawa, H., Mitsuhashi, T. (1981).** The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry* 20: 1349-1351.
- Yoon, W.J., Kim, M.J., Moon, J.Y., Kang, H.J., Kim, G.O., Lee, N.H., Hyum, C.G. (2010).** Effect of palmitoleic acid on melanogenic protein expression in murine b16 melanoma. *J. Oleo Sci.* 59(6): 315-319.
- Young, S.N. (2007).** L-tyrosine to alleviate the effects of stress? *J. Psychiatry Neurosci.* 32(3): 224.
- Yu, J.G., Chen, R.Y., Yao, Z.X., Zhai, Y.F., Yang, S.L., Ma, J.L. (1990).** Studies on constituents of *Ganoderma capense* IV. The chemical structures of ganoine, ganodine and ganoderpurine. *Yao Xue Xue Bao* 25(8): 612-616. (Article in Chinese).
- Yuan, J.P., Jiang-Hai, W., Liu, X. (2007).** Distribution of free and esterified ergosterols in the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 159 – 165.
- Yue, J.M., Chen, S.N., Lin, Z.W., Sun, H.D. (2001).** Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry* 56: 801-806.
- Yuen, J.W., Gohel, M.D. (2005).** Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. *Nutr. Cancer.* 53(1): 11–17.
- Zaidman, B.Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S.P. (2005).** Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 453-468.
- Zervakis, G., Dimou, D., Balis, C. (1992).** First record of the natural occurrence in Europe of the basidiomycete *Pleurotus cystidiosus* on a new host. *Mycol. Res.* 96: 874-876.
- Zervakis, G.I. (2001).** Mycodiversity in Greece. *Boccone*, 13, 119–124. ISSN 1120- 4060.
- Zhan, Z.J., Wang, Y., Yang, S.P., Yue, J.M. (2003).** Steroids from the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Acta Botanica Sinica.* 45(6):753-756.
- Zhang G., Mills G.L., Nair M.G. (2002).** Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Grifola frodosa*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7581-7585.
- Zhang, A.L., Li, Y.L., Ma, Y.T., Gao, J.M., Jia, A.Q. (2009).** Phenolic monoterpenoids and steroids from the basidiomycete *Tricholoma imbricatum*. *Biochem. System. Ecol.* 37(6): 756-758.
- Zhang, G., Mills, G.L., Nair, M.G. (2003).** Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocyce aegerita*. *Phytomedicine* 10: 386-390.
- Zhang, G.L., Wang, Y.H., Ni, W., Teng, H.L., Lin, Z.B. (2002).** Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World. J. Gastroenterol.* 8: 728-733.
- Zhang, H.N., Lin, Z.B. (2004).** Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol. Sin.* 25 (2): 191–195.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Mayuzumi, H., Okamoto, H., Li, J. (1994).** Antitumor active protein-containing glycans from the Chinese mushroom songshan lingzhi, *Ganoderma tsugae* mycelium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(7): 1202-1205.
- Zhang, M., Cheung, P.C., Ooi, V.E., Zhang, L. (2004).** Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydr. Res.* 339: 2297–2301.

- Zhang, M., Cheung, P.C.K., Chiu, L.C.M., Wong, E.Y.L., Ooi, V.E.C. (2006). Cell-cycle arrest and apoptosis induction in human breast carcinoma MCF-7 cells by carboxymethylated [beta]-glucan from the mushroom sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydr. Polym.* 66: 455–462.
- Zhang, W.X., Zhong, J.J. (2010). Effect of oxygen concentration in gas phase on sporulation and individual ganoderic acids accumulation in liquid static culture of *Ganoderma lucidum*. *J. Biosci. Bioeng.* 109(1): 37–40.
- Zhang, Y., Adams, I. P., Ratlege, C. (2007). Malic Enzyme: the controlling activity for lipid production. Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology* 153: 2013–2025.
- Zhang, Y., Mills, G.L., Nair, M.G. (2002). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J. Agric. Food Chem.* 50 (26): 7581–7585.
- Zhang, Y.Y., Xu, K.P., Ren, D., Ge, S.R., Wang, Y.L., Wang, Y.Z. (2009). Synthesis and antibacterial activities of pleuromutilin derivatives. *Chinese Chem. Lett.* 20 (1): 29–31.
- Zhao, C., He, Y. (2003). Isolation, purification and structural characterization of active polysaccharides from the mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Zhong Yao Cai.* 25: 252–254.
- Zhao, H., Wang, J., Lu, Z. (2009). Optimization of process parameters of the *Pholiota squarrosa* extracellular polysaccharide by Box–Behnken statistical design. *Carbohydr. Polym.* 77 (3): 677–680.
- Zhao, H.B., Wang, S.Z., He, Q.H., Yuan, L., Chen, A.F., Lin, Z.B. (2005). *Ganoderma* total sterol (GS) and GS1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *Life Sci.* 76: 1027–1037.
- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Polym.* 80(3): 783–789.
- Zhou, Y., Hong-bo, S., Chen, D.Y. (2009). Effects of organic nitrogen and carbon sources on mycelial growth and polysaccharides production and their optimization in the submerged culture of *Grifola umbellata*, a Chinese medicinal herb. *Afr. J. Biotechnol.* 8 (20): 5208–5214.
- Zhu, L.W., Zhong, J.J., Tang, Y.J. (2010). Multi-fed batch culture integrated with three-stage light irradiation and multiple additions of copper ions for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Proc. Biochem.* 45 (12): 1904–1911.
- Zhu, X.L., Chen, A.F., Lin, Z.B. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 111: 219–226.
- Ziegenbein F.C., Hanssen, H.P., König W.A. (2006). Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. *Phytochemistry* 67: 202–211.
- Zjalic, S., Reverberi, M., Ricelli, A., Granito, V.M., Fanelli, C., Adele Fabbri, A. (2006). *Trametes versicolor*: A possible tool for aflatoxin control. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 243–249.
- Znidaršič, P., Pavko, A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technol. Biotechnol.* 39(3): 237–252.
- Zou, X. (2005). Optimization of nutritional factors for exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal mushroom *Oudemansiella radicata*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1267–1271.
- Ζερβάκης, Γ. (1992).** Γενετική και Ταξινομική Ανάλυση Μυκήτων του Γένους *Pleurotus*. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας Γ.Π.Α.
- Φιλιπούσης, Α. Ζερβάκης, Γ. (1998).** Παραγωγή και κατανάλωση εδώδιμων μανιταριών στην Ελλάδα και διεθνώς, ανάλυση της υφισταμένης κατάστασης και των προοπτικών για την ανάπτυξη της καλλιέργειας. *Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα* 9, 60–72.

