



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ι. Χήνου

ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΔΩΔΙΜΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΩΝ
Tuber, Amanita, Marasmius, Craterellus, Boletus, Macrolepiota
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΛΩΝΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ & ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΣΤΑΥΡΑΚΗ ΕΛΕΝΗ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Απομόνωση, ανάπτυξη, παραγωγή και έλεγχος βιοδραστικών προϊόντων» του Τμήματος της Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και λειτούργησαν ως καταλύτης για την πραγμάτωσή της.

Ευχαριστώ θερμά,

- Την Καθηγήτρια κα. Ιωάννα Χήνου, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική της ομάδα, την επιλογή του θέματος καθώς και τη συνεχή καθοδήγησή της, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης τη εργασίας,
- Τις/τους Καθ κα Ε. Σκαλτσά, κο. Γ. Καρίκα και κα Ι. Χήνου (Επιβλέπουσα), που ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής στην κατεύθυνση μεταπτυχιακών σπουδών «Απομόνωση, ανάπτυξη, παραγωγή και έλεγχος βιοδραστικών προϊόντων» του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, έκριναν την εργασία αυτή,
- Τη Δρα. κα Κ Γκραίκου, για τη βοήθεια που μου προσέφερε με προθυμία, σε κάθε στάδιο της εργασίας,
- Τον κ J. Widelski από τη Φαρμακευτική Σχολή του Medical University του Lublin της Πολωνίας για την παραχώρηση των δειγμάτων μανιταριών *Boletus edulis*, *Macroleipota procera var. procera*,
- Όλους τους συμφοιτητές μου, που συνεργάστηκα μαζί τους και ιδιαίτερα την Ελένη Αναστασοπούλου που μου συμπαραστάθηκε σε όλες τις στιγμές μου στο εργαστήριο,
- Τους γονείς μου, την γιαγιά μου και τον αδερφό μου για την κατανόηση και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου και της ζωής μου.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη δώδεκα εδώδιμων μανιταριών, 10 Ελληνικής προέλευσης και 2 Πολωνικής από τα γένη *Tuber*, *Amanita*, *Marasmius*, *Craterellus*, *Boletus* και *Macrolepiota*.

Το **θεωρητικό μέρος** αποτελείται από τρεις ενότητες.

Στη 1^η ενότητα το ενδιαφέρον εστιάζεται γενικά στους μύκητες, τη βοτανική τους κατάταξη, τη μορφολογία, τη διαβίωση, την ιστορία και εθνοφαρμακολογία τους. Στη 2^η ενότητα αναλύονται οι μύκητες του είδους *Tuber*, οι γνωστές τρούφες, και δίνονται στοιχεία σχετικά με την ιστορία, τη δομή, την αναπαραγωγή, τη συμβίωση με άλλους οργανισμούς/μικροοργανισμούς, την καλλιέργειά τους όπως επίσης και τις χημικές και φαρμακολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί διεθνώς. Στην 3^η ενότητα αναλύονται τα υπόλοιπα γένη/είδη μυκήτων που μελετήθηκαν στην εργασία.

Το **πειραματικό μέρος** ξεκινά με την μελέτη του αρωματικού προφίλ των 7 ελληνικών τρουφών με τη μέθοδο Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) με δύο ίνες διαφορετικής πολικότητας. Φυτοχημική ανάλυση (εκχύλισης, απομόνωσης και καθορισμού της δομής δευτερογενών μεταβολιτών) της τρούφας *Tuber aestivum*, όπου απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 4 πρωτογενείς μεταβολίτες: το **λινολεϊκό οξύ**, το **τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέως**, το **τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέως** και το σάκχαρο **μανιτόλη**, και δύο δευτερογενείς μεταβολίτες: το **υπεροξείδιο της εργοστερόλης** και η **μπρασσικαστερόλη**. Ακολούθησε η περιγραφή των αναλύσεων των πτητικών ενώσεων από έλαια με άρωμα τρούφας της Ελληνικής αγοράς. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη του αρωματικού προφίλ των πέντε μανιταριών ελληνικής και πολωνικής προέλευσης και έγινε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών όλων των δειγμάτων (εδώδιμα μανιτάρια) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, με πρότυπο το γαλλικό οξύ.

Abstract

The subject of the present Master thesis is the chemical study of twelve edible species of mushrooms of the genus *Tuber*, *Amanita*, *Marasmius*, *Craterellus*, *Boletus*, and *Macrolepiota*, from the forests of Greece and Poland.

The **General part** includes three units:

The 1st part is focused on fungi's, botanical taxonomy, morphology, living parameters, history and international ethnopharmacological data recorded. The 2nd part is referred to the fungi analyzed of genus *Tuber*, well known as truffles. In this part, the history of truffles, their structures, production, symbiosis with other organisms, cultivation methods and chemical / pharmacological studies from international literature are included. In the 3rd part all information on etymology, morphology, living parameters and chemical / pharmacological studies for the genera: *Amanita*, *Marasmius*, *Craterellus*, *Boletus* and *Macrolepiota*, are included.

In the **experimental part** the studies on the volatile organic compounds of the seven species of truffles from forests of northern Greece, by the Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) method, using two different polarity fibers is stated. Then, the chemical analysis of the ethanolic extract of *Tuber aestivum* truffle is described which afforded six metabolites: linoleic acid, trilinolein, triolein, ergosterol endoperoxide, brassicasterol and mannitol. The volatile profiles of five truffle flavored olive oils from the Greek market are studied and finally, the chemical analyses of the aromatic profile of five edible mushrooms species from the Greece and Poland were searched. For all studied mushrooms their Total Phenolic Content (TPC) by Folin-Ciocalteu method were measured with gallic acid equivalence.

Σκοπός της εργασίας

Σε συνέχεια προηγούμενων μελετών του χημικού προφίλ ελληνικών ειδών τρούφας, που έχουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον και δεν έχουν μέχρι σήμερα αποτελέσει αντικείμενο εμβριθούς χημικής μελέτης, κρίθηκε σκόπιμη η συλλογή πρώτης ύλης και χημική ανάλυση 7 ελληνικών τρούφων, που μελετώνται για πρώτη φορά (*Tuber aestivum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. brumale*, *T. uncinatum*) και άλλων εδώδιμων ελληνικών μανιταριών (*Amanita caesarea*, *Marasmius oreades*, *Craterellus cornucopioides*). Τα είδη Ελληνικής προέλευσης *M. oreades* και *C. cornucopioides* δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα σε σχέση με τα πτητικά τους συστατικά, ενώ το είδος *A. caesarea* έχει μελετηθεί προηγούμενα, αλλά με διαφορετικά μέσα ανάλυσης.

Στα πλαίσια της συνεργασίας της επιστημονικής ομάδας της καθ. Ι. Χήνου με το Εργ. Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου του Lublin Πολωνίας, 2 ακόμη εδώδιμα είδη μυκήτων πολωνικής προέλευσης αναλύθηκαν (*Boletus edulis* και *Macrolepiota procera*) όπου και τα δύο μελετώνται για πρώτη φορά ως προς το χημικό πτητικών τους συστατικών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
Σκοπός της εργασίας.....	9

Θεωρητικό μέρος

1. Μύκητες

<u>1.1 Δρογοετυμολογία.....</u>	16
<u>1.2 Κατάταξη μυκήτων.....</u>	16
<u>1.3 Φύλλα μυκήτων.....</u>	16
<u>1.4 Μορφολογία μυκήτων.....</u>	17
<u>1.5 Δρογοϊστορία μυκήτων.....</u>	18
<u>1.6 Διαβίωση μυκήτων.....</u>	19
<u>1.7 Οι μύκητες στην Εθνοφαρμακολογία.....</u>	19
<u>1.8 Διατροφική αξία των μανιταριών.....</u>	20

2. Η τρούφα

<u>2.1 Δρογοετυμολογία.....</u>	23
<u>2.2 Δρογοϊστορία της τρούφας.....</u>	23
<u>2.3 Δομή, αναπαραγωγή και συμβίωση.....</u>	25
<u>2.4 Δρογοβοτανική.....</u>	27
<u>2.5 Είδη τρούφας</u>	
2.5.1 <i>Tuber aestivum</i>	30
2.5.2 <i>Tuber uncinatum</i>	31
2.5.3 <i>Tuber magnatum</i>	32
2.5.4 <i>Tuber borchii</i>	33
2.5.5 <i>Tuber melanosporum</i>	34
2.5.6 <i>Tuber brumale</i>	35
2.5.7 <i>Tuber mesentericum</i>	36
<u>2.6 Χαρακτηριστικά καλλιέργειας της τρούφας.....</u>	37
<u>2.7 Συντήρηση, διαδικασία, ψύξη.....</u>	38
<u>2.8 Οικονομικά στοιχεία.....</u>	38
<u>2.9 Έλαια με άρωμα τρούφας.....</u>	39
<u>2.10 Χημική σύσταση.....</u>	40
<u>2.11 Βιολογικές δράσεις.....</u>	43

3. Μανιτάρια ελληνικής και πολωνικής προέλευσης

<u>3.1 Μανιτάρια ελληνικής προέλευσης.....</u>	45
3.1.1 <i>Amanita caesarea</i>	45
3.1.2 <i>Marasmius oreades</i>	47
3.1.3 <i>Craterellus cornucopioides</i>	48
<u>3.2 Μανιτάρια πολωνικής προέλευσης.....</u>	50
3.2.1 <i>Boletus edulis</i>	50

3.2.2 <i>Macrolepiota procera</i> var. <i>procera</i>	52
3.3 Μελέτες σε μανιτάρια στην Ελλάδα.....	54

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Μελετηθείσα δρόγη.....	60
4.2 Όργανα ανίχνευσης και προσδιορισμού δομής των φυσικών προϊόντων.....	61

5. Οργανόγραμμα της ανάλυσης των ειδών τρούφας

5.1 Ανάλυση αρωματικού προφίλ δειγμάτων τρούφας με τη μέθοδο HS-SPME	65
5.1.1 <i>Tuber aestivum</i>	65
5.1.2 <i>Tuber melanosporum</i>	67
5.1.3 <i>Tuber mesentericum</i>	70
5.1.4 <i>Tuber magnatum</i>	72
5.1.5 <i>Tuber borchii</i>	73
5.1.6 <i>Tuber brumale</i>	75
5.1.7 <i>Tuber uncinatum</i>	76
5.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών σε Αιθανολικά εκχυλίσματα τρούφας.....	78
5.3 Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Απόδοσης (MPLC) στην τρούφα <i>Tuber aestivum</i>	80
5.4 Ανάλυση δειγμάτων ελληνικών ελαίων με άρωμα τρούφας με τη μέθοδο HS-SPME.....	91

6. Ανάλυση δειγμάτων μανιταριών ελληνικής και πολωνικής προέλευσης

6.1 Ανάλυση δειγμάτων μανιταριών ελληνικής και πολωνικής προέλευσης με τη μέθοδο HS- SPME	
6.1.A Μανιτάρια ελληνικής προέλευσης.....	97
6.1.A1 <i>Amanita caesarea</i>	97
6.1.A2 <i>Marasmius oreades</i>	98
6.1.A3 <i>Craterellus cronicopioides</i>	99
6.1.B Μανιτάρια πολωνικής προέλευσης.....	100
6.1.B1 <i>Boletus edulis</i>	100
6.1.B2 <i>Macrolepiota procera</i>	102
6.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών σε υδατικά εκχυλίσματα μυκήτων ελληνικής και πολωνικής προέλευσης.....	104

Συμπεράσματα μελέτης.....	105
Βιβλιογραφία.....	108

Θεωρητικό Μέρος

1. Μύκητες

1.1 Δρογοετυμολογία

Η ονομασία του οργανισμού, προέρχεται από την αρχαιοελληνική λέξη «μύκης» (Κουτσογιάννης et al. 2015). Η λέξη “μανιτάρι” είναι παραφθορά της λέξης “αμανίτης” που χαρακτηρίζει τα είδη του πολύ σημαντικού γένους *Amanita* και κατ’ επέκταση είδη με σαρκώδεις καρποφορίες.

1.2 Κατάταξη μυκήτων

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων μαζί με τα Μονήρη, τα Πρωτίστα, τα Φυτά και τα Ζώα. Αρχικά οι μύκητες υπάγονταν στο βασίλειο των Φυτών, ένα από τα τρία βασίλεια, μαζί με το βασίλειο των Ζώων και των Πρωτίστων, ενώ το 1969 αναδείχθηκαν ως ξεχωριστό αυτόνομο βασίλειο (Whittaker et al. 1969).

Οι μύκητες είναι το δεύτερο είδος σε πλήθος στον πλανήτη μετά τα έντομα. Τα καταγεγραμμένα σήμερα είδη ανέρχονται σε 97.330 (Kirk et al. 2001), αλλά εκτιμάται ότι αυτός ο αριθμός δεν αντιπροσωπεύει παρά το 5% περίπου των υπάρχοντων ειδών. Από τα είδη που έχουν περιγραφεί έως τώρα, περί τα 150 είναι δηλητηριώδη για τον άνθρωπο και τα ζώα.

1.3 Φύλα μυκήτων

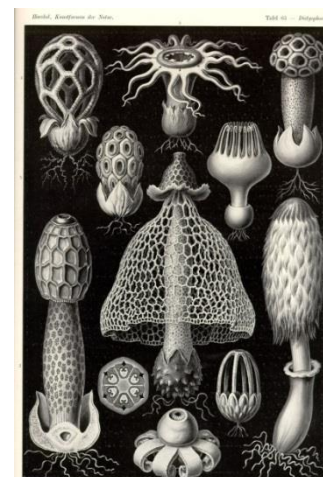
Το βασίλειο των μυκήτων χωρίζεται σε τρία φύλλα: τους **Ασκομύκητες**, τους **Βασιδιομύκητες** και τους **Ζυγομύκητες**.

Ασκομύκητες ονομάζονται οι μύκητες των οποίων τα σπόρια παράγονται μέσα σε υποσφαιρικούς, ωμόρφους ή μακρόστενους σάκους (ασκούς). Οι **ασκομύκητες** είναι το πολυπληθέστερο φύλο των μυκήτων με περίπου 30.000 είδη, ενώ νέα προστίθενται στον κατάλογο κάθε χρόνο. Κάποιοι από τους αντιπροσώπους του φύλου έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, γιατί χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές ζυμώσεις (ψωμιού, μπύρας, κρασιού), ενώ κάποιοι άλλοι αποτελούν εκλεκτά εδέσματα (λ.χ. τρούφες). Αναπαράγονται εγγενώς και η συγχώνευση γενετικά διαφορετικών νημάτων γίνεται μέσω ειδικών δομών που αναπτύσσονται πάνω στα νημάτια, τα ασκογόνια (θηλυκά γαμεταγγεία) και τα ανθηρίδια (αρσενικά γαμεταγγεία). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα επτά είδη ασκομυκήτων τρούφας του γένους *Tuber*.



Εικόνα 1 Ασκομύκητες
(Haeckel et al., 1900)

Βασιδιομύκητες είναι η κλάση των μυκήτων που τα σπόρια τους παράγονται επάνω σε μικροσκοπικές ροπαλόμορφες βάσεις (βασίδια). Υπάρχουν περίπου 16.000 είδη **βασιδιομυκήτων** και είναι το πιο μελετημένο φύλο του βασιλείου. Στους βασιδιομύκητες ανήκουν σχεδόν όλα τα εδώδιμα μανιτάρια αλλά και σημαντικά παράσιτα των φυτών. Οι βασιδιομύκητες αναπαράγονται εγγενώς και η αναπαραγωγική δομή τους είναι τα βασιδιοσπόρια. Δύο γενετικά διαφορετικά νημάτια του μυκηλίου συγχωνεύουν το περιεχόμενο δύο κυττάρων. Από το ετεροκαρυωτικό μυκήλιο αναπτύσσεται το βασιδιοκάρπιο, που δεν είναι άλλο από το κοινό μανιτάρι. Ένα βασιδιοκάρπιο φέρει πάρα πολλές πτυχές, όπου βρίσκονται διατεταγμένα τα βασιδιοσπόρια. Στους βασιδιομύκητες συγκαταλέγονται τα περισσότερα γνωστά είδη μανιταριών, όπως τα τυπικά ελασματοφόρα με σχήμα ομπρέλας, οι σωληνοφόροι βωλίτες και πολύποροι, οι χωνιόμορφοι κανθαρίσκοι κ.α. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν πέντε είδη βασιδιομυκήτων από τα γένη *Amanita*, *Marasmius*, *Craterellus*, *Boletus* και *Macrolepiota*.



Εικόνα 2 Βασιδιομύκητες
(Haeckel et al., 1900)

Ζυγομύκητες ονομάζονται οι μύκητες που ζουν στο έδαφος ή πάνω σε φυτικά και ζωικά υλικά που βρίσκονται σε αποσύνθεση. Σήμερα στο φύλλο των Ζυγομυκήτων είναι γνωστά 1500 είδη (Krogh, 2011) και σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον 40 είδη παθογόνων μηκύτων όπως το είδος *Fusarium* spp. που σχετίζεται με ενδοноσοκομιακές λοιμώξεις. Αρκετά είδη του φύλλου χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ουσιών βιομηχανικής κλίμακας όπως της βιοτίνης από το *Rhizopus delemar*, του λινολενικού οξέως από το είδος *Mucor indicus*, του β-καροτενίου από το είδος *Blakeslea trispora*. Αναπαράγονται εγγενώς όπου δύο όμοια πολυπύρρηνα γαμετάγγεια ενώνονται, το μεταξύ τους χώρισμα διαλύεται και σχηματίζεται ένα σπόριο με χοντρά τοιχώματα, το **ζυγοσπόριο**.



Εικόνα 3 Ζυγομύκητες

1.4 Μορφολογία Μυκήτων

Το κύτταρο

Το μυκητιακό κύτταρο είναι μεγαλύτερο από αυτό των βακτηρίων και περιέχει όλα τα κυτταροπλασματικά οργάνδια των φυτών, εκτός από τους χλωροπλάστες. Η κυτταροπλασματική τους μεμβράνη αποτελείται από εργοστερόλη και ζυμοστερόλη. Το κυτταρικό τους τοίχωμα που περιβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελείται από πολυσακχαρίτες (χιτίνη, γλυκάνη, μαννάνη και κυτταρίνη), πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες, που προσδίδουν σταθερό σχήμα στο κύτταρο. Μερικοί μύκητες έχουν ένα λεπτό ή αρκετά παχύ έλυτρο που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες και προστατεύει τον μύκητα από τη φαγοκυττάρωση. Οι μύκητες, στη συντριπτική τους πλειονότητα, έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία κατά κανόνα σχηματίζονται από εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα.

Το σώμα

Ως προς τη μορφή του σώματος διακρίνονται δύο τύποι μυκήτων.

- **Μονοκύτταροι**, όπου το σώμα του κάθε ατόμου αποτελείται από ένα και μόνο κύτταρο, σφαιρικού, ωοειδούς, ελλειψοειδούς σχήματος. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι γνωστές ζύμες.
- **Μυκηλιακοί**, των οποίων το σώμα αποτελείται από λεπτά διακλαδιζόμενα νημάτια μικροσκοπικής διαμέτρου (2-10 μm) τα οποία ονομάζονται υφές, το σύνολο των οποίων απαρτίζει το σώμα του μύκητα και ονομάζεται μυκήλιο, μπορεί δε να πάρει μακροσκοπικές διαστάσεις αν υπάρχει διαθέσιμη τροφή και ευνοϊκές συνθήκες

Διακρίνονται δύο τύποι υφών:

- **Πολυκύτταρες Υφές**, που φέρουν κατά διαστήματα εγκάρσια διαφράγματα (septa) και στο οπτικό μικροσκόπιο φαίνεται να αποτελούνται από κύτταρα, και γι' αυτό και οι μύκητες αυτοί λέγονται πολυκύτταροι μύκητες. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι **Βασιδιομύκητες** και οι **Ασκομύκητες**.
- **Κοινοκύτταρες Υφές** με ενιαίο εσωτερικό χώρο, χωρίς διαφράγματα κατά μήκος τους και οι αντίστοιχοι μύκητες ονομάζονται κοινοκύτταροι μύκητες. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι **Ζυγομύκητες**.



Εικόνα 4 Βασιδιομύκητες
(meteoramuseum.gr)



Εικόνα 5 Ασκομύκητες
(meteoramuseum.gr)



Εικόνα 6 Ζυγομύκητες
(markdunk.co.uk)

1.5 Δρογοϊστορία των μυκήτων

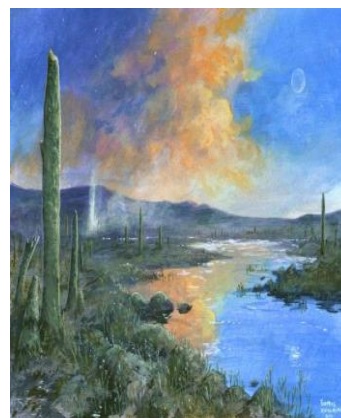
Οι μύκητες εμφανίστηκαν στην Γη πριν από 1,3 δισεκατομύριο χρόνια. Σύμφωνα με την παλαιοντολογία, ο αρχαιότερος πρόγονος των μυκήτων ήταν το είδος *Tortotubus protuberans*, απολίθωμά του απογράφεται πριν από 440 εκ.χρόνια, σε Νέα Υόρκη, Σαουδική Αραβία, Σουηδία και Σκωτία. Απολίθωμα μυκήτων βρέθηκε το 1850 στην Σαουδική Αραβία από τον Καναδό William Dawson, που υπολογίζεται να έχει δημιουργηθεί πριν από 420 εκατ. χρόνια και να είχε ύψος περί τα 6m. Η κατηγορία αυτή ονομάζεται Πρωτοταξίτες που ήταν τεράστια μανιτάρια και έζησαν πριν από 430-350 εκατ. χρόνια.



Εικόνα7 *T. protuberans*



Εικόνα 8 Σαουδική Αραβία 1959 (Φωτ. Franz Hueber)



Εικόνα 9 Πρωτοταξίτες

Η πρώτη λεπτομερής περιγραφή των μυκήτων έγινε από τον Θεόφραστο, στα συγγράμματά του «Περί Φυτών Ιστορίας» και «Περί Φυτών Αιτιών». Εκεί περιγράφονται οι μύκητες ως ατελή φυτά και τους ταξινομεί σε «υπόγειους» μύκητες του χώματος, και σε «παρασιτικούς» που αναπτύσσονται στους κορμούς δένδρων. Το 1483 ο Theodore Gaza μετέφρασε στα Λατινικά τα βιβλία του Θεόφραστου και ταξινόμησε τους μύκητες που περιέγραψε ως εξής: «Tuberaceae» οι υπόγειοι, «Pezizaceae» οι επίγειοι και «Licoperdaceae» οι παρασιτικοί. Επί αιώνες οι μύκητες θεωρούνταν μέλη του Φυτικού Βασιλείου, ενώ από τα πρώτα χρόνια της μελέτης τους η ταξινόμησή τους αποτέλεσε αντικείμενο αυξημένης δυσκολίας. Αρκεί να αναφερθεί ότι το 1753 ο Λινναίος πρότεινε να καταταχθούν στο Γένος *Chaos* (*Species Plantarum*). Το «χαοτικό» στοιχείο στην ταξινόμησή τους επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι μόλις στα τέλη του 20^{ου} αι. αποσαφηνίστηκε η ταξινομική θέση πολλών μυκήτων, καθώς και η ένταξή τους στο ξεχωριστό Βασίλειο των Μυκήτων.

1.6 Διαβίωση των μυκήτων

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που διακρίνονται σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους. Είναι ποικιλόμορφοι και ετερότροφοι, που σημαίνει ότι δεν μπορούν να συνθέσουν μόνοι τους τις οργανικές ουσίες και απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται με τη βοήθεια πεπτικών ενζύμων. Είναι ανθεκτικοί σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες, σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις και ξηρασία και τα σπόρια τους επιζούν για χρόνια στο εξωτερικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα στο έδαφος υπάρχουν παρασιτικοί και σαπροφυτικοί μύκητες, στα γλυκά νερά και στη θάλασσα υπάρχουν οι υδρόβιοι μύκητες και στην ατμόσφαιρα αιωρούνται πλήθος σπόρια και μικρά κομμάτια υφών από χερσαίους μύκητες (ακόμα και σε μεγάλα ύψη).

Ένας λόγος στον οποίο οφείλεται η αξιοσημείωτη ανθεκτικότητά τους, είναι ότι το δίκτυο μυκηλιακών υφών έχει την ικανότητα να παράγει οξαλικά οξέα καθώς και άλλα οξέα και ένζυμα, με αποτέλεσμα να διαβρώνει τα πετρώματα του εδάφους και να αντλεί ασβέστιο και άλλα στοιχεία, δημιουργώντας το οξαλικό ασβέστιο. Με αυτό τον τρόπο οι μύκητες προκαλούν το πρώτο στάδιο της εδαφοποίησης (Δήμου et al. 2005).

1.7 Οι μύκητες στην Εθνοφαρμακολογία

Είναι γεγονός ότι κατά το πέρασμα των χρόνων η χρήση φυτικών ειδών ως φαρμάκων (φυτοθεραπευτικών) υπερισχύει εκείνης των μυκήτων. Ωστόσο, ακόμα και από την εποχή του Διοσκουρίδη υπάρχουν αναφορές στη χρήση

Ο Διοσκουρίδης και άλλοι κλασσικοί συγγραφείς θεωρούσαν το «Agaricum» πολύ ευεργετικό για την υγεία. Πιθανώς να αναφερόταν στο μύκητα *Fomitopsis officinalis* - Φόμης ο φαρμακευτικός. Το «Agaricum» θεωρείτο ως πανάκεια και ήταν κατάλληλο για τη θεραπεία από δάγκωμα δηλητηριώδους φιδιού έως και υστερίας. Ο Διοσκουρίδης περιγράφει το μύκητα ως στυπτικό, θερμαντικό, δραστικό κατά των κωλικών, κατά των καταγμάτων και των μωλώπων στο βιβλίο «Περί ύλης Ιατρικής».



Εικόνα 10 Διοσκουρίδης

Σύγχρονες κλινικές πρακτικές σε Ιαπωνία, Κίνα και Κορέα εξακολουθούν να χρησιμοποιούν σκευάσματα που προέρχονται από μανιτάρια, συνεχίζοντας μια παράδοση πολλών αιώνων στον τομέα της θεραπείας. Φαρμακευτικές ιδιότητες έχουν προσδιοριστεί σε πολλά είδη μυκήτων που προέρχονται κυρίως από εκχυλίσματα ειδών των γενών : *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hericium*, *Lentinula* (*Lentinus*), *Pleurotus*, *Trametes* (*Coriolus*), *Schizophyllum* και *Tremella* (Wasser et al. 2002).

Ο John Gerald, Άγγλος βοτανολόγος, στο βιβλίο του «*The Herbal Or General History of Plants*», που δημοσιεύθηκε το 1633, ανέφερε τον μύκητα *Auricularia auricula-judae* - Αουρικουλάρια η ωτιόμορφη και πρότεινε τα καρποσώματά του να βράζονται σε γάλα ή να εκχυλίζονται με μύζα για τη θεραπεία της φαρυγγίτιδας. Μελέτη των *Ukai et al.*, υποστηρίζει πως οι απομονωμένοι πολυσακχαρίτες MHA και MCW-A από το συγκεκριμένο είδος απέδωσαν πολύ υψηλή αντιφλεγμονώδη δράση, γεγονός που δικαιολογεί την παραπάνω χρήση του μανιταριού.

Η χρήση σκληρωτίων του μύκητα *Claviceps purpurea* – Ερυσιβώδης όλυρα στη μαιευτική είναι ένα παράδειγμα παραδοσιακής ιατρικής. Σήμερα είναι γνωστό ότι τα σκληρώτια περιέχουν αλκαλοειδή, αρκετά από τα οποία είναι ιδιαίτερα τοξικά και προκαλούν τη γνωστή εργοτίαση (Tudzynski et al., 2001). Όμως σε μικρές ποσότητες ήταν και είναι ευεργετικά στη διέγερση μυών και στην παρεμπόδιση αιμορραγιών. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των *Cvak et al. 1994* απομονώθηκε ένα νέο αλκαλοειδές, το ergotaline.

Στη Ρωσική παραδοσιακή θεραπευτική ένα σκεύασμα με βάση καρποφορίες του μύκητα *Inonotus obliquus* - Ινόνοτος ο λοξός, χρησιμοποιήθηκε κατά του καρκίνου. Μετά από έρευνα στο σκεύασμα αυτό παρατηρήθηκαν αντικαρκινικές ιδιότητες με αποτέλεσμα τη διάθεσή του στην αγορά με το όνομα “Befungin” κατά τη διάρκεια



Εικόνα 11
“Befungin” της
εταιρείας ΟΑΟ

της περιόδου της Σοβιετικής Ένωσης. Το φάρμακο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία χρόνιας γαστρίτιδας, του έλκους στομάχου και της πρώιμης ανάπτυξης όγκων στους πνεύμονες και στο στομάχι (Vaidya et al., 1993).

Στην Κινεζική φαρμακευτική, τέσσερα είδη θεωρούνται μέχρι σήμερα ότι ανήκουν στα πλέον πολύτιμα φάρμακα που διατηρούν και προάγουν την καλή υγεία. Σε αυτά τα είδη συμπεριλαμβάνονται: ο μύκητας *Ganoderma lucidum* - Γανόδεσμα το λαμπερό (ling zhi), ο *Polyporus umbellatus* - Πολύπορος ο ομβρελοφόρος (zhu ling) και ο *Cordiceps sinensis* - Κορδίσεψ ο σινικός.



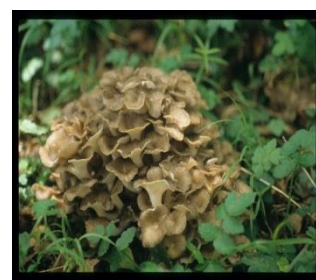
Εικόνα 12 *Fomitopsis officinalis*
(fichasmicologicas.com)



Εικόνα 13 *Auricularia auricula-judae*
(first-nature.com)



Εικόνα 14 *Inonotus obliquus*
(medicalmushrooms.net)



Εικόνα 15 *Polyporus umbellatus*
(garcia bona.blogspot.com)

1.8 Διατροφική αξία τωνμανιταριών

Τα μανιτάρια θεωρούνται εξαιρετική τροφή, καθώς περιέχουν αμελητέες ποσότητες λίπους και σακχάρων, αλλά σημαντικές ποσότητες φυτικών ινών. Οι πρωτεΐνες των μανιταριών, λόγω της παρουσίας όλων των απαραίτητων αμινοξέων, είναι υψηλής βιολογικής αξίας και συναγωνίζονται σε ποιότητα τις ζωικές πρωτεΐνες, χωρίς όμως να περιέχουν τοξίνες, λίπη και χοληστερόλη που βρίσκονται στο κρέας.

Υγρασία

Όταν αξιολογείται η θρεπτική αξία των μανιταριών, ο σημαντικότερος παράγοντας είναι η ξερή ουσία ή η περιεκτικότητα σε υγρασία, η οποία έχει άμεσες επιπτώσεις στις περιεκτικότητες των μανιταριών σε θρεπτικά συστατικά (Μάλλιαρης, 2006).

Ενέργεια

Τα μανιτάρια είναι χαμηλής ενέργειας τρόφιμα, και οι ενεργειακές τιμές τους ποικίλουν από 25 έως 30 kcal/100gr (Μάλλιαρης, 2006).

Υδατάνθρακες

Το ποσοστό των υδατανθράκων είναι εξίσου χαμηλό. (Μάλλιαρης, 2006).

Διαιτητικές ίνες

Τα μανιτάρια είναι πλούσια σε διαιτητικές ίνες, με κύρια ουσία τη χιτίνη. Η χιτίνη είναι συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των περισσότερων μυκήτων (Μάλλιαρης, 2006).

Λιπαρά

Τα λιπαρά των ακατέργαστων μανιταριών κυμαίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων λιπαρών οξέων, των μονοακόρεστων και τα τριγλυκερίδια (Μάλλιαρης, 2006).

Άζωτο

Στη συγκέντρωση του αζώτου υπάρχουν διακυμάνσεις ανάλογα το είδος των μανιταριών, αλλά πολλές φορές υπάρχουν και διαφορές ανάμεσα στα ίδια είδη, αυτό οφείλετε και στο ότι το ποσοστό αζώτου έχει μεγάλη σχέση με το υπόστρωμα στο οποίο καλλιεργείται το μανιτάρι (Μάλλιαρης, 2006).

Βιταμίνες

Τα μανιτάρια παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη D καθώς και σε βιταμίνες του συμπλέγματος B. Αποτελούν το μοναδικό τρόφιμο, εκτός του κρέατος, το οποίο περιέχει βιταμίνη B12. Ως εκ τούτου αποτελούν ιδανική επιλογή για τους χορτοφάγους. Επιπλέον οι αμελητέες ποσότητες νατρίου που περιέχονται στα μανιτάρια, τα καθιστούν κατάλληλα και για υπερτασικά άτομα (Miles & Chang, 2004)

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα διατροφικά στοιχεία των μανιταριών (Mushroom Council, 2004).

Θρεπτικά συστατικά ανά 100gr μανιταριών	
Ενέργεια	25 Kcal
Νερό	91,8 gr
Πρωτεΐνες	2,9 gr
Λιπίδια	0,3 gr
Υδατάνθρακες	4 gr
Φυτικές ίνες	1,2 gr
Κάλιο	3,7 gr
Φώσφορο	104mg
Χαλκό	0,5 mg
Σελήνιο	8,8 mg
Νάτριο	4 mg
Νιασίνη	4 mg
Ριβοφλαβίνη	0,4 mg
Θειαμίνη	0,1 mg
Παντοθενικό οξύ	1,5 mg
Βιταμίνη B12	0,04 mg
Βιταμίνη D	76.000 IU

Από τον διατροφικό πίνακα αξίζει να αναφερθούν τα ιχνοστοιχεία και τα μέταλλα των μανιταριών.

- **Κάλιο:** Τα μανιτάρια περιέχουν άφθονα μεταλλικά άλατα και ιχνοστοιχεία, όπως το κάλιο, που είναι απαραίτητος ηλεκτρολύτης για τη διατήρηση της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών και του

νερού στον ανθρώπινο οργανισμό, την καλή λειτουργία του σκελετού και των μυών της καρδιάς, την έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, τη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης.

- **Φωσφορος:** Τα μανιτάρια αποτελούν επίσης καλή πηγή φωσφόρου, ο οποίος συμβάλλει στην κατασκευή των οστών και των δοντιών, καθώς και στη μεταφορά των γενετικών πληροφοριών (DNA-RNA) στον οργανισμό.
- **Χαλκός:** Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε χαλκό είναι επίσης ιδιαίτερα υψηλή (100 γραμμ. μανιτάρια καλύπτουν το ήμισυ της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης). Ο χαλκός συντελεί στη διατήρηση της ελαστικότητας των αρτηριών και του χρώματος του τριχωτού της κεφαλής, συμμετέχει ενεργά στο μεταβολισμό των αμινοξέων και συμβάλλει στην ακεραιότητα του νευρικού συστήματος.
- **Σελήνιο:** Εκτιμάται επίσης ότι έχουν καρδιοπροστατευτική δράση, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε σελήνιο.
- **Ψευδάργυρος:** Ο ψευδάργυρος, που είναι βασικό συστατικό των μανιταριών, συντελεί στην ομαλή ανάπτυξη του σώματος, στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού και αναπαραγωγικού συστήματος.

Συμπληρώματα διατροφής με μανιτάρια

Στην αγορά διατίθενται συμπληρώματα διατροφής με εκχυλίσματα μανιταριών κυρίως από τα είδη: *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Inonotus obliquus*, *Cordyceps sinensis* κ.ά., με ισχυρισμούς υγείας ενδυνάμωση ανοσοποιητικού, ηπατοπροστασία, καρδιοτονωτική δράση και τόνωση.



Εικόνα 16 Συμπληρώματα διατροφής

2. Η Τρούφα

«Το ύδνο είναι ρίζα στρογγυλή, χωρίς φύλλα, χωρίς βλαστό, υπόξανθη που εκριζώνεται την άνοιξη. Είναι φαγώσιμη και τρώγεται ωμή ή ψημένη», αναφέρει ο Διοσκουρίδης. Τα ύδνα γνωστά και ως Ύκνα, Ύχνα, Ίτανα, Ίτνα, Υδανιά, Χοιρόψωμα, Χοιρόχορτα ή αλλιώς οι τρούφες είναι ένα σπάνιο και συνεπώς πολύτιμο είδος υπόγειουμανιταριού.»
(Γεννάδιος, 1914).

Η τρούφα αποτελεί ένα σπάνιο είδος υπόγειουμανιταριού. Είναι το υπόγειο καρπόσωμα (fruiting body) μυκήτων του γένους *Tuber*, *Terfezia*, *Tirmania* που ανήκουν στην κατηγορία των Ασκομυκήτων. Αποτελεί την υπόγεια καρποφορία ενός ετερότροφου μύκητα που συμβιώνει με ρίζες δένδρων ή θάμνων και δημιουργεί μια συμβιωτική σχέση με αυτούς. Η ύπαρξη της είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια, ωστόσο ο τρόπος δημιουργίας της, ο διαχωρισμός των διαφόρων ειδών και ο κύκλος ζωής της αποτελούσαν πάντα αντικείμενο μελέτης. Η αύξηση του ενδιαφέροντος για τις τρούφες στη σύγχρονη εποχή, τόσο σε επίπεδο καλλιέργειας όσο και σε επίπεδο μελέτης των χημικών συστατικών, οφείλεται στη σπανιότητά τους και στο ιδιαίτερο άρωμα τους (Πανουκλιάς, 2013).

Kingdom (Βασίλειο)	<u>Fungi</u>
Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>



Εικόνα 17 *Tuber*

2.1 Δρογοετυμολογία

Σύμφωνα με τον Θεόφραστο τον 4^ο αιώνα π.Χ, οι τρούφες, ονομάζονταν ύδνα και ήταν γνωστά με την ονομασία Γεράνειον, Μίση, Ίτον, Οίτον, Ασχίον και ως Κεραύνιον. Η ονομασία ύδνον, προέρχεται από το ύδωρ, είτε από το ρήμα ύει (βρέχει), και είναι αποτέλεσμα των υποθέσεων των επιστημόνων της εποχής, γύρω από τη ζωή και την ύπαρξη της τρούφας. Τον 17^ο αι. ο Ιταλός βοτανολόγος και καθηγητής στην Πίζα Pier Antonio Micheli εφάρμοσε τον όρο «Tuber» στο βιβλίο του «*Nova plantarum genera*». Στην εποχή μας έχει επικρατήσει η ονομασία τρούφα (truffle) (Zambonelli, 2016).



Εικόνα 18 Δημιουργία της τρούφας (Tuber.it)

2.2 Δρογοϊστορία της τρούφας

Παρόλο που οι τρούφες ήταν μία κοινή τροφή για τους ανθρώπους από τους πρώιμους πολιτισμούς, η φύση της τρούφας είχε παραμείνει ασαφής για αιώνες.

Η πρώτη γραπτή αναφορά στους υπόγειους μύκητες έγινε πριν από 4000 χρόνια σε ένα Σουμεριανό κείμενο σε πλάκα αργίλου που ανακαλύφθηκε στα ερείπια της πόλης Μάρι, στην Μεσοποταμία (Pagnol et al. 2000). Σε αυτό το κείμενο, οι υπόγειοι μύκητες αναφέρονται ως “Kam’atu”, που

στην πραγματικότητα είναι το γένος *Terfezia*, η αλλιώς η τρούφα της ερήμου (Kirk et al. 2001). Στο εύρημα απεικονίζεται ένα καλάθι με τρούφες, ως προσφορά δώρου του υπηρέτη προς τον βασιλιά του. Παρόμοιες αναφορές υπάρχουν σε αρχαία Αιγυπτιακά κείμενα, όπου φαίνεται ότι οι τρούφες αποτελούσαν βασιλικό έδεσμα.

Σύμφωνα με τον Θεόφραστο, τον 4^ο αιώνα π.Χ, υποστηρίζεται ότι τα ύδνα παράγονται στο χώμα έπειτα από βροχές κατά τους φθινοπωρινούς μήνες. Ο Πλούταρχος, ο Διοσκουρίδης και ο Κικέρωνας προσπαθούσαν να ερμηνεύσουν την ανεξήγητη παρουσία των υδνών στις ρίζες των δένδρων, θεωρώντας την ως αποτέλεσμα της συντριβής των κεραυνών πάνω στην γη. Ειδικότερα, ο Πλούταρχος συμφωνεί πως οι βροχές φέρνουν τα «παμμεγέθη» ύδνα, και συγκεκριμένα αναφέρει στο «Συμπόσιο» ότι δημιουργούνται από την πτώση κεραυνών σε θερμά και υγρά εδάφη (Talou et al., 1990). Ο Αθηναίος ο Ναυκρατίτης διατυπώνει πως τα ύδνα είναι πολύ νόστιμα, ότι έχουν μυρωδιά κρέατος, ότι σκληραίνουν με τις φθινοπωρινές βροχές και τους κεραυνούς και «χωρίς να σπαρούν φυτρώνουν κατεξοχήν εις αμμώδη μέρη» (Γεννάδιος, 1914).



Εικόνα 19 Τρούφες γένους *Terfezia* (Shavit et al., 2007)

Οι τρούφες αργότερα εγκωμιάστηκαν από τους Έλληνες και τους Ρωμαίους, όπως τεκμηριώνεται από τον Θεόφραστο (4^ο αι. π.Χ) και τον Γαληνό στο βιβλίο «Περί τροφών δυνάμεως» (τομ.Ε) όπου διασαφήνισε πως η κατανάλωση της τρούφας, πέραν των θρεπτικών ιδιοτήτων, είχε και αφροdisιακές ιδιότητες. Ο ρωμαίος γαστρονόμος Απίκιος (Marcus Gavius Apicius) (25 π.Χ.) είχε κάνει αναφορά στις τρούφες στο πρώτο εγχειρίδιο γαστρονομίας της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας.

Από την κατάρρευση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας (450 μ.Χ) έως τον Μεσαίωνα (14^ο αι.), οι τρούφες περνούν στην αφάνεια και καταναλώνονται κυρίως από αγρότες. Αυτό συνέβαινε κατά τον Μεσαίωνα γιατί οι τροφές κατατάσσονταν αξιακά σύμφωνα με την θέση τους στο έδαφος: τα ζώα πτηνά και τα σιτηρά (που αναπτύσσονταν πάνω από το έδαφος) ήταν πιο κοντά στον ουρανό -άρα και στον θεό- συνεπώς προσφέρονταν αποκλειστικά στους ευγενείς και άρχοντες ενώ οτιδήποτε αναπτυσσόταν κάτω από το έδαφος (λ.χ. πατάτες και τρούφες) θεωρούνταν σατανικής προέλευσης και καταναλώνονταν μόνο από τους χωρικούς (Duc-Maugé et al., 1998). Η «σκοτεινή εποχή» των τρουφών έληξε κατά τον 14^ο αι. όταν άρχισε ο Πάπας της Avignon και οι βασιλείς της Γαλλίας Φραγκίσκος Α' και Ερρίκος Β', να τις σερβίρουν σε συμπόσια. Από τότε η ζήτηση και η φήμη των τρουφών αυξήθηκε αισθητά και ο μύκητας αναφερόταν με μεγάλες τιμές από μαγείρους και γαστρονόμους (Splivallo, 2006).

Το 1583, ο Ιταλός βοτανολόγος, ιατρός και φιλόσοφος Τσεζάλπινο (Andrea Cesalpino) περιέγραψε τις τρούφες ως μύκητες με υπόγεια καρποσώματα. Το 1788, ο Ιταλός ιατρός του Τουρίνο Vittorio Pico, καθιέρωσε τις βάσεις για την ταξινόμηση των τρουφών στο βιβλίο του «*Melethemata inauguralia*», αντικείμενο που επανεξετάστηκε από τον ιατρό και μυκητολόγο Carlo Vittadini το 1831 στο βιβλίο του «*Monographia Tuberacearum*». Στο μεσοδιάστημα 1800-1810, οι Γάλλοι Gasparin και Talou αντιλήφθηκαν πως η ανάπτυξη της τρούφας έχει άμεση σχέση με τι βελανιδιές. Έτσι, ο Talou φύτεψε σπόρους βελανιδιάς για να λάβει μετά από λίγα χρόνια τρούφες κάτω από τα δέντρα του (Zambonelli, 2016).

Το 1852 ο Abbé Charvat υποστήριξε ότι οι τρούφες παράγονταν από τα εκκρίματα των φύλλων

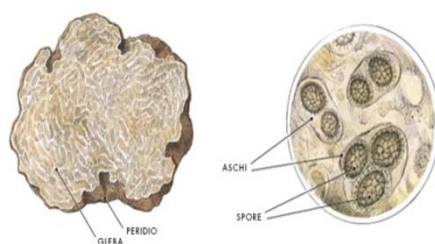
βελανιδιάς που είχαν μεταφερθεί στο έδαφος και μετατρέπονταν σε καρποσώματα, και το 1856 ο Γάλλος Montagnac δήλωσε πως παράγονται από τα τσιμπήματα των εντόμων στις ρίζες των δέντρων (Duc-Maugé et al. 1998). Τέλος, το 1885 ο Frank για πρώτη φορά περιέγραψε την μυκόρριζα και στην αρχή του 20^{ου} αι. ο Ιταλός βοτανολόγος και μυκητολόγος Mattiolo από τον Βοτανικό κήπο του Τουρίνο, ερεύνησε και τεκμηρίωσε επιστημονικά την μυκορριζική σχέση συμβίωσης της τρούφας με τα δένδρα υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η μυκορριζική σχέση της τρούφας έγινε διεθνώς αποδεκτή μόλις το 1960 (Trappe et al. 1962).

2.3 Δομή, αναπαραγωγή και συμβίωση

Δομή

Η τρούφα αναπτύσσεται σε δασικά εδάφη κάτω από τα απορρίμματα των δένδρων, είτε μέσα στον ορυκτό ορίζοντα. Συνεπώς το περιβάλλον της τρούφας είναι το εξής: α) το καρπόσωμα (η τρούφα), β) το μυκήλιο, γ) οι ρίζες των φυτών και δ) το έδαφος που αναπτύσσεται.

Το καρπόσωμα (sporocarp), που ονομάζεται τρούφα, συνδέεται με το υπόγειο δίκτυο ριζών του οικοσυστήματος εκτομυκορριζικά και μεγαλώνει. Η φυτική (βλαστική) σύνθεση-δομή που ενώνει το «καρποφόρο γόνιμο σώμα» με τις ρίζες των φυτών που συμβιώνει, ονομάζεται μυκήλιο. Οι μυκηλιακές υφές αυτών των μυκήτων περιβάλλουν τα λεπτά ριζικά τριχίδια των φυτών και λαμβάνουν από αυτά κυρίως υδατάνθρακες, ενώ οι ρίζες των φυτών προσροφούν νερό από το έδαφος, αζωτούχες ουσίες και στοιχεία όπως κάλιο, φώσφορο, σίδηρο καθώς και ιχνοστοιχεία.



Εικόνα 20 Εσωτερική εικόνα τρούφας (Centro Nazionale Studi Tartufo)

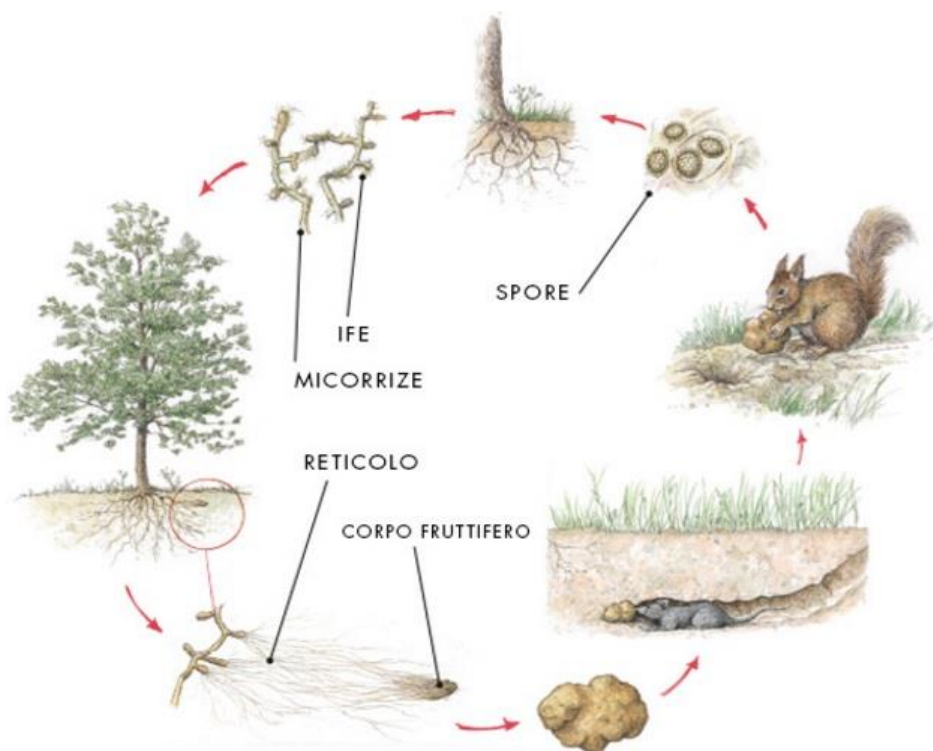
Αναπαραγωγή

Το καρπόσωμα εσωκλείει τα σπόρια του. Ωστόσο οι τρούφες βρίσκονται υπογείως. Έτσι ανέπτυξαν έναν παθητικό μηχανισμό, συγκριτικά με τους επίγειους μύκητες, για να επιβιώσουν. Ο μηχανισμός αυτός παράγοντας οσφρητικά και οπτικά ερεθίσματα βασίζεται στην προσέλκυση των ζώων, με αποτέλεσμα την κατανάλωση των σωμάτων άρα και των σπορίων τους και την ελευθέρωση και διανομή τους στη φύση μέσω των απορριμμάτων των ζώων (Lebel et al. 2014). Υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικά πτηνά δρούν ως διασκορπιστές των σπορίων όπως συμβαίνει στο γένος *Raurocotylis* στην Ν. Ζηλανδία (Fogel et al., 1975) και ότι παρόμοια δρούν κάποια είδη εντόμων (Paolocci et al. 2006; Riccioni et al. 2008).

Συνεπώς τα σπόρια διασπείρονται στη φύση μέσα στη γη και σιγά-σιγά βλασταίνουν, δημιουργώντας λεπτά νημάτια, τα μυκήλια. Τα μυκήλια έπειτα, συμβιώνουν με τις ρίζες ενός δένδρου και σχηματίζουν κοινά όργανα που ονομάζονται μυκόρριζες. Με την πάροδο του χρόνου, τα νημάτια αυξάνονται σε μέγεθος και η τρούφα αναπτύσσεται γύρω από τη ρίζα του

δένδρου, εισερχόμενη στην αναπαραγωγική περίοδο. Κατά τη διάρκεια αυτή, το φρουτώδες σώμα της τρούφας γεμίζει με σπόρια. Τα σπόρια στην αρχή έχουν μια διάφανη μορφή ενώ στη συνέχεια αποκτούν εντονότερο σκούρο χρώμα, γεγονός που υποδηλώνει την ωρίμανση της τρούφας, ενώ παράλληλα εμφανίζεται το ιδιαίτερό της άρωμα. Όταν η τρούφα υπέρ-ωριμάσει, τότε τα σπόρια εκλύονται μέσα στο έδαφος και η βλαστική περίοδος των μυκηλίων ξεκινά. Η κάθε τρούφα έχει τη δική της αναπαραγωγική περίοδο μέσα στο χρόνο.

Η σεξουαλική φύση του γένους *Tuber* και συγκεκριμένα του *T. magnatum* και *T. melanosporum* ξεκίνησε να μελετάται από τους *Martin et al. 2010*. Μελέτες πάνω στην γονιδιωματική αλληλουχία του γένους (Healy et al. 2013; Urban et al. 2004) έδειξε την ύπαρξη δύο φύλων. Ωστόσο, κάποια είδη *Tuber* παράγουν μιτωτικά ασεξουαλικά σπόρια τα οποία που δυνητικά λειτουργούν ως αυτόνομα μέσα αναπαραγωγής, είτε ως αποικιστές των ριζών των δένδρων (Brundrett et al., 2004).



Εικόνα 21 Ο κύκλος ζωής της τρούφας (Centro Nazionale Studi)

*Spore: σπόρια, Ife: υφές, Micorrize: Μυκόρριζα, Reticolo: δίκτυο, Corpo fruttifero: καρπόσωμα

Συμβίωση

Συμβίωση με φυτά: Το κάθε γένος τρούφας συμβιώνει με συγκεκριμένα είδη φυτών. Έως σήμερα το γένος *Tuber* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να συμβιώνει με τα παρακάτω φυτικά είδη (Buzzini et al. 2005; Zacchi et al. 2003) :

Οικογένεια	Είδος	
Betulaceae	<i>Carpinus betulus</i>	(Καρπίνος ο βετουλοειδής)
	<i>Corylus avellana</i>	(Κόρυλος η αβελλάνιος)
	<i>Corylus colurna</i>	(Κόρυλος η κολούρνιας)
Cistaceae	<i>Cistus sp</i>	(Αλαδανιά η κούνουκλα)
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	(Καστανέα η εδώδιμη)
	<i>Fagus spp.</i>	(Οξιά)
	<i>Quercus coccifera</i>	(Δρυς η κοκκοφόρος)
	<i>Quercus ilex</i>	(Άριος Δρυς)
	<i>Quercus pubescens</i>	(Δρύς η χνοώδης)
Pinaceae	<i>Quercus robur</i>	(Δρυς η έμμισχος)
	<i>Cedrus atlantica</i>	(Κέδρος του Άτλαντα)
	<i>Pinus halepensis</i>	(Χαλέπιος πεύκη)
	<i>Pinus nigra</i>	(Πεύκη η μέλαινα)
Salicaceae	<i>Salix spp.</i>	(Ιτέα)
Tiliaceae	<i>Tilia cordata</i>	(Φιλύρα η καρδιόφυλλος)

Συμβίωση με μύκητες: Οι τρούφες συμβιώνουν με άλλα είδη μυκήτων από τα γένη *Candida*, *Debaryomyces*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* και *Trichosporon* (Barbieri et al. 2010; Buzzini et al. 2005; Marletto 1969; Zacchi et al. 2003).

Συμβίωση με βακτήρια: Η τρούφα *T. borchii* συμβιώνει με γ-πρωτεοβακτήρια Pseudomonadales και ακτινοβακτήρια. Η τρούφα *T. magnatum* συμβιώνει με α-πρωτεοβακτήρια (Gryndler et al. 2012), ενώ το είδος *T. aestivum* συμβιώνει με τα πρωτεοβακτήρια: Burkholderiales, Enterobacteriales, Pseudomonadales, Rhizobiales, Xanthomonadales (Albee-Scott et al. 2007).

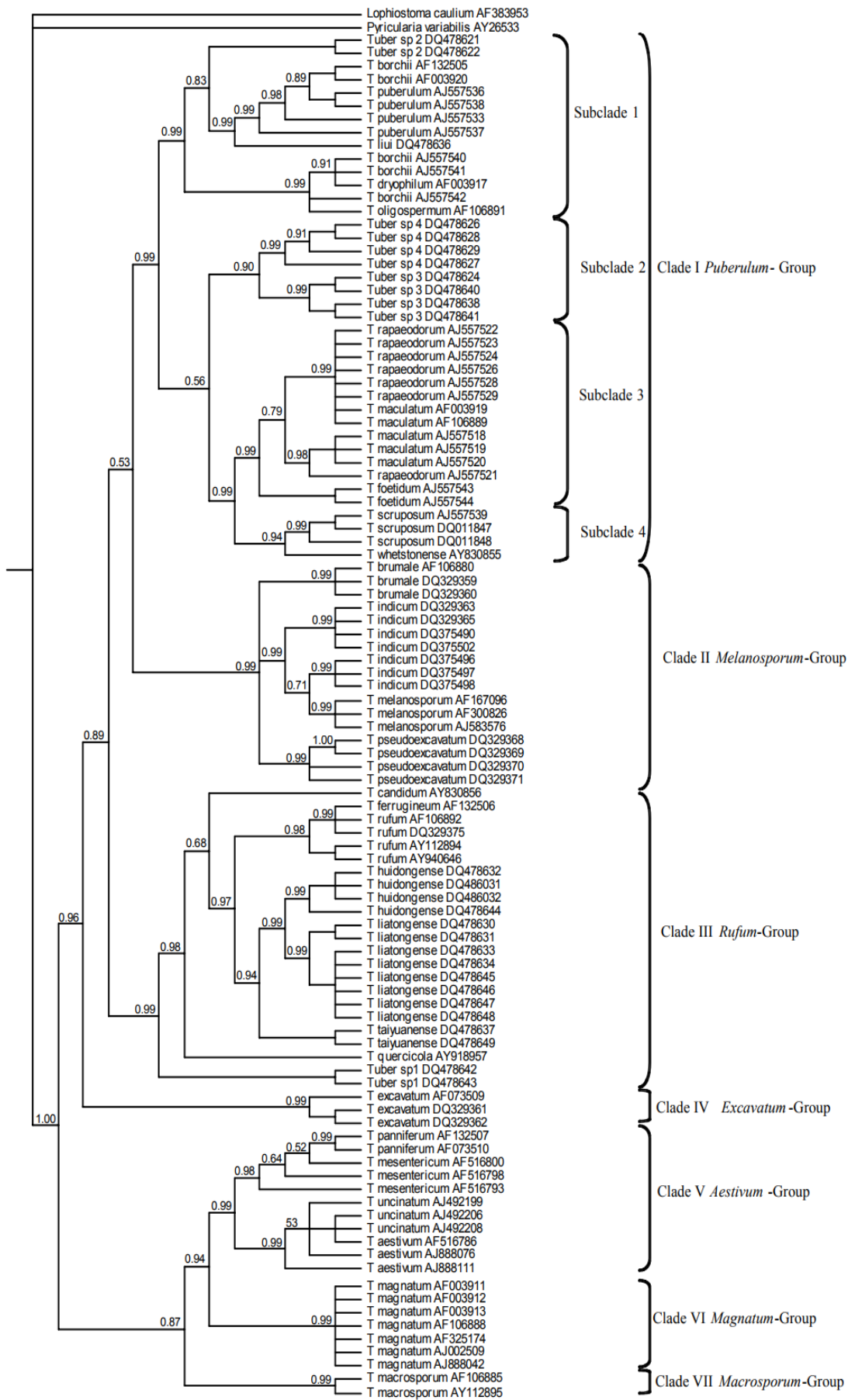
2.4 Δρογοβοτανική

Το γένος *Tuber* πιθανώς προέρχεται από την Ευρασία και ύστερα διαφοροποιήθηκε στο Βόρειο Ημισφαίριο κατά τη διάρκεια της Ιουράσιας και Κρητιδικής περιόδου (Splivallo et al., 2015). Οι λόγοι που διηγείραν την σκέδαση και την μεγάλη διαφοροποίηση των *Tuber* δεν είναι ακόμη γνωστοί. Η διαφοροποίηση μέσα στο γένος, δηλαδή η μορφή του σώματος, το μέγεθος, το άρωμα και ο πληθυσμός των βακτηρίων που αποτελούν το μικροβίωμα τους είναι αξιοσημείωτη. Η κατανόηση της επίδρασης του γονιδιώματος της φυσικής χλωρίδας της τρούφας, με τα φυτά που συμβιώνουν και πώς εκείνα αντιδρούν στην συνέχεια, είναι μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη μελέτη της οικολογίας της τρούφας. Η γνώση που θα προκύψει, θα ενδυναμώσει τις αγρονομικές πολιτικές που θα θεσπισθούν, ώστε να γίνεται αποδοτικότερη παραγωγή αλλά και προστασία των πληθυσμών και των εδαφών που κοσμούν.

Η παραδοσιακή ταξινόμηση της τρούφας βασίστηκε σε εξωτερικά και εσωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ο ιατρός και μυκητολόγος Carlo Vitadini το 1831, ήταν ο πρώτος που εισήγαγε

αυτού του είδους την κατάταξη στις τρούφες, και τις ξεχώρισε σε δύο ομάδες βασισμένες στην υφή τους και στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες (οσμή και γεύση). Το 1862 οι αδερφοί Tulasne δημοσίευσαν μια ταξινόμηση για τις τρούφες βασισμένη σε μικροσκοπικούς ελέγχους. Από το 18^ο έως τον 20^ο αι. περίπου 200 είδη, ποικιλίες και μορφές τρουφών περιγράφηκαν από μυκητολόγους σε διάφορες χώρες (Mello et al., 1996). Σήμερα σύμφωνα με τη βιοχημεία και τη δημιουργία εξειδικευμένων «δεικτών», οι ερευνητές είναι σε θέση να ξεχωρίσουν παρόμοια μορφολογικά είδη, όπως το *T. melanosporum* από το *T. brumale* ή το *T. indicum* (Douet et al., 2004), αλλά και το *T. magnatum* από το *T. borchii* και το *T. maculatum* (Amicucci et al., 1998). Οι δείκτες αυτοί ονομάζονται ITS (Internal Transcribed Spacer).

Σήμερα, στο Γένος *Tuber* ανήκουν 180 έως 220 είδη. Ο Bonito et al. 2013 διαχώρισε έντεκα βασικούς «κλάδους» (clades) του γένους μέσω τεσσάρων γονιδίων “δείκτες” ως τεκμήρια κατάταξης. Οι κλάδοι είναι οι εξής: Aestivum, Excavatum, Gneadii, Gibbosum, Japonicum, Macrosporum, Maculatum, Melanosporum, Multimaculatum, Puberulum και Rufum. (Οι κλάδοι είναι μια από τις κατηγορίες ταξινόμησης του συστήματος OTU (Operational Taxonomic Unit) (Lebel et al. 2014)).



ITS2 rDNA ταξινόμηση που προέκυψε από την ανάλυση Bayesian (Murat et al., 2004)

2.5 Είδη Τρούφας

2.5.1 *Tuber aestivum* (Vitad.) - Τούβερ το θερινό, Μαύρη καλοκαιρινή τρούφα

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. aestivum</i>



Εικόνα 22 *T. aestivum*

Δρογοετυμολογία

Το συγκεκριμένο είδος καρποφορεί και συλλέγεται το καλοκαίρι, συνεπώς πήρε το όνομά του από την λατινική λέξη *aestas* που σημαίνει καλοκαίρι.

Δρογοϊστορία

Η τρούφα *T. aestivum* είναι ένα από τα πιο γνωστά και περιζήτητα είδη τρούφας. Οι πρώτες αναφορές στο είδος έγιναν στο 1729 από τον Ιταλό βοτανολόγο Pier Antonio Micheli στο βιβλίο του «*Nova plantarum genera*» (Micheli, 1729) και το 1801 από τον μυκητολόγο Christiaan Hendrik Persoon στο βιβλίο του «*Synopsis Methodica Fungorum*» (Person, 1801). Το 1831 ο Ιταλός μυκητολόγος Carlo Vittadini κατέγραψε και περιέγραψε με λεπτομέρεια το είδος *T. aestivum*.

Δρογοβοτανική

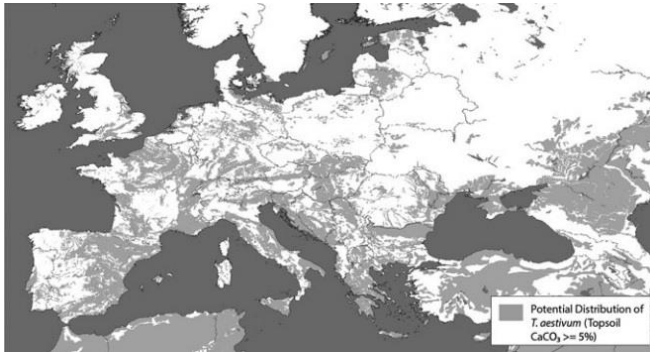
Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν στο παρελθόν να καταλάβουν την ταξινομική διαφορά των δύο τρουφών *T. aestivum* και *T. uncinatum*. Λόγω των μορφολογικών διαφορών τους και των περιβαλλοντικών τους προτιμήσεων (συμβίωση με διαφορετικά φυτά και καρποφορία σε διαφορετική εποχή) οι ερευνητές πίστευαν και πιστεύουν ότι οι δύο τρούφες είναι διαφορετικά είδη.

Μορφολογία

Εσωτερικά το καρπόσωμά του είναι βαθύχρωμο (σκούρο). Το μέσο βάρος της είναι περί τα 30g, ενώ το χρώμα της είναι σκούρο καφέ έως μαύρο.

Διαβίωση

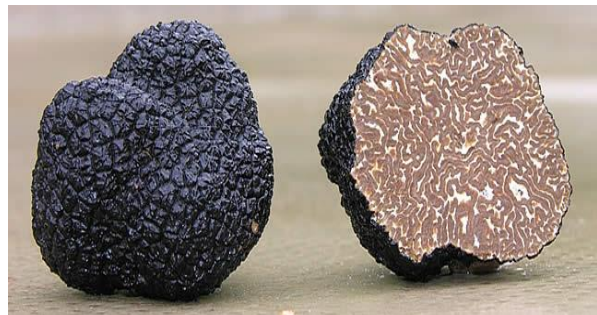
Η τρούφα *T. aestivum* έχει διασπαρεί σε όλη την Ευρώπη και συναντάται σε μεγάλο περιβαλλοντολογικό εύρος (De Roman et al. 2004). Η μεγάλη γκάμα των εδαφών στα οποία διαβιεί, του κλίματος και των συμβιωτικών φυτών, μαζί με την οικονομική του αξία και τη μεγάλη διάρκεια συγκομιδής, κάνει το συγκεκριμένο είδος ενδιαφέρον για καλλιέργεια. Σήμερα, η καλλιέργειά της εκτείνεται από την Ιταλία και την Ελλάδα ως την Σουηδία και από την Ισπανία ως την Πολωνία και την Ουγγαρία (Selosse et al. 2004). Αναπτύσσεται σε υψόμετρο έως και 900 μέτρα, σε ασβεστώδη και σε αργιλώδη εδάφη με όξινο pH. Η καλοκαιρινή τρούφα συλλέγεται από αρχές Μαΐου έως Σεπτέμβριο.



Εικόνα 23 Χάρτης πιθανής κατανομής του *T. aestivum* στην Ευρώπη. Οι γκρι περιοχές υποδεικνύουν τις κατοικίσιμες περιοχές της συγκεκριμένης τρούφας σύμφωνα με την συγκέντρωση ανθρακικού ασβεστίου (>5%) στο επιφανειακό έδαφος (Harmonized World Soil Database(v1.2) FAO/IIASA/ISRIC/ISSCAS/JRC,2012)

2.5.2 *Tuber uncinatum* (Vitad.) - Φθινοπωρινή τρούφα - Τρούφα της Βουργουνδίας

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u><i>Tuber</i></u>
Species (Είδος)	<i>T. uncinatum</i>



Εικόνα 24 *T. uncinatum*

Δρογοετυμολογία

Το όνομά του έχει προκύψει από το δίκτυο σπόρων έχει εικόνα αγκίστρων (*uncinatum* στα λατινικά σημαίνει αγκίστρο).

Δρογοβοτανική

Η φθινοπωρινή τρούφα *T. uncinatum* αποτελεί ξεχωριστό είδος, λόγω των μορφολογικών διαφορών και των περιβαλλοντικών της προτιμήσεων (συμβίωση με διαφορετικά φυτά και καρποφορία σε διαφορετική εποχή) (Chatin et al., 1887; Rioussset et al., 2001).

Μορφολογία

Εσωτερικά το καρπόσωμά του είναι βαθύχρωμο (σκούρο) και το δίκτυο σπόρων έχει εικόνα αγκίστρων. Αυτή η εικόνα αγκίστρων δημιουργήθηκε από τα εύκαμπτα τοιχώματα του δικτύου των σπορίων (Nowak et al. 2015). Οι πυραμίδες της είναι πιο έντονες από αυτές της καλοκαιρινής τρούφας (*T. aestivum*) και το άρωμά της εξαιρετικά εντονότερο.

Διαβίωση

Η φθινοπωρινή τρούφα προτιμά κρύα μέρη, αναπτύσσεται σε μεγάλα υψόμετρα και εδάφη πλούσια σε οργανική ύλη. Απαντάται από τη Μεσόγειο έως τη Σκανδιναβία, από τον Ατλαντικό έως τη Ρωσία. Στην Ιταλία εμφανίζεται κυρίως σε υψίπεδα και βουνά. Βρίσκεται σε ασβεστώδη εδάφη, με pH 7-7,8 και υψόμετρο έως 1200-1300 μέτρα. Αναπτύσσεται καλά σε κλίμα ημι-ηπειρωτικό, με υψηλή βροχόπτωση (700-800mm). Χρειάζεται αυξημένη υγρασία και σκιερά εδάφη, χωρίς πολύ ξηρά και θερμά καλοκαίρια. Συλλέγεται μέσα Σεπτεμβρίου με μέσα Δεκεμβρίου.

2.5.3 *Tuber magnatum* (Pico) - Τούβερ το μέγιστο, Λευκή χειμερινή τρούφα

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. magnatum</i>



Εικόνα 25 *T. magnatum*

Δρογοετυμολογία

Η λατινική λέξη *magnatum* σημαίνει μεγάλο-μέγιστο. Ονομάζεται επίσης «Piedmont truffle» ή «Tartufo bianco di Alba».

Δρογοϊστορία

Θεωρείται κορυφαίας ποιότητας τρούφα και για τον λόγο αυτό κατά τον 18^ο αιώνα ο πρίγκιπας Savoy την χρησιμοποιούσε ως δώρο στις διπλωματικές του σχέσεις (Courts et al. 2016) και έτσι ξεκίνησε μια μόδα-μανία γύρω από τις τρούφες σε όλη την Ευρώπη (Hall et al. 2003).

Δρογοβοτανική

Ο Ιταλός γιατρός Vittorio Pico ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τη συγκεκριμένη τρούφα το 1788.

Μορφολογία

Το σχήμα της είναι σφαιρικό με πολλές ρωγμές και το χρώμα της ποικίλλει από λευκό έως κίτρινο. Η εσωτερική της σάρκα είναι υποκίτρινη με λευκές φλέβες.

Διαβίωση

Απαιτεί γόνιμα χώματα, με pH= 7,2-8,0. Το συγκεκριμένο είδος είναι αρκετά ευαίσθητο στο χειμερινό κρύο και στην καλοκαιρινή ανομβρία. Χρειάζεται εδάφη με υψηλή εδαφική υγρασία, ακόμα και το καλοκαίρι, με υψόμετρο έως και 1000 μέτρα. Η ποικιλία αυτή απαιτεί ανοιξιότικες βροχοπτώσεις της

τάξεως των 110 mm το μήνα. Η συγκομιδή της λαμβάνει χώρα από το Σεπτέμβριο έως το Δεκέμβριο. Η τρούφα *T.magnatum* έχει ιδιαίτερα δύσκολο τρόπο καλλιέργειας και λόγω της εξαιρετικά μικρής ετήσιας παραγωγής της, η τιμή της είναι απίστευτα υψηλή (το 2007 η τιμή της έφθασε τα 7.000€/kg)

2.5.4 *Tuber borchii* (Vittad.) - Οίδημα του Μπόρχ-Τούβερ το Μπόρχειο

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. borchii</i>



Εικόνα 26 *T.borchii*

Δρογοετυμολογία

Είναι άγνωστη η προέλευση του ονόματός του.

Δρογοβοτανική

Η τρούφα *T.borchii* περιγράφηκε το 1831 από τον ιατρό και μυκητολόγο Carlo Vittadini στο βιβλίο του «*Monographia Tuberacearum*» (Vittadini, 1831).

Μορφολογία

Έχει χρώμα αρχικά υπόλευκο και κατά την ωρίμανση καστανό, συχνά με ερυθρωπές κηλίδες. Η σάρκα της δεν έχει πυραμίδες, είναι αρχικά υπόλευκη και αργότερα ερυθροκαστανή με μεγάλες λευκές διακλαδώσεις που φτάνουν ως την περιφέρεια. Τα σπόρια έχουν χρώμα ανοικτό-κίτρινο. Έχει διάμετρο από 2-7 εκατοστά, ακανόνιστα υποσφαιρικό, ανώμαλο, με εξογκώματα, θυμίζοντας πατάτα. Έχει ευχάριστη οσμή τρούφας, που όσο ωριμάζει γίνεται πιο έντονη και ελαφρά δυσάρεστη, θυμίζοντας εκείνη του σκόρδου.

Διαβίωση

Η τρούφα *T. borchii* έχει ευρεία κατανομή σε όλη την Ευρώπη. Έχει βρεθεί από την Φινλανδία έως τη Σικελία, και από την Ιρλανδία έως την Πολωνία. Απαιτεί εδάφη με pH 7,5-8,0 και ευδοκμεί σε εδάφη που άλλα είδη τρούφας δεν θα επιβίωναν όπως σε ηφαιστιογενή εδάφη, είτε πολύ αμμώδη είτε φτωχά σε άργιλο. Ωστόσο δεν αναπτύσσεται σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1000 μέτρων.

2.5.5 *Tuber melanosporum* (Vittad.)- Τούβερ μελανόσπορος -

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. melanosporum</i>



Εικόνα 27 *T.melanosporum*

Δρογοετυμολογία

Η προέλευση του ονόματος προέρχεται προφανώς από τις ελληνικές λέξεις «μελανός» που σημαίνει «μαύρος» και «σπόρος» λόγω του χρώματος του καρποσώματος.

Δρογοϊστορία

Η τρούφα *T. melanosporum* καλλιεργείται και καταναλώνεται στην Ευρώπη για αρκετούς αιώνες.

Δρογοβοτανική

Η τρούφα *T. melanosporum* περιγράφηκε το 1831 από τον ιατρό και μυκητολόγο Carlo Vittadini στο βιβλίο του «*Monographia Tuberacearum*» (Vittadini, 1831).

Μορφολογία

Συνήθως έχει διάμετρο 5-8 εκ. με βάρος καρποσώματος από μερικά γραμμάρια έως 150g. Τον Ιανουάριο του 1984 στο Furlo της Asqualagna συλλέχθηκε καρπόσωμα «γίγας» με βάρος 1380 g. Το προστατευτικό στρώμα του καρποσώματος (περίδιο) έχει πολυγωνικά εξογκώματα με μια χαρακτηριστική βύθιση στο κέντρο τους. Η σάρκα της είναι μαύρη, οι φλέβες της είναι λευκές αλλά εάν έρθουν σε επαφή με τον αέρα κοκκινίζουν. Επιπλέον, έχει πυκνά ακανθώδη ασκοσπόρια.

Διαβίωση

Έχει βρεθεί από περιοχές της Πορτογαλίας έως τη Τουρκία (Ceruti et al., 2003). Η καλλιέργειά της ξεκίνησε στην περιοχή Perigord της Γαλλίας. Αναπτύσσεται και σε άγωνα, στα οποία δεν αποδίδουν άλλες καλλιέργειες. Χρειάζεται εδάφη με αλκαλικό pH= 7,2-8,2, καλής στράγγιση με ιδανικά τα ασβεστολιθικά, τα ελαφρώς αμμώδη και τα αργιλο-ασβεστώδη. Προτιμητέα η ετήσια βροχόπτωση 600- 900 χιλιοστά και το υψόμετρο 300-1200 μέτρα. Συλλέγεται το διάστημα Νοεμβρίου-Μαρτίου.



Εικόνα 28 Άγαλμα του Joseph Talon στην περιοχή Saint-Saturnin-lès-Apt της Γαλλίας

2.5.6 *Tuber brumale* (Vittad.)-

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. brumale</i>



Εικόνα 29 *T. brumale*

Δρογοετυμολογία

Είναι άγνωστη η προέλευση του ονόματός του.

Δρογοϊστορία

Στο παρελθόν, τα μόνα μανιτάρια που αποκαλούνταν τρούφες στην αγορά της Γαλλίας ήταν οι *T. melanosporum* και *T. brumale* (Martin-Santafe et al. 2014).

Δρογοβοτανική

Η τρούφα *T. brumale* περιγράφηκε το 1831 από τον ιατρό και μυκητολόγο Carlo Vittadini στο βιβλίο του «*Monographia Tuberacearum*» (Vittadini, 1831).

Μορφολογία

Το μέγεθος των καρποφοριών κυμαίνεται από 1εκ. έως 4-7 εκ. μέγιστο και το βάρος τους από 30-100 γρ. Έχει πολύ λεπτό άρωμα, ευχάριστο, που θυμίζει ξύλο ενώ ομοιάζει με τη μελανόσπορη, αλλά επειδή το άρωμά της δεν είναι τόσο έντονο η εμπορική της αξία είναι χαμηλότερη.

Διαβίωση

Απαντάται σε πολλές χώρες (Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία, Γερμανία, Πολωνία, Ουγγαρία, Αγγλία, Ελλάδα). Ζει στα ίδια εδάφη με το *T. melanosporum* αλλά αναπτύσσεται καλά και σε περιοχές με λίγο ασβέστιο και πλούσια σε άργιλο. Οι καρποφορίες εμφανίζονται σε βάθος 5-30 εκ. Αναπτύσσεται σε υψόμετρο 200 - 1000 μέτρων και προτιμά θερμότερο κλίμα. Ωριμάζει και συλλέγεται μέσα Νοεμβρίου έως τέλος Μαρτίου (Zambonelli, 2016).

Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η καλλιέργεια του συγκεκριμένου είδους εκτοπίζει δυνητικά την ανάπτυξη *T. melanosporum* (Benucci et al. 2011; Belfiori et al., 2012), χωρίς μέχρι σήμερα να έχει επαρκώς επαληθευθεί η συγκεκριμένη πληροφορία (Garofoli et al. 1906).

2.5.7 *Tuber mesentericum* (Vittad.)-

Division (Συνομοταξία)	<u>Ascomycota</u>
Class (Τάξη)	<u>Pezizomycetes</u>
Order (Ομοταξία)	<u>Pezizales</u>
Family (Οικογένεια)	<u>Tuberaceae</u>
Genus (Γένος)	<u>Tuber</u>
Species (Είδος)	<i>T. mesentericum</i>



Εικόνα 30 *T. mesentericum*

Δρογοετυμολογία

Είναι άγνωστη η προέλευση του ονόματός του. Αλλιώς ονομάζεται «black truffle of Bagnoli Irpino» από το όνομα της πόλης Bagnoli Irpino, της περιοχής Avellino της Ιταλίας, όπου η συγκεκριμένη τρούφα έχει μεγάλη ιστορία και παράδοση στην καλλιέργεια και στη γαστρονομία (Riousset et al. 2001; Vittadini et al. 1831).

Δρογοϊστορία

Είναι διάσημη στη Βόρεια Γαλλία, όπου είναι ακριβότερη από την *T. aestivum*. Από αυτό το είδος αναδύεται ένα έντονο άρωμα που μοιάζει με πίσσας ή βενζίνης, που δεν είναι ιδιαίτερα ευχάριστο (Riousset et al. 2012; Vittadini et al. 1831).

Μορφολογία

Μοιάζει με την *T. aestivum* και *T. uncinatum*. Η επιδερμίδα της είναι βαθέως καστανού έως μαύρου χρώματος και τα εξογκώματά της αρκετά πεπλατισμένα. Στο εσωτερικό τμήμα, οι φλέβες της είναι λευκές. Τα μυκήλιά τους είναι χνοώδη (εριώδη) με χρώμα υπόλευκο, υποκίτρινο, καστανό έως ερυθρό.

Διαβίωση

Προτιμά τα ασβεστώδη εδάφη με υπό-αλκαλικό και ουδέτερο pH. Συλλέγεται τέλη Σεπτεμβρίου με τέλη Ιανουαρίου.

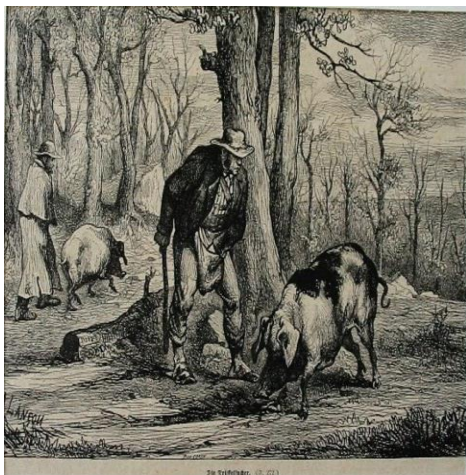
2.6 Χαρακτηριστικά καλλιέργειας τρούφας

Το κάψιμο του δένδρου-ξενιστή

Πριν την περίοδο καρποφορίας του μύκητα παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό κάψιμο της βλάστησης γύρω από το δέντρο, συνήθως μέχρι εκεί που εκτείνεται το ριζικό του σύστημα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην φυτοτοξικότητα των ουσιών που εξέρχονται από τον αναπτυσσόμενο μύκητα. Αποτελεί έναν όχι τόσο ασφαλή δείκτη ύπαρξης τρούφας και παρατηρείται πιο συχνά σε καλλιέργειες *Tuber melanosporum* (Wang et al. 2011).

Η συγκομιδή της τρούφας

Επειδή οι τρούφες δεν έχουν υπέργεια όργανα, ο εντοπισμός τους στη φύση είναι δύσκολος και τις περισσότερες φορές γίνεται τυχαία. Για την εξακρίβωση των τοποθεσιών που αναπτύσσονται, χρησιμοποιούνται στις διάφορες χώρες ενδεικτικά σημάδια, όπως λ.χ. η ειδική χλωρίδα σε δένδρα, η ολοκληρωτική έλλειψη χόρτων γύρω από τα τρουφοφόρα δένδρα, τα σμήνη από κιτρινόχρωμες μύγες (*Helomyza tuberivora* ή *Suillia gigantea*) που πετάνε σε χαμηλό ύψος πάνω από τους υδνότοπους, το ελαφρό ανασήκωμα του χώματος και οι σχισμές της γης στο μέρος όπου φυτρώνουν. Τα πιο ενδεικτικά από όλα τα σημάδια είναι ότι όταν οι τρούφες ωριμάζουν, αναδύουν μια έντονη μυρωδιά που γίνεται αντιληπτή από αρκετή απόσταση από ορισμένα ζώα, όπως χοίρους ή εκπαιδευμένους σκύλους. Συνεπώς, για το κυνήγι της τρούφας χρησιμοποιούνται γουρούνια ή εξασκημένα σκυλιά (π.χ. Labrador retriever, Griffon Korthal, Pointer, Kurzhaar, Lagotto Romagnolo, Epagneul Breton, Springer Spaniel, Cocker Spaniel). Οι αμιγώς κυνηγετικές ράτσες έχουν κατά κανόνα μεγάλη εμβέλεια έρευνας, με εντονότατα ανεπτυγμένη της αίσθηση της όσφρησης. Ειδικότερα οι σκύλοι Lagotto Romagnolo αποτελούν ράτσα χαρακτηριστικής υπακοής και δυνατοτήτων, που εκτράφηκε ειδικά για την ανίχνευση τρούφας.



Εικόνα 31 Κυνήγι τρούφας με γουρούνια



Εικόνα 32 Κυνήγι τρούφας με ειδικά εκπαιδευμένους σκύλους (Παυλίνα Κλαδοπούλου)

2.7 Συντήρηση, διαδικασία , ψύξη

Αφού συλλεχθούν οι τρούφες, απομακρύνεται το μεγαλύτερο μέρος του χώματος και αφήνεται ένα λεπτό στρώμα για την καλύτερη διατήρησή τους. Δεν πρέπει να πλένονται παρά μόνον όταν πρόκειται άμεσα να καταναλωθούν. Μπορούν να πλυθούν και πριν τη συντήρηση, αρκεί να συσκευασθούν και να διατηρηθούν στη συνέχεια υπό κενό. Για διάστημα μιας εβδομάδας μπορούν να διατηρηθούν στο ψυγείο στους 0-4°C. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, έως 6 μήνες, διατηρούνται στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -18 έως -30 °C. Εκείνο που είναι βέβαιο είναι πως ένα μέρος του αρώματος και της γενικότερης εικόνας της τρούφας αλλοιώνεται κατά τη συντήρηση. Έχει αποδειχθεί ότι και η ηπιότερη διαδικασία κατάψυξης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη χημική και οργανοληπτική ταυτότητα της τρούφας άρα και το χαρακτηριστικό της άρωμα που μειώνεται αισθητά.

Η ψύξη είναι η πλέον αποδεκτή μέθοδος διατήρησης της νωπής τρούφας για τη μείωση της μικροβιακής και φυσιολογικής αλλοίωσής της. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως η ακτινοβολή είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους για τη διατήρηση των βιοχημικών της ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μια χαμηλή δόση ακτινοβολίας (1,5K Gy) είναι κατάλληλη καθώς αναστέλλει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Παρά την αποτελεσματικότητά της δεν θεωρείται αποδεκτή από τους καταναλωτές.

Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Package-MAP) είναι μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται για την διατήρηση φρούτων και λαχανικών που αλλοιώνονται εύκολα. Στην τεχνική αυτή η κανονική ατμόσφαιρα έχει αντικατασταθεί από ένα μείγμα αερίων, σε διάφορες συγκεντρώσεις που προστατεύει το προϊόν από αλλοιώσεις που προκαλούνται από την οξείδωση ή τη μικροβιακή ανάπτυξη. Ένα μείγμα από 15% CO₂ και 7% O₂ βρέθηκε ότι παρατείνει την διάρκεια ζωής της νωπής τρούφας *T.melanosporum* μέχρι 28 ημέρες. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι το υψηλό κόστος και η τάση δημιουργίας ενός στρώματος νερού στο εσωτερικό της συσκευασίας που ευνοεί την ανάπτυξη μικροβιακού φορτίου (Culleré et al. 2013).

Η δυσκολία συντήρησης που παρουσιάζεται ίσως είναι ένας από τους λόγους που οι τρούφες αποτελούν ένα από τα πιο ακριβά εδώδιμα προϊόντα στον κόσμο, ενώ η χρήση άλλων καινοτόμων τεχνικών συντήρησης στο κλάδο τεχνολογίας τροφίμων είναι πολυαναμενόμενη και δυνητικά μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος.

2.8 Οικονομικά στοιχεία για τις τρούφες

Ανάμεσα σε όλα τα εδώδιμα μανιτάρια οι τρούφες του γένους *Tuber* παρουσιάζουν υψηλή οικονομική αξία, αφού η τιμή τους ανά kg κυμαίνεται από 55-7.000€ ανάλογα με το είδος.

Η εκτίμηση του μεγέθους αγοράς της τρούφας δεν είναι εύκολη καθώς το προϊόν συνήθως πωλείται απευθείας από τον παραγωγό στον καταναλωτή και γι'αυτό τον λόγο δεν υπάρχουν επίσημα στατιστικά στοιχεία πωλήσεων. Παρά ταύτα, έρευνες σε αγορές τρούφας μπορούν να δώσουν στοιχεία για την αξία του μανιταριού. Λόγου χάριν, βασιζόμενοι στην παραγωγή της Γαλλίας, Ισπανίας και Ιταλίας (χώρες που αφθονεί το *T. melanosporum*) η παραγωγή έφτασε στους 134 τόνους για την περίοδο 1997-98 με μέση αξία τα 15-30 εκ. ευρώ. Προσμετρώντας και τα υπόλοιπα εμπορικά είδη όπως τα: *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. magnatum*, *T. borchii* η αξία πώλησης φθάνει παγκοσμίως τα 100 εκ. € τον χρόνο. Οι υψηλότερες τιμές προέρχονται από τις

φρέσκιες τρούφες που είναι διαθέσιμες μόνο για λίγους μήνες στο Νότιο ημισφαίριο. Επειδή τα φρουτώδη σώματα έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής, παράγονται πολλά προϊόντα τρούφας όπως: έλαιο τρούφας, κονσέρβες συντηρημένης τρούφας, βούτυρο, αλάτι, μέλι, ρατέ, τυρί και λουκάνικα αρωματισμένα με τρούφα. Επειδή όμως το άρωμα της τρούφας είναι πολύ ευαίσθητο, όλα αυτά τα προϊόντα δεν φτάνουν ποτέ τον πλούτο των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (οσμή και γεύση) της φρέσκιας τρούφας.

<i>T. magnatum</i>	1500-4000€/Kg
<i>T. melanosporum</i>	600-1000€/Kg
<i>T. uncinatum</i>	300-600€/Kg
<i>T. aestivum</i>	250-400€/Kg
<i>T. brumale</i>	300-600€/Kg
<i>T. borchii</i>	250-300€/Kg
<i>T. mesentericum</i>	55-350€/Kg

Πίνακας 1: Πίνακας τιμών διακίνησης τρούφας που καλλιεργείται ή θηρεύεται εντός Ελλάδος ετος 2018 (Άγρια μανιτάρια)

2.9 Έλαια με άρωμα τρούφας

Τα τελευταία χρόνια, τόσο στην εγχώρια όσο και στη διεθνή αγορά παρατηρείται αύξηση στα προϊόντα τρούφας. Τα πρώτα προϊόντα που εμφανίστηκαν ήταν τα έλαια με άρωμα τρούφας, τα οποία είτε αναγράφουν ότι έχουν «άρωμα τρούφας» είτε αναγράφουν συγκεκριμένα το είδος τρούφας που προσπαθούν να μιμηθούν, που συνήθως είναι τα *T. magnatum*, *T. melanosporum*.



Εικόνα 33 Προϊόντα τρούφας

Εκτός από τα έλαια τρούφας, στην αγορά βρίσκονται πλέον και άλλα προϊόντα όπως αλάτι με κομμάτια τρούφας, πατέ τρούφας, φουά-γκρα με τρούφα, μπαλσαμικό λευκής τρούφας, μέλι ακακίας με τρούφα, βούτυρο με τρούφα, chips με τρούφα, κρέμα πορτσίνι με λευκή τρούφα, σάλτσα τομάτας με τρούφα και πατέ ελιάς με τρούφα.

Το άρωμα των τρουφών έχει μελετηθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες και οι χαρακτηριστικές ενώσεις για τις πιο δημοφιλείς τρούφες, *T. magnatum* και *T. melanosporum*, έχουν γίνει γνωστές στην

επιστημονική κοινότητα. Το dimethylsulfide έχει ταυτοποιηθεί στις τρούφες *T. magnatum*, *T. melanosporum* και *T. aestivum* (Culleré et al., 2010; Gioacchini et al., 2008), και η χαρακτηριστική ένωση 2,4-dithiapentane στη *T. magnatum*. Έτσι, οι εταιρείες χρησιμοποίησαν την συνθετική αρωματική ουσία 2,4-dithiapentane ως αρωματικό σε έλαια τρούφας επειδή είναι φθηνή, ευδιάλυτη σε έλαια και σταθερή, έχει δυνατή μυρωδιά και χαμηλή τοξικότητα. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, τα έλαια τρούφας παράγονται με την προσθήκη συνθετικών αρωματικών ουσιών σε παρθένο ελαιόλαδο (Pacioni et al., 2014). Σε μερικές περιπτώσεις οι παραγωγοί των ελαίων τρούφας χρησιμοποιούν την ουσία 2,4-dithiapentane σε υπερβολικές συγκεντρώσεις έτσι ώστε να δυναμώσουν το άρωμα των προϊόντων. Έχει παρατηρηθεί ότι η συγκεκριμένη ουσία προστίθεται και σε προϊόντα που αναγράφουν άλλα είδη τρούφας (*T. melanosporum* και *T. aestivum*) στην συσκευασία τους, παρ'όλο που αυτά τα είδη έχουν εντελώς διαφορετικό άρωμα. Τα προϊόντα τρούφας και τα χημικά πρόσθετα, υπακούουν τον Κώδικα τροφίμων και Ποτών και τους νόμους της Ευρωπαϊκής Ένωσης που εξασφαλίζουν ότι οι ουσίες αυτές είναι ασφαλείς και κατάλληλες για βρώση και ανθρώπινη χρήση (Pacioni et al., 2014; Torregiani et al., 2017).

2.10 Χημική σύσταση της τρούφας

Τα κύρια συστατικά της τρούφας είναι πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπαρά οξέα, ένζυμα, βιταμίνες, μέταλλα, φαινολοξέα και στερόλες, σύμφωνα με τις πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Ανόργανα συστατικά

Παρόλο που οι τρούφες διαφέρουν αναλόγως το είδος, την περιοχή και το μικροβίωμά τους, υποστηρίζεται ότι ως τροφή περιέχει όλα τα απαραίτητα για τον οργανισμό μέταλλα και ιχνοστοιχεία σε υψηλά επίπεδα όπως κάλιο, φώσφορο ασβεστίου, μαγνησίου, νατρίου, σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου και μαγγανίου (Harki et al., 2006; Xiao et al., 2015).

Υδατάνθρακες

Οι εκτομυκορριζικοί μύκητες, όπως οι τρούφες, έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να μεταβολίζουν ταχέως τους υδατάνθρακες που λαμβάνουν μέσω της συμβίωσής του με το εκάστοτε φυτό. Στο είδος *T. melanosporum* πραγματοποιήθηκε μελέτη σε μυκήλια και καρποσώματα όπου ταυτοποιήθηκαν η μανιτόλη και η τρεχαλόζη (Ceccaroli et al., 2011). Μελέτη που διενεργήθηκε στα καρποσώματα του είδους *T. melanosporum* ταυτοποιήθηκαν οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη, μαννόζη και ραμνόζη και οι άμινο-μονοσακχαρίτες γλυκοζαμίνη και ουρονικά οξέα (Harki et al., 2006). Επιπλέον, στο είδος *T. aestivum* έχουν απομονωθεί τα σάκχαρα α- και β-γλυκόζη (Mannina et al., 2004).

Πρωτεΐνες

Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο είδος *T. aestivum* απομονώθηκαν τα αμινοξέα βαλίνη, αλανίνη, ισολευκίνη, γλουταμίνη, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ (Mannina et al., 2004). Επιπλέον, στο είδος *T. melanosporum* ταυτοποιήθηκαν τα αμινοξέα προλίνη, λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη, αιθανολαμίνη, μεθιονίνη, κυστίνη, κυστεΐνη και το ασπार्टικό οξύ (Harki et al., 2006).

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν απομονωθεί αρκετά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσεως και πρωτεΐνες σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου ζωής της τρούφας. Στο καρπόσωμα του είδους *T. dryophilum* απομονώθηκε η λεκτίνη-1 (TDF-1) που είναι υπεύθυνη για την διαλογή και κατανομή των βακτηρίων κατά την διάρκεια του σχηματισμού τους καρποσώματος. Στα μυκήλια και στο καρπόσωμα του είδους *T. melanosporum* απομονώθηκε το ένζυμο invertase (TmINV) που σχετίζεται με την υδρόλυση της σακχαρόζης σε

φρουκτόζη και γλυκόζη. Στα μυκήλια του είδους *T. borchii* απομονώθηκε το ένζυμο mannitol dehydrogenase (TbMDH) που έχει συνδεθεί με την αναγωγή της φρουκτόζης και την οξείδωση της μανιτόλης. Στα μυκήλια του ίδιου είδους απομονώθηκε το ένζυμο glutamate dehydrogenase (GDH) που ευθύνεται για τον αρχικό μεταβολισμό του αζώτου αναλόγως τις πηγές αζώτου που είναι διαθέσιμες. Στα μυκήλια του είδους *T. borchii* απομονώθηκε το ένζυμο Homologue of the blue-light photoreceptor (TbWC-1) που προφυλάσσει τα μυκήλια έτσι ώστε να αναπτύσσονται μακριά από την υπαρκτή φωτός (Zambonelli, 2016).

Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο είδος *T. melanosporum* σε καρποσώματα που βρίσκονταν σε διαφορετικό στάδιο του κύκλου ζωής τους, ταυτοποιήθηκαν μεταβολικά ένζυμα του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και η ουσία ανανδαμίδη. Ο λόγος που κινητοποίησε τους ερευνητές σε αυτή την έρευνα και ταυτοποίηση είναι η ύπαρξη της μελανίνης, διότι η μελανίνη είναι προϊόν σύνθεσης της ανανδαμίδης σε φυσιολογικά κύτταρα της επιδερμίδας του ανθρώπου (Pacioni et al., 2015).

Λιπίδια-λιπαρά οξέα

Πραγματοποιήθηκε στο είδος *T. aestivum* όπου απομονώθηκαν τα λιπαρά οξέα παλμιτικό οξύ και στεαρικό οξύ (Mannina et al., 2004). Στη μελέτη των εξανικών εκχυλισμάτων στα είδη *T. aestivum*, *T. uncinatum* και *T. melanosporum* ταυτοποιήθηκαν τα λιπαρά οξέα παλμιτικό οξύ, στεαρικό οξύ, ολεϊκό οξύ και λινολεϊκό οξύ, με υψηλότερη συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο *T. melanosporum* (Angelini et al., 2015). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο είδος *T. melanosporum* παρατηρήθηκε πως κατά την διάρκεια της ωρίμανσης της τρούφας, τα γλυκολιπίδια και λιπαρά οξέα αυξήθηκαν κατά 31% και 13% αντίστοιχα, ενώ το επίπεδο των φωσφολιπιδίων μειώθηκε κατά 41.4%. Τα γλυκερίδια αποτελούνταν κυρίως από τριγλυκερίδια (63-68%), διγλυκερίδια (29-35%) και μονογλυκερίδια (2-3%).

Στερόλες

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε καρποσώματα και σε καλλιέργειες μυκηλίων των ειδών *T. sinense*, *T. aestivum*, *T. indicum*, *T. himalayense*, *T. borchii*, *T. melanosporum* ταυτοποιήθηκαν οι στερόλες: χοληστερόλη, μπρασικαστερόλη, εργοστερόλη, 5-διυδροστερόλη, καμπεστερόλη, στιγμαστα-7,24(28)-διενόλη, λανοστερόλη, β-σιτοστερόλη (Tang et al., 2012). Επιπροσθέτως, στο είδος *T. aestivum* απομονώθηκαν οι στερόλες εργοστερόλη και μπρασικαστερόλη (Mannina et al., 2004).

Φαινολικά οξέα

Στο είδος *T. melanosporum* ταυτοποιήθηκαν τα: p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το o- υδροξυβενζοϊκό οξύ (σαλικυλικό οξύ), το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (γεντισικό οξύ) και το γαλλικό οξύ (Savini et al., 2017).

Χρωστικές

Διενεργήθηκε μελέτη στο καρπόσωμα του είδους *T. melanosporum* όπου ταυτοποιήθηκε η μελανίνη (Harki et al., 2006).

Πτητικά συστατικά

Το άρωμα της τρούφας επηρεάζεται από βιωτικούς και αβιωτικούς παράγοντες. Εκτός από την ωριμότητα του φρούτωσης σώματος της τρούφας (Molinier et al. 2015), το είδος (Splivallo et al. 2015), ο γονότυπος (Ney et al. 1980) και η μικροβιακή χλωρίδα (Talou et al. 1987), το διατροφικό

περιεχόμενο του εδάφους και η συμβίωση με το εκάστοτε δένδρο συμβάλλουν σημαντικά σε αυτό.

Τα πτητικά που δίνουν τη χαρακτηριστική αυτή οσμή είναι αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, αρωματικοί άνθρακες και θειούχες ενώσεις (Bellesia et al., 1998; Díaz et al., 2003; Mauriello et al., 2004; Pelusio et al., 1995).

Τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετοί ερευνητές έχουν αναλύσει τις πτητικές ενώσεις διαφόρων ειδών τρούφας χρησιμοποιώντας κυρίως την τεχνική Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) (Culleré et al. 2010; Piloni et al. 2005) και την τεχνική Direct Headspace Analysis (DHA) (Splivallo et al. 2015). Με την μέθοδο Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) τα σημαντικότερα πτητικά συστατικά στο *T.melanosporum* ήταν: 2,3-butanedione, ethylbutyrate, dimethylsulphide, 3-methyl-1-butanol, 3-ethyl-5-ethylphenol.

Με την μέθοδο Dynamic head-space (March et al., 2006) ανιχνεύθηκαν οι παρακάτω ουσίες ως χαρακτηριστικές για το κάθε ένα από τα παρακάτω είδη:

- *T. aestivum*: acetic acid, 2-methylbutyl ester
- *T. menalosporum*: pentanoic acid, 4-methyl-, ethyl ester
- *T. mesentericum*: 3-methylbutanal
- *T. brumale*: butanoic acid, 1-methylpropyl ester

Επιπλέον, το *T.borchii* που μελετήθηκε από (Buzzini et al. 2005) έδειξε ότι σημαντικό ρόλο στο άρωμα είχαν τα θειοφαινικά παράγωγα και οι κυκλικές θειώδεις ουσίες, που όμως προέρχονταν από το μικροβίωμα της τρούφας. Έτσι, έγινε σαφές πως το μικροβίωμα της τρούφας είναι ένας εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας στο άρωμά της, που διεγείρει την ανθρώπινη όσφρηση. Τα φρουτώδη σώματα της τρούφας αποκαλούνται «hotspot» μικροβιακής ποικιλίας και αποικίας βακτηρίων (Pacioni et al. 2007), ζυμομυκήτων (Stielow et al. 2010), νηματωδών μυκήτων (Vahdatzadeh et al. 2015), και πιθανώς ιών (Buzzini et al. 2005). Τα βακτήρια είναι το κυρίαρχο σύνολο στο μικροβίωμα της τρούφας (Martin et al. 2010). Η παρουσία των βακτηρίων και ο ρόλος τους μελετώνται σχολαστικά αρκετό καιρό.

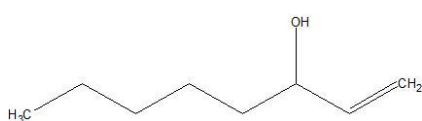
Ζυμομύκητες που συλλέχθηκαν από *T.melanosporum* και *T.magnatum* και αναπτύχθηκαν σε L-methionine, παρήγαγαν κάποιες χαρακτηριστικές ενώσεις του αρώματός τους. Έτσι υπέθεσαν οι ερευνητές, ότι το μικροβίωμα στην επιφάνεια της τρούφας είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το άρωμά της (Splivallo et al. 2015). Ταυτοχρόνως, έρευνα στο γονιδίωμα του *T.melanosporum* έδειξε ότι η τρούφα πιθανώς έχει όλα τα μοριακά εφόδια ώστε να παράγει τα πτητικά της μόνη της (Vahdatzadeh et al. 2015). Έτσι, ο Antony-Babu et al. χρησιμοποίησε ως μοντέλο το *T.borchii* για να μελετήσει την παραγωγή των θειικών ουσιών που το χαρακτηρίζουν. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην άποψη ότι μια άγνωστη πρόδρομη ένωση μεταβολίζεται σε πτητικά θειοφαινικά παράγωγα, μόνο από τα βακτήρια και όχι από το μυκήλιο ή τους ζυμομύκητες. Έτσι κατέληξε ότι τα πτητικά συστατικά της τρούφας θα μπορούσαν να δημιουργούνται και από το μικροβίωμα που διαβιεί στο φρουτώδες σώμα της τρούφας (Gioacchini et al., 2008; Vita et al., 2015). Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί πως το μικροβίωμα της τρούφας μεταβάλλεται με την ωρίμανση του φρουτώδους σώματός του (Martin et al., 2010).

Τα θειικά πτητικά συστατικά στο άρωμα της τρούφας πιθανώς να προκύπτουν από τον καταβολισμό της L-methionine σε DMS, dimethyl disulfide (DMDS), dimethyl trisulfide (DMTS) (Hazelwood et al. 2008), όπου η L-methionine μετατρέπεται σε methanethiol από την C-S lyase. Έπειτα, η methanethiol αποσυντίθεται σε DMS, DMDS. Παρόλα αυτά, υπάρχουν έρευνες που αμφιβάλλουν ακόμα και για το ρόλο της L-methionine ως πρόδρομης ένωσης και θεωρούν πως η εικόνα της παραγωγής πτητικών θειούχων είναι ακόμη ανολοκλήρωτη (Splivallo et al. 2012).

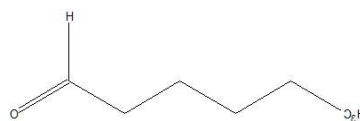
Άλλες σημαντικές για το άρωμα ενώσεις, που συμμετέχουν σε πολλά είδη τρούφας, είναι διακλαδισμένης αλυσίδας και αρωματικοί υδρογονάνθρακες όπως 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal. Αυτές οι ουσίες πιθανώς προκύπτουν από τον καταβολισμό συγκεκριμένων αμινοξέων μέσω του μονοπατιού Ehrlich (Combet et al. 2006). Μελέτη σε μυκήλια

T.borchii και *T.melanosporum* που έχουν αναπτυχθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα ισολευκίνης, παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες 2-methylbutanal και 2-methylbutanol, ενώ εκείνα που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα λευκίνης παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ουσίες 3-methylbutanal και 3-methylbutanol (Brodhun et al. 2010).

Εξίσου ουσιώδη πτητικά συστατικά, που συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ των τρουφών, είναι οι ουσίες με **8-άνθρακες** (C-8 πτητικές ενώσεις). Αυτές οι ενώσεις έχουν συνδεθεί με το άρωμα των μανιταριών (Combet et al., 2006). Η πιο γνωστή είναι η 1-octen-3-ol που παρουσιάζεται σε 2 στερεοϊσομερή (R και S). Σύμφωνα και με άλλους μύκητες, η R μορφή παράγεται σε μεγαλύτερο βαθμό και το ίδιο πιθανολογείται και για τις τρούφες, παρόλο που δεν έχει εξακριβωθεί (Brodhun et al. 2010). Στους μύκητες γενικότερα, η 1-octen-3-ol συντίθεται από το λινολεϊκό οξύ, που αποτελεί το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στο *T.melanosporum* (Garscha et al. 2009). Μελέτη στο γονιδίωμα του *T.melanosporum* υποστηρίζει ότι δυο εκδοχές του ενζύμου Ppo βρίσκεται στις τρούφες (Giovanni Pacioni et al., 2015). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταβολίζει το λινολεϊκό οξύ και οδηγεί στην παραγωγή της ουσίας 1-octen-3-ol.



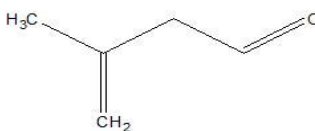
Εικόνα 34 1-octen-3-ol



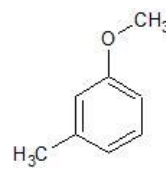
Εικόνα 35 hexanal



Εικόνα 36 dimethylsulfide



Εικόνα 37 3-methylbutanal



Εικόνα 38 3-methylanisole

2.11 Βιολογικές δράσεις

Αντιβακτηριακή δράση

Το μεθανολικό εκχύλισμα των *T.aestivum*, *T.borchii* και *T. brumale* έδειξε σημαντική αντιβακτηριακή δράση ενάντια στο είδος των στρεπτομυκήτων *S. griseus subsp. griseus*, *S. anulatus*, *S. albus subsp. albus*, *S. parvus*, *S. prasineus*, *S. virginiae* (Angelini et al. 2010).

Αντιφλεγμονώδης δράση

Μελέτη σχετικά με την αναστολή των COX-1 και 12-LOX από το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα του *T.aestivum*, δεν παρουσίασε ισχυρά αποτελέσματα (Beara et al. 2014).

Αντιοξειδωτική δράση

Έρευνα που διεξήχθη στο *T.aestivum* εμφάνισε αντιοξειδωτική δράση. Αυτή η δράση προκύπτει από την πληθώρα πολυσακχαριτών που περιέχονται στο είδος όπως γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και μαννόζη (Devshri et al. 2017). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο ίδιο είδος, απομονώθηκε ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείτο από γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και μαννόζη και απέδωσε υψηλή in vitro αντιοξειδωτική δράση (Bhotmange et al. , 2017).

Σε πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριο μας, εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση τα αιθανολικά εκχυλίσματα των τρουφών *T. aestivum* και *T. melanosporum*, με την μέθοδο Rancimat, όπου παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, και ιδιαίτερα τον εκχύλισμα του είδους *T. aestivum* (Πανουκλιάς, 2013).

Αντιμεταλλαξιογόνος δράση

Έρευνες έχουν γίνει στην *T.aestivum* από την Ιταλία για να διαπιστωθεί η ύπαρξη αντιμεταλλαξιογόνων παραγόντων. Με την εξέταση AMES ερευνήθηκε η πιθανή δραστικότητα σε δείγμα ακτινοβολημένης και φρέσκιας τρούφας (1,5kGy). Για τον προσδιορισμό αυτό, σε ένα μείγμα από ένα μεταλλαξιογόνο πρότυπο, ένα εκχύλισμα τρούφας και μια βακτηριακή καλλιέργεια (*Salmonella typhimurium*) ιστιδίνη με στελέχη TA98 και TA100, βρέθηκε ότι το αιθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα της φρέσκιας καθώς και της ακτινοβολημένης τρούφας είχαν ανασταλτικά αποτελέσματα έναντι των πρότυπων μεταλλαξιογόνων. Τα υδατικά εκχυλίσματα από νωπές τρούφες έδειξαν μια ισχυρότερη ανασταλτική δράση κατά του TA98, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες (Fratiannei et al., 2007).

Δράση έναντι άλλων φυτών

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των μεθανολικών εκχυλισμάτων των ειδών *T.aestivum*, *T.magnatum*, *T.melanosporum*, *T.borchii*, έναντι της ανάπτυξης άλλων φυτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αναλόγως της συγκέντρωσης εκχυλίσματος επηρεαζόταν το ύψος του σπορόφυτου και το μήκος της ρίζας των φυτών (Angelini et al., 2010).

3. Μανιτάρια Ελληνικής και Πολωνικής προέλευσης

Τα μανιτάρια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα *Amanita caesarea*, *Marasmius oreades* και *Craterellus cornucopioides* που είναι ελληνικής προέλευσης και τα μανιτάρια *Boletus edulis* και *Macrolepisma procera* που είναι Πολωνικής προέλευσης.

3.1 Μανιτάρια Ελληνικής προέλευσης

3.1.1 *Amanita caesarea* (Scop.) - Αμανίτης ο καισαρικός

Division (Συνομοταξία)	Basidiomycota
Class (Τάξη)	Agaricomycetes
Order (Ομοταξία)	Agaricales
Family (Οικογένεια)	Amanitaceae
Genus (Γένος)	<i>Amanita</i>
Species (Είδος)	<i>A. caesarea</i>



Εικόνα 39 *Amanita caesarea*

Δρογοετυμολογία

Ο Αμανίτης ο καισαρικός είναι ένα ευρέως γνωστό μανιτάρι γνωστό με τις κοινές ονομασίες Κοκκινούσκα, Πιπερούσκα, Νερατζάκι, Αυγό, Αυγούτα, Αυγαμηλάκι, Γενιτσάρα, Καισαρίτης, Αυτοκρατορίνα και Τσερβενούσκα (Λέγγερης et al. 2014). Το κοινό όνομά του έχει προέλευση από τα χρόνια της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας γιατί ήταν το αγαπημένο μανιτάρι του Ρωμαίου αυτοκράτορα Claudius (Marley et al. 2010). Οι Ρωμαίοι το ονόμασαν *Boletus*, που προέρχεται από τον αρχαίο ελληνικό βωλίτη, όπως είχε ονομαστεί αυτός ο μύκητας από τον Γαληνό (Ramsbottom et al. 1953).

Δρογοβοτανική

Η πρώτη επιστημονική καταγραφή του μανιταριού είναι αυτή του Ιταλού μυκητολόγου Giovanni Antonio Scopoli το 1772, που το κατέταξε ως *Agaricus caesareus* (Scopoli et al. 1772). Κατατάχθηκε στο γένος *Amanita* (Persoon et al. 1801). Η εμπορική του αξία έγινε σημαντική κατά τον 20^ο αιώνα (Poe et al. 2009).

Μορφολογία

Χαρακτηρίζεται από έναν πορτοκαλέρυθρο πύλο. Η επιφάνειά του είναι μαλακή και μπορεί να φτάσει τα 15-20cm διάμετρο. Τα ελεύθερα βράγχια είναι λευκά έως χρυσοκίτρινα, όπως και ο στύπος, ο οποίος έχει ύψος 8-15cm και πλάτος 2-3cm. Η βάση του στύπου είναι παχύτερη από την κορυφή και τα σπόρια του είναι λευκά (Breitenbach et al., 1995).

Διαβίωση

Διαβιεί στην Νότια Ευρώπη, δηλαδή στα Βαλκάνια και στην Ουγγαρία (WeiHong et al., 2003), στη Βόρεια Αφρική, στο Μεξικό, στην Ινδία και στην επαρχία Sichuan της Κίνας (Valentão et al. 2005).

Χημική σύσταση

Έχουν ταυτοποιηθεί το μηλικό και ασκορβικό οξύ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ έπονται το κιτρικό οξύ, κετογλουταρικό οξύ, φουμαρικό οξύ, σικιμικό οξύ και ίχνη του σουκινικού οξέως (Acosta-Martínez et al. 2007; Romaní et al. 2006). Επιπλέον, έχει απομονωθεί η εργοστερόλη (Konkol et al. 2010). Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε τουρκικό δείγμα του είδους παρατηρήθηκε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε σίδηρο, ψευδάργυρο και μαγγάνιο και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν τα μέταλλα κάδμιο, μόλυβδος, χαλκός, χρώμιο, νικέλιο και κοβάλτιο (Sarikurkcu et al., 2010). Έχει υποβληθεί σε εξέταση Ολικών Φαινολικών και απέδωσε 10,08mgGAE/gr ξηρής δρόγης και σε εξέταση Ολικών Φλαβονοειδών και απέδωσε 0,91mg/g ξηρής δρόγης (Βασδέκης, 2013).

Επιπροσθέτως, έχει πραγματοποιηθεί προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και μετάλλων καθώς και ταυτοποίηση πτητικών συστατικών σε ελληνικό δείγμα (Ouzouni, 2009).

Rt	RI	Ένωση	<i>A.caesaria</i> %
1,45	759	Ακεταλδεΐδη	4,15
2,07	826	2-προπανόνη	1,07
2,29	852	1-οκτένιο	1,72
3,35	933	3-μεθυλ-βουτανάλη	2,97
3,87	957	2,2,4,6,6-πενταμεθυλ-επτάνιο	-
4,14	969	Κυκλοοκτάνιο	-
6,67	1065	2-βουτενάλη	0,25
7,78	1102	Εξανάλη	1,16
9,22	1160	p-ξυλόλιο	0,22
10,32	1204	2-επτανόνη	-
10,56	1216	Λεμονένιο	-
10,91	1229	3-μεθυλ-1-βουτανόλη	0,80
12,08	1278	3-οκτανόνη	41,71
12,45	1294	p-κουμόλιο	0,81
12,74	1306	C3-βενζόλιο	0,17
12,81	1309	2-οκτανόνη	-
12,93	1314	Οκτανάλη	1,10
13,25	1326	1-οκτεν-3-όνη	1,10
13,58	1340	2-επτανόλη	-
14,13	1363	6-μεθυλ-5-επτεν-2 όνη	0,32
14,42	1375	1-εξανόλη	0,12
15,40	1416	3-οκτανόλη	8,45
15,50	1419	Νονανάλη	0,51
16,33	1454	Κινναμωμικό οξύ	-
16,40	1457	2-οκτενάλη	0,22
16,80	1473	1-οκτεν-3-όλη	31,23
18,72	1557	Βενζαλδεΐδη	0,18
19,30	1583	1-οκτανόλη	0,46
20,49	1643	2-δεκέν-1-όλη	-
22,90	1781	Αζουλένιο	1,09
27,04	>2000	p-ανισαλδεΐδη	0,17

Βιολογικές δράσεις

Σε πρόσφατη μελέτη εξετάστηκε η βιωσιμότητα (%) των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων πνεύμονα A549 υπό την επίδραση μεθανολικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 20mg/ml, όπου του μεθανολικό εκχύλισμα του *A. caesarea* είχε υψηλή κυτταροτοξική δράση με απόδοση 11,62% και

IC50 3.36 (Βασδέκης, 2013). Εμφάνισε επίσης (μεθανολικό εκχύλισμα) αντιοξειδωτική δράση 79,4% σε έλεγχο DPPH (Sarikurkcu et al., 2010).

3.1.2 *Marasmius oreades* (Bolton)- Μαράσμιος των νυμφών

Division (Συνομοταξία)	Basidiomycota
Class (Τάξη)	Agaricomycetes
Subclass:	Hymenomycetes
Order (Ομοταξία)	Agaricales
Family (Οικογένεια)	Marasmiaceae
Genus (Γένος)	<i>Marasmius</i>
Species (Είδος)	<i>M. oreades</i>



Εικόνα 40 *Marasmius oreades*

Δρογοετυμολογία

Το ελληνικό όνομα του είδους πιθανώς προέκυψε από τις Ορειάδες Νύμφες της Αρχαιοελληνικής Μυθολογίας που κατοικούσαν και προστάτευαν τα όρη.

Δρογοβοτανική

Ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τον βοτανολόγο Bolt James Bolton το 1836.

Μορφολογία

Ο πύλος του *Marasmius oreades* έχει διάμετρο από 2-5 εκατοστά, με σχήμα αρχικά καμπανόμορφο, σχεδόν επίπεδο αργότερα, με αμβλεία θηλή, με λιπαρή επιδερμίδα, λείο, σε αποχρώσεις του ωχρό-πορτοκαλί, ωχρό-καφετί σε υγρό καιρό και ωχρό-κρεμ σε ξερό περιβάλλον, περίμετρο συχνά οδοντωτή. Ο στύπος έχει ύψος 4-8 και διάμετρο 0,2-0,6 εκατοστά, κυλινδρικό, σκληρό, ελαστικό και εύκαμπτο, συχνά στριφτό, λευκό στη κορυφή, ωχρό-καφετί με λευκό μυκήλιο. Το καρπόσωμα του είναι λευκό με ήπιο ευχάριστο άρωμα μανιταριού και με γεύση που θυμίζει καρύδι. Το αποτύπωμα των σπόρων έχει χρώμα λευκό.

Διαβίωση

Το κοινό, εδώδιμο *Marasmius oreades* έχει βρεθεί σε Ελλάδα, Ρωσία, Σουηδία, Ινδία (Halling 1983) και στις ΗΠΑ (Ayer et al., 1989). Καρποφορεί σχεδόν όλο το χρόνο, σε λιβάδια, ανάμεσα στο χορτάρι, σε ξέφωτα, σε άκρες δασών, σε ομάδες πολλών ατόμων και σχηματίζουν μεγάλους κύκλους (fairy ring).



Εικόνα 41 Fairy ring του είδους

Χημική σύσταση

Στον μύκητα *Marasmius oreades* έχουν ταυτοποιηθεί τα σάκχαρα τρεαλόζη, μανιτόλη και

μελεζιτόζη, τα λιπαρά οξέα παλμιτικό οξύ, ολεϊκό οξύ και λινολεϊκό οξύ (Ayer et al. 1978). Έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί (NMR) οι ουσίες marasmone, anhydromarasmone, isomarasmone, dihydromarasmone (Ayer et al. 1989) και agrocycin (Queirós et al., 2009). Έχει εμφανίσει επίσης ολικές τοκοφερόλες 1,55μg/g δρόγης, ολικά φλαβονοειδή 2,26g/100g δρόγης και ολικά καροτενοειδή σε συνολικό ποσοστό 1,99g/100g δρόγης (Ayer et al., 1989).

Βιολογικές δράσεις

Έχει παρουσιάσει πολύ χαμηλή αντιμικροβιακή δράση (Ruimi et al. 2010), ωστόσο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα του, χωρίς παράλληλη τοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7, ενώ έχει παρατηρηθεί και αναστολή των TNF-α (Palacios et al. 2011).

Η ουσία agrocycin που απομονώθηκε από το είδος *Marasmius oreades* παρουσίασε φυτοτοξική δράση (Queirós et al., 2009) γεγονός που δικαιολογεί ότι στις περιοχές που αναπτύσσεται το συγκεκριμένο μανιτάρι υπάρχει χαρακτηριστική μείωση της χλόης και όποιας φυτικής ανάπτυξης γύρω του (Warren et al. 1992).

3.1.3 *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers.-Κρατηρίσκος ο αμαλθοκερατοειδής

Division (Συνομοταξία)	Basidiomycota
Class (Τάξη)	Agaricomycetes
Order (Ομοταξία)	Cantharellales
Family (Οικογένεια)	Cantharellaceae
Genus (Γένος)	<u><i>Craterellus</i></u>
Species (Είδος)	<i>C. cornucopioides</i>



Εικόνα 42 *Craterellus cornucopioides*

Δρογοετυμολογία

Το διαδεδομένο *Craterellus cornucopioides* με τις κοινές ονομασίες Μαύρη τρομπέτα, Τρομπέτα των νεκρών, Κέρας της Αμάλθειας, Κέρας της αφθονίας. Τα ελληνικά ονόματα του είδους έχουν προκύψει από την Ελληνική Μυθολογία διότι θυμίζει το κέρας της Αμάλθειας.

Δρογοβοτανική

Το είδος *Craterellus cornucopioides* ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τον μυκητολόγο Christiaan Hendrik Persoon.

Μορφολογία

Έχει σχήμα χωνιού, βαθύ που μοιάζει με κρατήρα, με κυματιστή περίμετρο, η διάμετρος του κυμαίνεται από 4-8cm και το ύψος του 4-10cm. Η εσωτερική επιφάνεια του έχει αυλακώσεις και έχει χρώμα μαύρο ή σκούρο φαιό (γκρι). Το υμένιο (η εξωτερική του επιφάνεια) είναι γκρίζα,

καστανόφαιο, λεία ή λιγότερο ομαλή. Ο στύπος είναι κούφιος, φαιός και λεπταίνει ελαφρώς προς τη βάση. Η σάρκα του είναι πολύ λεπτή, εύθραυστη, με αρωματική οσμή και ήπια γεύση. Το αποτύπωμα των σπόρων έχει λευκό χρώμα.



Διαβίωση

Καρποφορεί φθινόπωρο και χειμώνα, κυρίως σε δάση πλατύφυλλων αλλά και κωνοφόρων δένδρων όπως Δρυς και Οξιές, σε υγρά και βαριά ασβεστολιθικά εδάφη, σε πολύ μεγάλες ομάδες. Διαβιεί στην Νότια Αμερική, την Ευρώπη, Κορέα και Ιαπωνία.

Χημική σύσταση

Έχουν ταυτοποιηθεί σάκχαρα με κυρίαρχη ουσία την μανιτόλη με 10,67g/100g δρόγης, λιπαρά οξέα με κύριο το ελαϊκό οξύ ενώ ακολουθούν τα: παλμιτικό, στεατικό και λινελαϊκό. Σε εξέταση Ολικών Φαινολικών με καμπύλη αναφοράς του Γαλλικού οξέος, εμφάνισε συγκέντρωση 118,78μg/g δρόγης (Queirós et al. 2009). Έχει εμφανίσει ολικές τοκοφερόλες εκπεφρασμένες σε β-Tocopherol 1,55μg/g δρόγης, ολικά καροτενοειδη εκπεφρασμένα σε β-carotene 12,77μg/g δρόγης, ολικά φλαβονοειδή 1,71mg/g δρόγης και λυκοπένιο 5,13μg/g δρόγης (Queirós et al., 2009).

Βιολογικές δράσεις

Σε μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού(80%) εκχυλίσματος του είδους με συγκέντρωση 5,71mg/ml έναντι της αντιοξειδωτικής ρίζας DPPH απέδωσε κατά 0.92% και EC50 >40. Σε μελέτη κυτταροτοξική δράσης (μεθανολικού κεχυλίσματος) έναντι επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 σε συγκέντρωση 20mg/ml, έδειξε υψηλή κυτταροτοξική δράση 1,94% και IC50 <1 (Βασδέκης, 2013).

3.2 Μανιτάρια πολωνικής προέλευσης

3.2.1 *Boletus edulis* (Bull.)- Βωλίτης ο εδώδιμος

Division (Συνομοταξία)	Basidiomycota
Class (Τάξη)	Agaricomycetes
Order (Ομοταξία)	Boletales
Family (Οικογένεια)	Boletaceae
Genus (Γένος)	<i>Boletus</i>
Species (Είδος)	<i>B. edulis</i>



Εικόνα 43 *Boletus edulis*

Δρογοετυμολογία

Το όνομα του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «Βωλίτης» που σημαίνει «κομματι γής» και το *edulis* -> *ρ. εσθίω* -> έδομαι= τρώω. Ο πρώτος που τον ονόμασε Βωλίτη ήταν ο Γαληνός, που τον θεωρούσε ανώτερο είδος από όλο το βασίλειο των μυκήτων. Οι κοινές του ονομασίες είναι Βασιλομανιτάρο και Καλογεράκι (Ελληνικά), Porcino (Ιταλικά), Steinpilz (Γερμανικά).

Δρογοβοτανική

Ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Γάλλο Pierre Bulliard το 1872.

Μορφολογία

Ο πίκος του μύκητα έχει διάμετρο 7-20cm, το σχήμα του είναι αρχικά ημισφαιρικό, κυρτό και στην ωριμότητά του σχεδόν επίπεδο, με επιδερμίδα λιγότερο ή περισσότερο λιπαρή ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες. Το χρώμα του πιο σκούρο στο κέντρο, πιο ανοιχτόχρωμο στο περιθώριο, ανοικτό καφέ ή σκούρο καφέ, συνήθως με λευκό περιθώριο. Έχει λευκούς πόρους, που κιτρινίζουν κατά την ωριμότητα του μύκητα και λευκούς σωλήνες αρχικά που κιτρινίζουν κατά την ωριμότητα, και αν πιεστούν δεν αλλάζουν χρώμα. Ο στύπος του έχει ύψος 7-20cm και διάμετρο 3-8cm, είναι συνήθως κυλινδρικό-ωοειδές, λευκό στη βάση, ωχρο-καφετί το υπόλοιπο, με λευκό δίκτυο το οποίο δεν φαίνεται από τη μέση και κάτω. Η σάρκα του είναι λευκή, με ευχάριστη οσμή και γλυκιά γεύση και όταν κοπεί δεν αλλάζει χρώμα.

Διαβίωση

Διαβιεί στο Βόρειο Ημισφαίριο σε όλη την Ευρώπη, στην Ασία και στη Βόρεια Αμερική και δεν υπάρχει στη φύση στο Νότιο Ημισφαίριο. Έχει εισαχθεί και καλλιεργηθεί στην Νότια Αφρική, στην Αυστραλία και στην Νέα Ζηλανδία.

Χημική σύσταση

Έχει υποβληθεί σε εξέταση ολικών Τοκοφερολών με συνολική συγκέντρωση 10,65μg/g ξηρής δρόγης, με κύρια την β-Tocopherol με 8,90μg/g ξηρής δρόγης, β-Carotene 2,73μg/g ξηρής δρόγης και φλαβονοειδή με συνολική συγκέντρωση 1,75mg/g ξηρής δρόγης (Barros et al., 2008). Σε προσδιορισμό Ολικού Φαινολικού φορτίου εμφάνισε φορτίο 212,96μg/g ξηρής δρόγης (Barros et al., 2008) Έχει υποβληθεί επίσης σε ανίχνευση σακχάρων με τιμές 13,6g/100g ξηρής δρόγης με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην τρεαλόζης και μανιτόλης. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον μύκητα ανιχνεύθηκαν τα λιπαρά οξέα: ελαϊκό, παλμιτικό, στεατικό οξύ, λινολεϊκό οξύ και αραχιδονικό (Barros et al., 2008).

Βιολογικές δράσεις

Σε μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού (80%) εκχυλίσματος του είδους με συγκέντρωση 5,71mg/ml σε έλεγχο DPPH (36,28%) και EC50 11,15. Σε μελέτη κυτταροτοξικής δράσης (μεθανολικού κεχυλίσματος) έναντι επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 σε συγκέντρωση 20mg/ml, έδειξε κυτταροτοξική δράση 27,43% και IC50 14,33(Βασδέκης, 2013). Το υδατικό εκχύλισμα του είδους παρουσίασε σε αντιοξειδωτικό έλεγχο EC50 1,44 (Li et al., 2009). Παρουσίασε υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι *S. aureus* (Wang et al. 2007; Zheng et al. 2007), ενώ έδειξε αντική δράση σε *in vitro* πείραμα έναντι *Vaccinia virus* και *Tobacco mosaic virus* (Moldavan et al. 2001) και ανασταλτική δράση στο RT του HIV (Moldavan et al. 2001). Επιπλέον, εκχύλισμα του έχει εμφανίσει αναστολή στις νευρικές αποκρίσεις του υπόκαμπου εγκεφάλου αρουραίων σε *in vivo* πειράματα (Boa et al. 2004).

3.2.2 *Macrolepiota procera* var. *procera* (Scop.) Singer

Division (Συνομοταξία)	Basidiomycota
Class (Τάξη)	Agaricomycetes
Order (Ομοταξία)	Agaricales
Family (Οικογένεια)	Agaricaceae
Genus (Γένος)	<i>Macrolepiota</i>
Species (Είδος)	<i>M. procera</i>



Εικόνα 44 *Macrolepiota procera* var. *procera*

Δρογοετυμολογία

Ο μύκητας *Macrolepiota procera* ή αλλιώς Μακρολεπιότα η ψηλή με τι κοινές ονομασίες Ζαρκαδίσιο, Κωνσταντάς, Αλεκάτη, Ρόκα, Ελαφίνα, Κουκούλι-Κουκουλίτης, Σταρομανίτης. Στη Βόρεια Αμερική το ονομάζουν “Parasol mushroom”.

Δρογοβοτανική

Το είδος περιγράφηκε πρώτη φορά το 1772 από τον Ιταλό φυσιολόγο Giovanni Antonio Scopoli που το ονόμασε *Agaricus procerus*. Έπειτα ο Rolf Singer το 1948 το κατέταξε στο γένος *Macrolepiota*.

Μορφολογία

Το μέγεθος του πύλου είναι 10-30cm, αρχικά είναι ημισφαιρικό, καμπανοειδές και όσο ωριμάζει γίνεται επίπεδο με έντονη θηλή στο κέντρο. Η επιφάνεια είναι πάντα στεγνή και αποτελείται από χαρακτηριστικά λείπια. Η περιφέρεια του πύλου πάντα υπερβαίνει τα ελάσματα. Τα ελάσματα είναι σχεδόν πάντα ελεύθερα, πυκνά και λεπτά. Το χρώμα τους είναι κυρίως λευκό ενώ όσο ωριμάζουν γίνεται κρέμ. Το στύπος έχει ύψος 10-30cm και διάμετρο 1-3cm και έχει έντονα διογκωμένη βάση. Αποχωρίζεται πάντα εύκολα από το καπέλο. Η οσμή είναι αδύναμη αλλά ευχάριστη και έχουν γλυκιά γεύση φουντουκιού.

Διαβίωση

Καρποφορεί από τον Μάιο έως τον Νοέμβριο, συνήθως κατά ομάδες, σε δάση, σε άκρες δασών, κατά μήκος δρόμων, σε ξέφωτα, σε βοσκοτόπια και θαμνότοπους, σε φωτεινά και ηλιόλουστα μέρη.

Χημική σύσταση

Μελέτη ιχνοστοιχείων που έγινε στο συγκεκριμένο μύκητα που συλλέχθηκε στην Πολωνία (Kosanić et al. 2016) έδειξε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν στο κάλιο, άργυρο, χαλκό, ρουβίδιο και φώσφορο, ενώ παρατηρήθηκε η δυνατότητα του μύκητα να συσσωρεύει

επικίνδυνα ορυκτά στοιχεία όπως κάδμιο, υδράργυρο και μόλυβδο. Συνεπώς, η κατανάλωση του δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 300-500g την ημέρα σε καθημερινή βάση (Kosanić et al. 2016). Ο μύκητας έχει υποβληθεί σε εξέταση Ολικών Φαινολικών με 3,17 mgGAE/ξηρής δρόγης μεθανολικού εκχυλίσματος (Barros et al., 2009) και σε εξέταση αντιοξειδωτικών απέδωσε IC₅₀ 311,40μg/ml (Žurga et al., 2014). Επιπλέον, έχουν απομονωθεί 12 lanostane-type τριτερπενοειδή που ονομάζονται lepiotaprocerins A-L (Chen et al. 2018) και η ουσία β-trefoil B-like λεκτίνη MprL (Wang et al. 2005).

Επιπροσθέτως, έχει πραγματοποιηθεί προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και μετάλλων καθώς και ταυτοποίηση πτητικών συστατικών σε ελληνικό δείγμα (Ouzouni, 2009).

Rt	RI	Ένωση	Συγκέντρωση %	Rt	RI	Ένωση	Συγκέντρωση %
2,07	826	2-προπανόνη	0,64	10,60	1216	Λεμονένιο	0,17
3,11	919	2-βουτανόνη	0,29	10,93	1230	2-μεθύλ-1-βουτανόλη	0,72
3,40	933	3-μεθύλ βουτανάλη	0,59	12,08	1278	3-οκτανόνη	74,70
3,88	957	2,2,4,6,6-πενταμεθύλ-επτάνιο	2,22	12,45	1294	p-κουμόλιο	0,25
4,84	1003	Πεντανάλη	0,47	12,81	1309	2-οκτανόνη	0,32
5,18	1014	2-εξανόνη	0,57	12,93	1314	Οκτανάλη	0,32
6,97	1075	3-εξανόνη	0,28	13,24	1326	1-οκτέν-3-όνη	0,93
7,77	1102	Εξανάλη	6,22	13,80	1350	2-επτανάλη	0,86
9,09	1155	Ξυλόλιο	0,25	14,13	1363	6-μεθύλ-5-επτέν-2-όνη	0,21
9,22	1160	p-ξυλόλιο	0,42	15,40	1416	3-οκτανόλη	4,49
9,63	1177	3-επτανόνη	0,17	15,85	1435	3-οκτέν-2-όνη	0,18
10,32	1204	2-επτανόνη	0,24	16,40	1457	2-οκτενάλη	1,21
10,40	1207	Επτανάλη	0,22	16,80	1473	1-οκτέν-3-όλη	3,05

Βιολογικές δράσεις

Το μεθανολικό εκχύλισμα του μύκητα έδειξε υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών *Proteus mirabilis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Alternaria alternate*, *Trichoderma viride*, *Cladosporium cladosporioides*. Επιπλέον, στο ίδιο εκχύλισμα έγινε μελέτη κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές HeLa, A549 και LS174 όπου απέδωσε με IC₅₀ 29,39μg/ml, 25,55μg/ml και 68,49μg/ml αντίστοιχα (Money et al., 2011).

Κάποια από τα τριτερπενοειδή lepiotaprocerins A-L, ανέστειλαν σημαντικά την παραγωγή νιτρικού οξέως, ενώ άλλα είχαν αξιοσημείωτη δράση έναντι καρκινικών κυττάρων και ένα από αυτά είχε δράση έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, με την μικρότερη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimal Inhibitory Concentration) 50 μg/mL (Chen et al., 2018).

Σε μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης του μεθανολικού(80%) εκχυλίσματος του είδους με συγκέντρωση 5,71mg/ml DPPH απέδωσε κατά 24,71 και EC50 20,40. Σε μελέτη κυτταροτοξικής δράσης (μεθανολικού εκχυλίσματος) έναντι επιθηλιακών κυττάρων πνεύμονα A549 σε συγκέντρωση 20mg/ml, έδειξε κυτταροτοξική δράση 11.74% και IC50 16,62 (Βασδέκης, 2013).

3.3 Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε μανιτάρια στην Ελλάδα

Είδος	Μελέτη	Βιβλιογραφία
<i>Agaricus arvensis</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Agaricus campestris</i>		
<i>Agrocybe aegerita</i>	Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	(Diamantopoulou et al., 2012)
<i>Albatrellus pes-caprae</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Amanita caesarea</i>	- Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση - Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Βασδέκης, 2013) (Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Amanita ceciliae</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Amanita citrina</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Amanita rubescens</i>		
<i>Armillaria mellea</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Armillaria tabescens</i>		
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	(Diamantopoulou et al., 2012)
<i>Boletus aureus</i>	- Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών - Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009) (Βασδέκης, 2013)

<i>Boletus edulis</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Boletus luridiformis</i> var. <i>luridiformis</i>		
<i>Cantharellus cibarius</i>	• Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση • Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	• (Βασδέκης, 2013) • (Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Cantharellus cinereus</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Clitogybe geotropa</i>		
<i>Craterellus cornucopioides</i>		
<i>Fistulina hepatica</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Flamulina velutipes</i>	• Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων • Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	• (Diamantopoulou et al., 2012) • (Βασδέκης, 2013)
<i>Ganoderma applanatum</i>	Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	(Diamantopoulou et al., 2012)
<i>Ganoderma australe</i>	Βιοαποικοδόμηση των λυμάτων ελαιοτριβείου	(Ntougias et al., 2012)
<i>Gomphus clavatus</i>	Αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση, απομόνωση λιπαρών οξέων και παραγώγων εργοστερόλης	(Makropoulou et al., 2012)
<i>Ganoderma lucidum</i>	• Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων • Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	• (Diamantopoulou et al., 2012) • (Βασδέκης, 2013)
<i>Hydnum repandum</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Hygrophorus chrysodon</i>		

<i>Hygrophorus eburneus</i>	ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	
<i>Hygrophorus marzuolus</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Hygrophorus russocoreacius</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Hygrophorus russula</i>	Αντιοξειδωτική δράση, ανίχνευση στερολών και λιπαρών οξέων	
<i>Lactarius deliciosus</i>	Αντιοξειδωτική δράση, ανίχνευση στερολών και λιπαρών οξέων	(Kalogeropoulos et al., 2013)
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Lactarius sanguifluus</i>	- Αντιοξειδωτική δράση, ανίχνευση στερολών και λιπαρών οξέων - Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε μέταλλα	(Kalogeropoulos et al., 2013) (Aloupi et al., 2012)
<i>Lactarius semisanguifluus</i>		
<i>Lactarius volemus</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Lentinus edodes</i>	Καλλιέργεια μανιταριού και φαρμακευτικές του ιδιότητες	(Ντανάση, 2007)
<i>Macrolepiota mastoidea</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Macrolepiota procera</i> var. <i>procera</i>	Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	(Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)

<i>Morchella conica</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Morechella elata</i>	• Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	• (Diamantopoulou et al., 2012) • (Βασδέκης, 2013)
<i>Morchella esculenta</i>	• Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	
<i>Pleurotus eryngii</i>	• Καλλιέργεια και παραγωγή μανιταριών • Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση • Καλλιέργεια σε υποστρώματα προερχόμενα από την βιομηχανία ελαιολάδου • Βιοαποικοδόμηση των λυμάτων ελαιοτριβείου	• (Theochari et al., 2002) • (Βασδέκης, 2013) • (Zervakis, 2005) • (Ntougias et al., 2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	• Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση • Καλλιέργεια και παραγωγή μανιταριών • Βιοαποικοδόμηση των λυμάτων ελαιοτριβείου • Αξιολόγηση πηγών άνθρακα και αζώτου για την παραγωγή βιομάζας και ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών • Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών • Απομόνωση 19 μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων νουκλεοτιδίων, λιπαρών οξέων, φαινολικών παραγώγων και αλκαλοειδών	• (Βασδέκης, 2013) • (Theochari et al., 2002) • (Ntougias et al., 2012) • (Ευστρατιάδου, 2009) • (Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009) • (Papaspysyridi et al., 2012)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	(Diamantopoulou et al., 2012)
<i>Russula cyanoxantha</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)

<i>Russula delica</i>	• Αντιοξειδωτική δράση, ανίχνευση στερολών και λιπαρών οξέων • Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε μέταλλα • Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, λίπους, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, μετάλλων και ταυτοποίηση των πτητικών τους συστατικών	• (Kalogeropoulos et al., 2013) • (Aloupi et al., 2012) • (Ouzouni et al., 2007; Ouzouni et al., 2009; Ouzouni et al., 2009)
<i>Russula rivescens</i>	Αντιοξειδωτική δράση, φαινολικό περιεχόμενο, αντικαρκινική δράση	(Βασδέκης, 2013)
<i>Suillus bellinii</i>	• Αντιοξειδωτική δράση, ανίχνευση στερολών και λιπαρών οξέων • Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε μέταλλα	• (Kalogeropoulos et al., 2013) • (Aloupi et al., 2012)
<i>Volvariella volvacea</i>	Ταυτοποίηση πολυσακχαριτών και λιπιδίων	(Diamantopoulou et al., 2012)

Πειραματικό Μέρος

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Μελετηθέντα δείγματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν **7 δείγματα ελληνικής τρούφας**:

- *Tuber aestivum*,
- *T. melanosporum*,
- *T. mesentericum*,
- *T. magnatum*,
- *T. borchii*,
- *T. brumale* και
- *T. uncinatum*.

Από τα είδη *Tuber aestivum* και *Tuber melanosporum* μελετήθηκαν κατεψυγμένα αλλά και φρέσκα δείγματα, ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα ήταν αποκλειστικά κατεψυγμένα.

Η φρέσκια τρούφα ***Tumber aestivum***, συλλέχθηκε από την περιοχή των Τρικάλων τον Ιούλιο του 2017 (από το Μουσείο Μανιταριών - Καλαμπάκα Τρικάλων), με υπεύθυνο τον κ. Πάλλα.

Η φρέσκια τρούφα ***Tuber melanosporum***, συλλέχθηκε από τη Βόρεια Ελλάδα (από την εταιρεία Troufanet).

Τα κατεψυγμένα δείγματα τρουφών *T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. brumale* και *T. uncinatum*, προέρχονται από τη Βόρεια Ελλάδα (από την εταιρεία Troufarplus, με υπεύθυνη τη κα. Π. Κλαδοπούλου)

Στη συνέχεια μελετήθηκαν φυτοχημικά **5 έλαια τρούφας** με άρωμα *Tuber melanosporum* και *Tuber magnatum* που αγοράστηκαν από διαφορετικές εταιρείες (Troufarplus, Dryas Oil, Ιλιάδα και Μουσείο Μανιταριών) κατά το διάστημα 2017-2018 προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητά τους.

Τέλος, μελετήθηκαν **5 αποξηραμένα μανιτάρια** εκ των οποίων τα 3 είναι ελληνικής προέλευσης (*Amanita caesarea*, *Marasmius oreades*, *Craterellus cornucopioides*) και τα άλλα 2 πολωνικής (*Boletus edulis* και *Macrolepiota procera* var. *procera*)

Τα μανιτάρια *Amanita caesarea* και *Marasmius oreades* προέρχονται από το Μουσείο Μανιταριών και το είδος *Craterellus cornucopioides* από την εταιρεία Δίρφυς.

Τα μανιτάρια *Boletus edulis* και *Macrolepiota procera* var. *procera* παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Ιατρικού Πανεπιστημίου του Λούμπλιν (Medical University of Lublin).

4.2 Όργανα ανίχνευσης και προσδιορισμού δομής των φυσικών προϊόντων

Υγρή χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC)

- Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC) σε όργανο BUCHI Pump Manager C-615 συνδεδεμένο με BUCHI Pump Module C-601

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

- Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F₂₅₄) διαστάσεων 20x20 cm (αναλυτική χρωματογραφία)
- Γυάλινες πλάκες με επίστρωση silica gel με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F₂₅₄) διαστάσεων 20x20 cm (παρασκευαστική χρωματογραφία)

Συμπύκνωση υπό κενό

Όλες οι συμπυκνώσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση συμπυκνωτή κενού Rotavapor BUCHI R-200 σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο BUCHI Heating Bath B-490 στους 35-40°C.

Διαλύματα ψεκασμού

Διάλυμα θειϊκής βανιλίνης: Για την παραγωγή 200ml μεθανολικού διαλύματος θειϊκής βανιλίνης έγινε ανάμειξη ίσων ποσοτήτων α) διαλύματος 5g βανιλίνης (καθαρότητας 99%) διαλυμένης σε 95ml MeOH και β) διάλυμα 5ml θειϊκού οξέος σε 95ml MeOH.

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Τα απομονωμένα προϊόντα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες (CDCl₃, MeOD). Φάσματα ¹H-NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy) και HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) λήφθηκαν σε όργανο Bruker DRX 400. Οι μετατοπίσεις δίνονται σε τιμές δ (ppm) με εσωτερικό πρότυπο TMS, ενώ οι σταθερές σύζευξης J σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων αποδίδεται εν συντομία ως εξής: s=μονή, d=διπλή, t=τριπλή, q=τετραπλή και m=πολλαπλή.

Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η ανάλυση πραγματοποιείται σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 6890 συνδεδεμένο με σύστημα φασματογράφου μάζας Hewlett-Packard 5973 που λειτουργεί με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια (Electron Impact) και με ενέργεια ιονισμού 70eV. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εξοπλισμένος με έναν split/splitless εγχυτήρα με λόγο διαχωρισμού 1/10 και μια τριχοειδή στήλη HP 5MS με μήκος 30m, εσωτερική διάμετρο 0,25mm και πάχος μεμβράνης 0,25μm. Η μελέτη των χρωματογραφημάτων γίνεται με βάση τη λογαριθμική τιμή που παίρνουμε για κάθε ουσία μετά την επεξεργασία των κορυφών, το φάσμα μάζας της κάθε ουσίας και τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Κατά τη μελέτη των δειγμάτων έγινε χρήση τριών θερμοκρασιακών προγραμμάτων ενώ για το Conditioning ίνας χρησιμοποιήθηκαν δυο προγράμματα σύμφωνα με τις προτάσεις του κατασκευαστή.

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I: Η αρχική θερμοκρασία είναι στους 40°C και αυξάνεται με ρυθμό 3°C/min έως τους 100°C, έπειτα αυξάνεται με ρυθμό 20°C/min έως τους 250°C. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 28min. Mode splitless και ταχύτητα ροής φέροντος αερίου He 0,7ml/min. (method d_spme2)

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα II: Η αρχική θερμοκρασία είναι στους 45°C όπου παραμένει σταθερή για 2min, έπειτα αυξάνεται με ρυθμό 5°C /min στους 130°C, μετά αυξάνεται με ρυθμό 8°C/min

στους 200°C και τέλος αυξάνεται με ρυθμό 12°C/min έως τους 250°C, όπου και παραμένει σταθερή για 7min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 38,92min. Mode splitless και ταχύτητα ροής φέροντος αερίου He 2.3 ml/min. (method L1_SPME3)

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα III: Η αρχική θερμοκρασία είναι στους 100°C όπου παραμένει σταθερή για 2min, έπειτα αυξάνεται με ρυθμό 5°C/min έως του 280°C, όπου και παραμένει σταθερή για 10min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 48min. Mode split και ταχύτητα ροής φέροντος αερίου He 1,8ml/min. (method diamilen)

Conditioning Ίνας I: Η θερμοκρασία είναι στους 250°C για 30min (method d_condvb)

Conditioning Ίνας II: Η θερμοκρασία είναι στους 300°C για 30min (method con_car)

Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Headspace-Solid Phase Microextraction)

Η ανάλυση πραγματοποιείται με την συσκευή Supelco Fiber Holder for Manual Sampling με δύο ίνες:

- 1) Supelco SPME fiber 100μm PDMS (polydimethylsiloxane coating)
- 2) Supelco SPME fiber 75μm CAR/PDMS (Carboxen/polydimethylsiloxane coating).

Το πρωτόκολλο χρήσης της ίνας είναι: α) Conditioning της ίνας στον Αέριο Χρωματογράφο (GC/MS) στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα που συνιστά η παραγωγός εταιρεία (α' ίνα στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα Conditioning Ίνας I και β' ίνα στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα Conditioning Ίνας II), β) τοποθέτηση της ίνας στο φιαλίδιο 15ml Supelco Vial που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα με τη χρήση του αντίστοιχου υποδοχέα συγκράτησης και γ) τοποθέτηση της ίνας στον Αέριο Χρωματογράφο (GC/MS) χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide.

Τρεις διαδικασίες μικροεκχύλισης πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη:

Διαδικασία I:

- 1) Το δείγμα βγαίνει από την κατάψυξη και αφήνεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να είναι εφικτός ο τεμαχισμός του.
- 2) Το τεμαχισμένο δείγμα (1g) τοποθετείται στο κατάλληλο φιαλίδιο (15ml Supelco sample Vial) και αφήνεται για 10min, σε θερμαντική πλάκα Carousel Stirring Hotplate στους 60°C σε κατάσταση ισορροπίας.
- 3) Μετά τον χρόνο ισορροπίας, η εκάστοτε ίνα (PDMS και CAR/PDMS) εισέρχεται στο φιαλίδιο του δείγματος χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide. Το όλο σύστημα παραμένει σε θερμοκρασία 60°C για 17min.
- 4) Έπειτα, η ίνα τοποθετείται στον Αέριο Χρωματογράφο (GC/MS) χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα I.

Διαδικασία II:

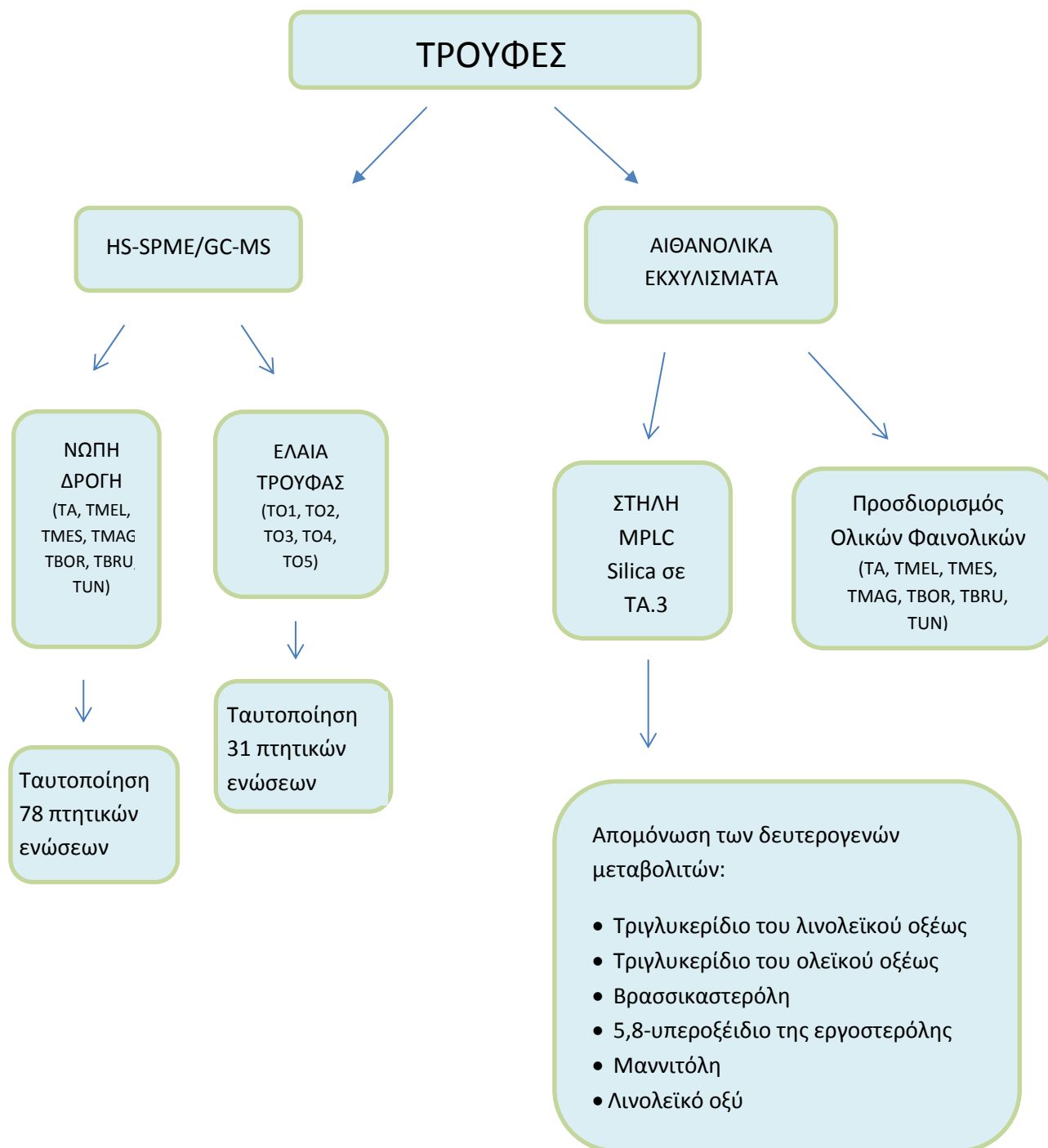
- 1) Το δείγμα κονιοποιείται και 200mg τοποθετούνται στο κατάλληλο φιαλίδιο με 2ml αποσταγμένου νερού (dH₂O).
- 2) Το φιαλίδιο τοποθετείται στη θερμαντική πλάκα στους 80°C για 30min, με μαγνητική ανάδευση 6G, σε κατάσταση ισορροπίας.
- 3) Μετά το χρόνο ισορροπίας, η ίνα CAR/PDMS εισέρχεται σε φιαλίδιο του δείγματος χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide. Το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία 80°C για 30min με μαγνητική ανάδευση 6G.

4) Στη συνέχεια η ίνα τοποθετείται στον Αέριο Χρωματογράφο (GC/MS) χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα II.

Διαδικασία III:

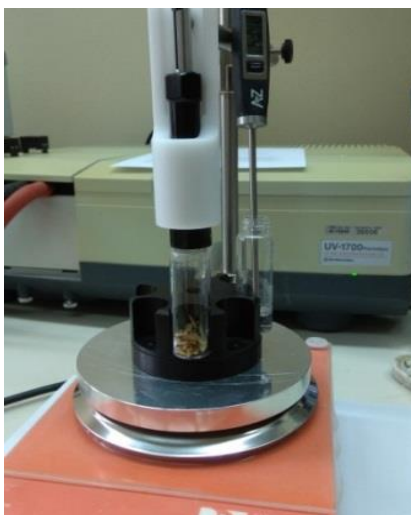
- 1) Το δείγμα 1ml τοποθετείται στο κατάλληλο φιαλίδιο με 500 μL (dH_2O).
- 2) Το φιαλίδιο τοποθετείται στην θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για 15min, με μαγνητική ανάδευση 6G, σε κατάσταση ισορροπίας.
- 3) Μετά το χρόνο ισορροπίας, η ίνα CAR/PDMS εισέρχεται στο προ-τρυπημένο sample vial του δείγματος χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide. Το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία 60°C για 15min με μαγνητική ανάδευση 6g.
- 4) Στη συνέχεια η ίνα τοποθετείται στον Αέριο Χρωματογράφο (GC/MS) χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο SPME inlet guide στο θερμοκρασιακό πρόγραμμα III.

5. Διάγραμμα αναλύσεων ειδών τρούφας



5.1 Ανάλυση δειγμάτων τρούφας με τη μέθοδο HS-SPME/GC-MS

Όλα τα υπό μελέτη είδη τρούφας (*T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. brumale* και *T. uncinatum*) υποβλήθηκαν σε ανάλυση των πτητικών συστατικών τους με τη μέθοδο HS-SPME/GC-MS. Η ανάλυση έγινε με δύο διαφορετικής πολικότητας ίνες I) PDMS και II) CAR/PDMS ακολουθώντας την Διαδικασία Ι. Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την μελέτη με τον αέριο χρωματογράφο (GC-MS), οι πίνακες των ταυτοποιημένων πτητικών ουσιών με την χρήση βιβλιοθήκης (Wiley 275) και βιβλιογραφικών δεδομένων και τέλος έγινε προσπάθεια ποιοτικής σύγκρισης των συστατικών των ελληνικών τρούφων με αντίστοιχες μελέτες της υπάρχουσας βιβλιογραφίας.

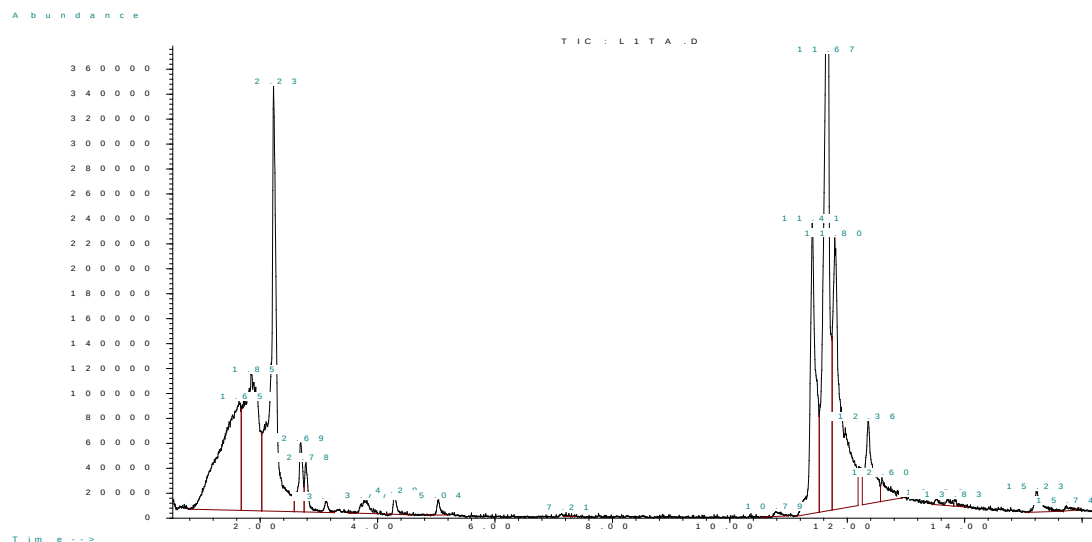


Εικόνα 45 HS-SPME

5.1.1 *Tuber aestivum* (TA)

Κατεψυγμένο δείγμα μαύρης τρούφας *Tuber aestivum* (TA) μελετήθηκε με δυο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη με του δείγματος TA με την ίνα PDMS απέδωσε πέντε ουσίες: 1-octen-3-ol (87,80%), 2-octenal (15%), 3-octanone (5,87%), 1-octen-3-one (3,01%) και 2-butanone (1,8%).

Χρωματογράφημα του δείγματος TA με την ίνα CAR/PDMS



Πίνακας 1: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες της τρούφας *Tuber aestivum* με την ίνα CAR/PDMS.

<i>Tuber aestivum</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-octen-3-ol	26.69
	3-methyl-1-butanol	0.12
	1-decanol	0.10
	2-ethylhexan-1-ol	0.04
	2-methyl-1-butanol	0.34
	3-octanol	3.83
<i>Total alcohols</i>		31,12
Aldehydes	2-octenal	0.68
	3-methylbutanal	0.96
	hexanal	0.27
<i>Total aldehydes</i>		1,91
Aromatic comp.	benzaldehyde	0.14
<i>Total aromatic comp.</i>		0,14
Ketones	3-octanone	9.84
	1-octen-3-one	10.93
	2-butanone	45.40
	2,3-pentanedione	0.26
<i>Total ketones</i>		66,43

Με την ίνα CAR-PDMS, ταυτοποιήθηκαν δεκαπέντε πτητικές ουσίες. Η 2-butanone εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση με ποσοστό 45,4% και ακολουθούν η 1-octen-3-ol (26,69%) και η 1-octen-3-one (10,93%).

Στην κατηγορία των αλκοολών η ουσία 1-octen-3-ol έχει χαρακτηριστεί ως σεξουαλική ορμόνη στους μύκητες και ειδικότερα στις τρούφες (Chitarra et al., 2004), διεγείροντας και έλκοντας διάφορα είδη εντόμων (Combet et al., 2006). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αποτελεί προϊόν της ενζυματικής μεταβολής του λινολεϊκού οξέος και ανιχνεύεται σε ωμά μανιτάρια όταν έχουν υποστεί εκδορές (Díaz et al., 2003, 2009).

Επιπλέον, η παρουσία της ουσίας 3-methylbutanol είναι αρκετά σημαντική, διότι είναι μία από τις ουσίες που συνθέτουν το χαρακτηριστικό άρωμα της καλοκαιρινής τρούφας, για τον άνθρωπο, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης της (L. Culleré et al., 2010) και έχει ταυτοποιηθεί ξανά στο είδος *T. aestivum* (L. Culleré et al., 2010), *T. borchii* (Mauriello et al., 2004) και στο είδος *Agrocybe aegerita* (Costa et al. 2015). Η ουσία 2-ethylhexanol έχει ταυτοποιηθεί ξανά στο συγκεκριμένο είδος (Díaz et al., 2009) και στο είδος *T. magnatum* (Costa et al., 2015).

Η ουσία decanol ταυτοποιείται **πρώτη φορά στο είδος *T. aestivum*** και έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *Agaricus bisporus* (Costa et al. 2015).

Και με τις δυο ίνες ανιχνεύθηκε η κετόνη 2-butanone η οποία έχει συνδεθεί με το άρωμα των ώριμων τρουφών (Díaz et al., 2003; Talou et al., 1987), ενώ η ουσία 2,3-pentanedione ταυτοποιείται **πρώτη φορά** στο είδος *T. aestivum*, αλλά έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. uncinatum* (Schmidberger et al., 2017).

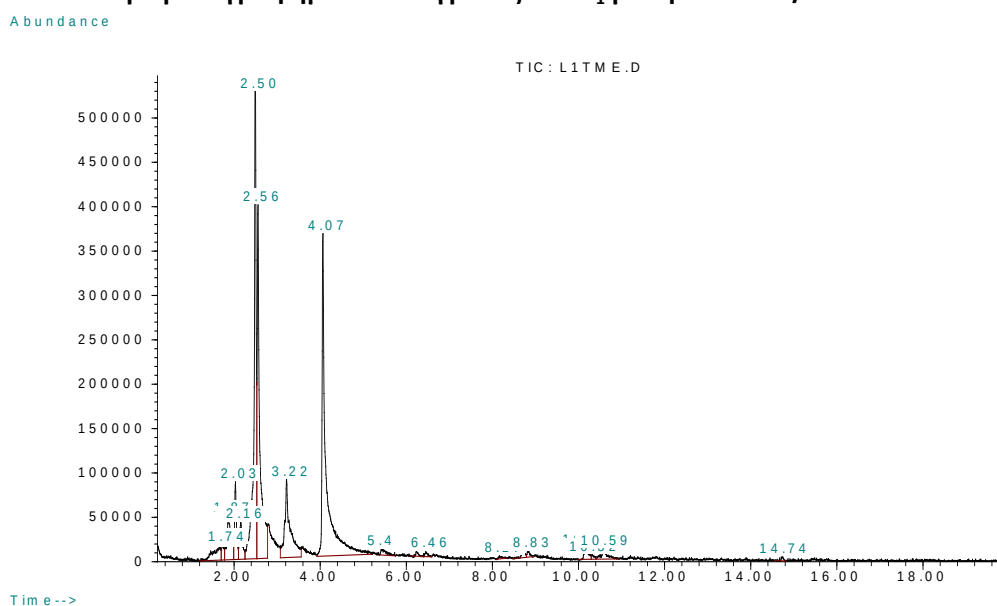
Η αλδεΐδη hexanal που ανιχνεύθηκε σε ελάχιστη συγκέντρωση, σχετίζεται με τον καταβολισμό λιπαρών οξέων, συγκεκριμένα του λινολεϊκού οξέος (Belitz et al., 2009) και όταν εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά συνδέεται με την παρατεταμένη διατήρηση της τρούφας σε χαμηλές θερμοκρασίες (Díaz et al., 2003). Η μικρή της συγκέντρωση στο δείγμα, δυνητικά, συνεπάγεται μικρή διάρκεια παραμονής στην κατάψυξη (Costa et al. 2015; Vita et al. 2015).

Θειούχες ενώσεις δεν ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα και η δύσκολη, ή μη ανίχνευση, αυτών των ουσιών παρατηρήθηκε και σε Ισπανική τρούφα ίδιου είδους, λόγω της χαμηλής τους συγκέντρωσης και της μεγάλης πτητικής τους ικανότητας (Díaz et al., 2003).

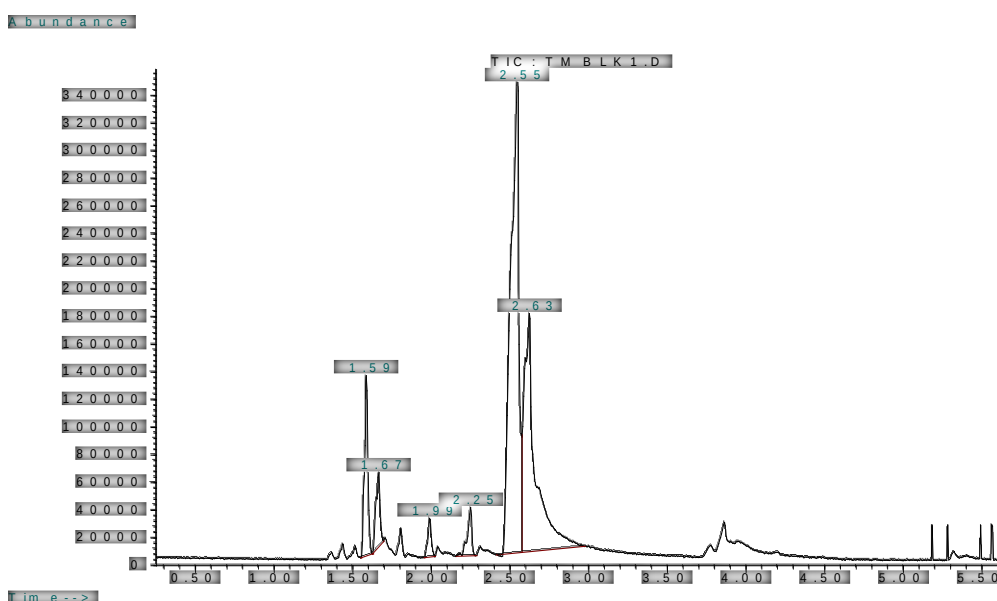
5.1.2 *Tuber melanosporum* (TMEL)

Κατεψυγμένο (TMEL₁) και φρέσκο (TMEL₂) δείγμα μαύρης τρούφας *Tuber melanosporum* μελετήθηκαν με δύο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη με του δείγματος TMEL₁ την ίνα PDMS απέδωσε τρεις ουσίες: 3-methylbutanal (57,70%), hexanal (25,77%) και benzaldehyde (4%). Ακολούθως παρατίθενται οι αναλύσεις με την ίνα CAR/PDMS.

5.1.2a Χρωματογράφημα του δείγματος TMEL₁ με την ίνα CAR/PDMS



5.1.2b Χρωματογράφημα του δείγματος TMEL₂ με την ίνα CAR/PDMS



Πίνακας 2: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες των δειγμάτων TMeI με την ίνα CAR/PDMS.

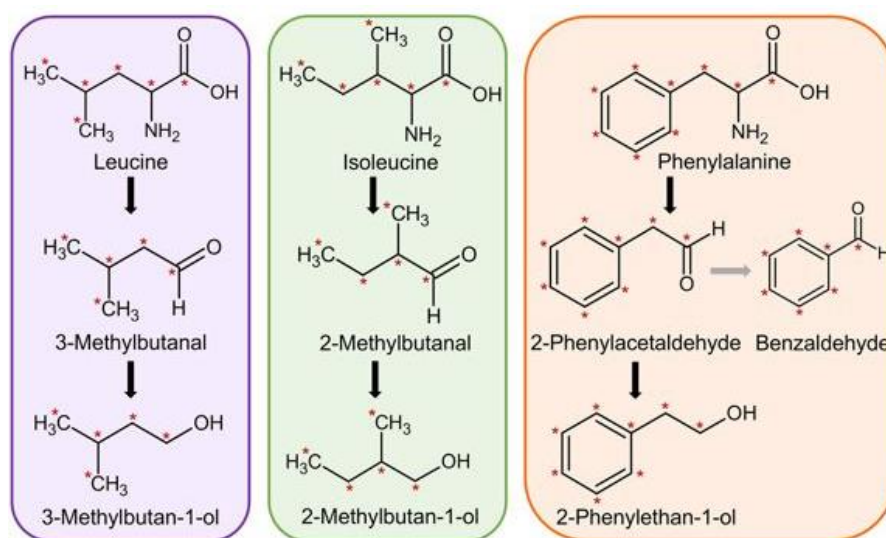
<i>Tuber melanosporum</i>			
INA			
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR-PDMS TMeI₁	CAR-PDMS TMeI₂
Acids	palmitic acid	-	0,60
	oleic acid	-	24,51
	<i>Total acids</i>		25,11
Alcohols	1-octen-3-ol	0,13	-
	3-methyl-1-butanol	-	0,60
	3-triethoxymethyl 3-buten-1-ol	-	0,60
	<i>Total alcohols</i>	0,13	1,2
Aldehydes	3-methyl butanal	63,03	24,97
	hexanal	25,22	-
	2-methylbutanal	4,04	17,64
	heptanal	0,32	-
	acetaldehyde	-	6,18
	<i>Total aldehydes</i>	92,61	48,79
Alkanes	2-methylbutane	-	0,60
<i>Total alkanes</i>			0,6
Alkenes	3-methyl-2-pentene	2,92	-
<i>Total alkenes</i>		2,92	
Aromatic comp.	3-methylanisole	0,72	-
	benzaldehyde	0,34	0,60
	benzophenone	-	20,51
	<i>Total aromatic comp.</i>	1,06	21,11
Ketones	3-octanone	0,07	-
	3-penten-2-one	2,92	-
	2-butanone	-	0,86
	2-propanone	-	3,95
	<i>Total Ketones</i>	2,99	6,15
Sulfur der.	methional	0,29	-
	dimethylsulfide	-	1,96
	methyl isobutyl sulfide	-	0,60
	<i>Total sulfur der.</i>	0,29	2,56

Με την ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα TMeI₁ έντεκα ενώσεις με κυριότερες τις 3-methylbutanal με ποσοστό 63% και hexanal με ποσοστό 25% ενώ στο δείγμα TMeI₂ ταυτοποιήθηκαν δεκατέσσερις πτητικές ενώσεις, με κύριες τις 3-Methylbutanal (25%) και 2-Methylbutanal (17%).

Στο δείγμα TMeI₁ ανιχνεύθηκε υψηλή συγκέντρωση της ουσίας hexanal (25%), ενώ στο δείγμα TMeI₂ παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση λιπαρών οξέων με συνολικό ποσοστό 25.11% και απουσία της ουσίας hexanal. Αυτή η αντιστροφή οφείλεται στο ότι το δείγμα TMeI₁ είναι κατεψυγμένο ενώ το δείγμα TMeI₂ είναι φρέσκο, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία, όπου η υψηλή συγκέντρωση της hexanal, όπως προαναφέρθηκε σχετίζεται με την οξείδωση των λιπαρών οξέων και το χρόνο παραμονής της τρούφας σε χαμηλές θερμοκρασίες, και εδώ φανερώνει τη διατήρηση των δειγμάτων σε χαμηλή θερμοκρασία για παρατεταμένο χρόνο (Díaz et al., 2003).

Οι πτητικές ενώσεις 3-methylbutanal και 2-methylbutanal είναι οι ενώσεις που χαρακτηρίζουν το είδος *T. melanosporum* (Wang et al., 2011). Προκύπτουν από τον καταβολισμό των ελεύθερων

αμινοξέων leucine και isoleucine μέσω του μονοπατιού Ehrlich (Hazelwood et al., 2008), το οποίο παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα που ακολουθεί.



Όσον αφορά τις θειούχες ενώσεις, το δείγμα TMEL₂ συγκεντρώνει μεγαλύτερο ποσοστό από το TMEL₁, γεγονός που εξηγείται από το ότι το δείγμα TMEL₂ ήταν φρέσκο, και είχε διατηρήσει ζύμες και βακτήρια μέσα αλλά και στην επιφάνεια του καρποσώματος, που συντελούν καθοριστικά στην παραγωγή αυτών των πτητικών ουσιών (Vahdatzadeh et al., 2015). Αντιστοίχως, φαίνεται πως στο δείγμα TMEL₁, η συντήρησή του σε χαμηλές θερμοκρασίες οδήγησε στην αλλαγή του μικροβιώματός του, αλλά και γενικότερα της σύστασής του καρποσώματος, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του αρωματικού του προφίλ.

Ο μεταβολίτης methional, που ταυτοποιήθηκε στο δείγμα TMEL₁ έχει ανιχνευθεί σύμφωνα με την βιβλιογραφία στα είδη *T. aestivum* και *T. magnatum* (Culleré et al., 2010; Vita et al., 2015, Zhang et al., 2016), αλλά **πρώτη φορά** στο *T. melanosporum*. Η πτητική ουσία dimethylsulfide, που ανιχνεύτηκε στο δείγμα TMEL₂ προκύπτει από ζύμες και βακτήρια που συμβιώνουν με το γένος *Tuber* (Barbieri et al., 2007; Buzzini et al., 2005; Pacioni et al., 2007) και έχει ταυτοποιηθεί ξανά στο είδος *T. melanosporum* (L. Culleré et al., 2010) καθώς και σε άλλα είδη τρούφας όπως *T. excavatum*, *T. borchii*, *T. aestivum*, *T. uncinatum* (Mauriello et al., 2004).

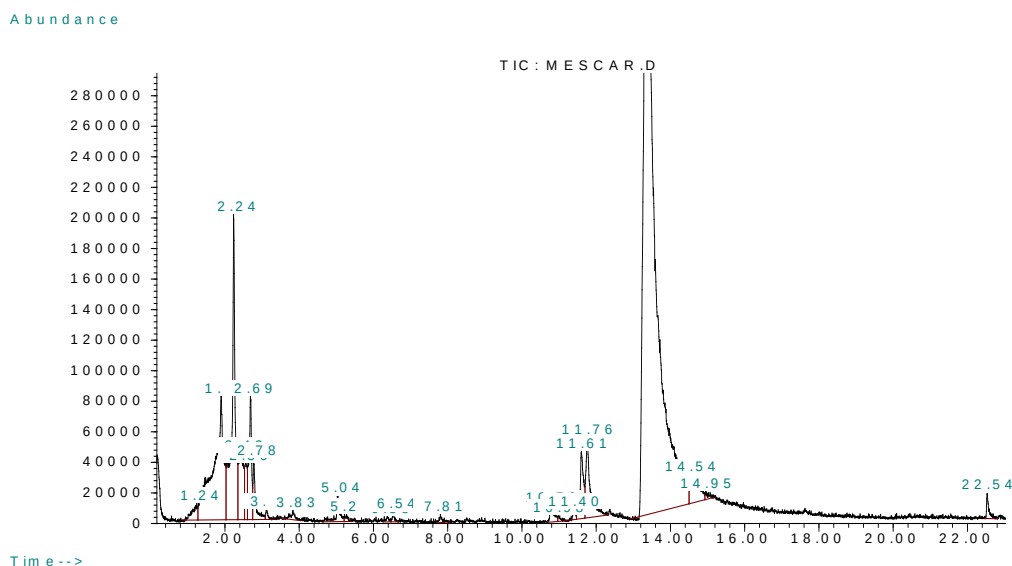
Επίσης η πτητική ένωση 3-methyl-2-pentene ταυτοποιείται **πρώτη φορά** στο είδος *T. melanosporum*, ενώ έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. borchii* (Zeppa et al., 2004) και οι μεταβολίτες 3-triethoxymethyl-3-buten-1-ol, 2-methylbutane, methyl isobutylsulfide ανιχνεύονται και αυτοί για **πρώτη φορά στο είδος**.

Στο φρέσκο δείγμα TMEL₂ ανιχνεύθηκε σε μεγάλο ποσοστό η ουσία benzophenone (20,5%), η οποία έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος (Zhang et al., 2016) και πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η ένωση αυτή παράγεται από τα ακτινοβακτήρια *Streptomyces* spp. (Effmert et al., 2012), τα οποία έχει αποδειχθεί ότι συμβιώνουν με το είδος *T. melanosporum* (Antony-Babu et al., 2014). Τέλος, η ουσία 2-butanone που ανιχνεύεται στο δείγμα έχει συνδεθεί με το άρωμα των ώριμων τρούφών (Díaz et al., 2003; Talou et al., 1987).

5.1.3 *Tuber mesentericum* (TMES)

Κατεψυγμένο δείγμα μαύρης τρούφας *Tuber mesentericum* (TMES) μελετήθηκε με δυο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη του δείγματος TMES με την ίνα PDMS απέδωσε επτά ουσίες: 3-methylanisole (88,25%), 1-octen-3-ol (2,35%), 3-methylbutanal (2,11%), 2,5-dimethoxytoluene (1,93%) και hexanal (0,39%). Ακολούθως παρατίθεται η ανάλυση με την ίνα CAR/PDMS.

5.1.3b Χρωματογράφημα του δείγματος TMES με την ίνα CAR/PDMS.



Πίνακας 3: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες των δειγμάτων TMES με την ίνα CAR/PDMS

<i>Tuber mesentericum</i>		
ΙΝΕΣ		CAR/PDMS
Χημική ομάδα	Ουσίες	
Acids	3-methylbutanoic acid	0,08
Total acids		0,08
Alcohols	1-octen-3-ol	1,65
	3-octanol	0,05
Total alcohols		1,7
Aldehydes	2-methyl-2-butenal	0,11
	2-methylbutanal	0,63
	3-methylbutanal	3,60
	hexanal	0,77
Total aldehydes		5,11
Alkadienes	1,3-pentadiene	2,42
Total alkadienes		2,42
Aromatic comp.	2,5-dimethoxytoluene	0,24
	3-methylanisole	78,05
	benzaldehyde	0,45
Total aromatic comp.		78,74
Esters	4-pentenyl acetate	3,62
Total esters		3,62
Ketones	2,3-pentanedione	0,09
	2-butanone	6,16
	3-octanone	2,25
Total ketones		8,5
Sulfur der.	1,2-propanedithiol	0,08
Total sulfur der.		0,08

Με την ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκαν δεκαεπτά πτητικές ενώσεις με κύρια την 3-methylanisole (78%). Το πτητικό προφίλ του δείγματος συμπληρώθηκε με τις C8-πτητικές ενώσεις (1-octen-3-ol, 3-octanol και 3-octanone) σε συνολικό ποσοστό 3,95% και με την θειούχα ένωση 1,2-propanedithiol (0,08%).

Σύμφωνα με την ανάλυση του δείγματος TMES ταυτοποιούνται **πρώτη φορά** στο είδος *T. mesentericum* οι εξής **οκτώ** ουσίες: 3-methylbutanoic acid, 3-octanol, 2-methyl-2-butenal, 1,3-pentadiene, 3-octanol, 4-pentenyl acetate, 2,3-pentanedione, 1,2-propanedithiol.

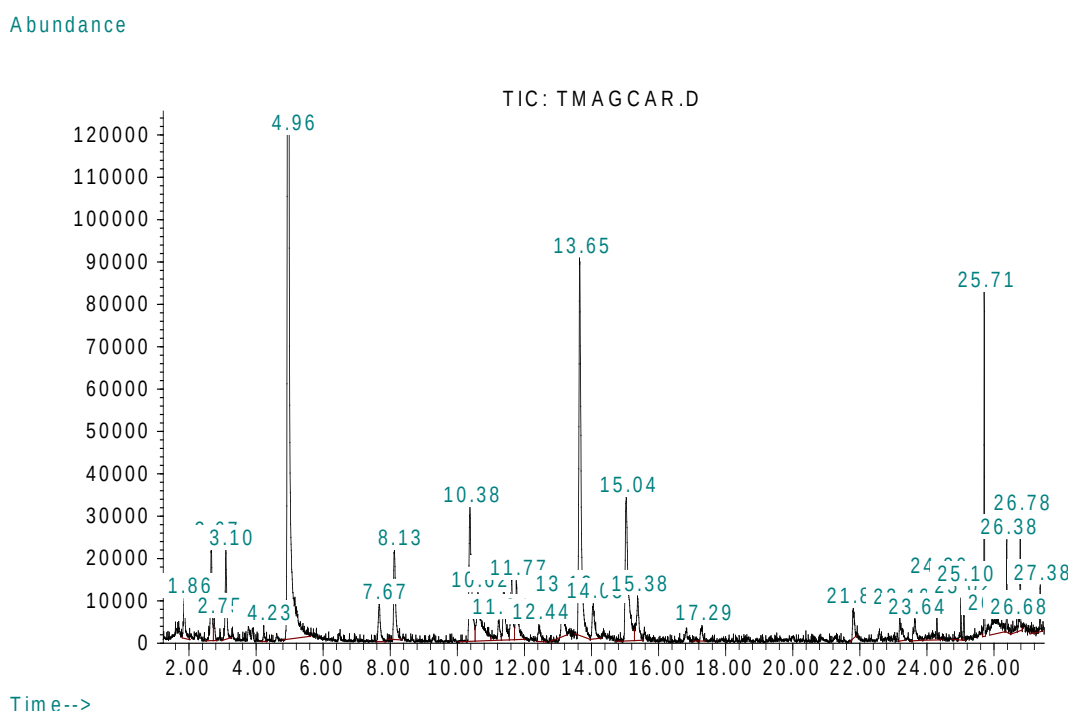
Στις αναλύσεις του TMES παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση της αρωματικής ένωσης 3-methylanisole (>75%) γεγονός που είναι σύμφωνο με βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα πτητικά συστατικά της συγκεκριμένης τρούφας (Corrado et al. 2016; Mauriello et al. 2004; Pacioni et al. 1991), όπου παρατηρούνται εξίσου υψηλές συγκεντρώσεις. Δυνητικά τα υψηλά ποσοστά της 3-methylanisole θα μπορούσαν να αποτελέσουν χαρακτηριστικό του είδους *T. mesentericum*.

Σύμφωνα με μελέτη που έχει γίνει σε δεκατέσσερα καρποσώματα του είδους *T. mesentericum*, όταν η συγκέντρωση της ουσίας 3-methylanisole ξεπερνούσε το (80%), η αντίστοιχη συγκέντρωση της ουσίας dimethylsulfide δεν υπερέβαινε το 0,3% (Mauriello et al., 2004). Αντίστοιχα στις αναλύσεις του δείγματος TMES η ουσία 3-methylanisole ξεπερνά το (78%) και η dimethylsulfide δεν ανιχνεύθηκε καθόλου.

5.1.4 *Tuber magnatum* (TMAG)

Κατεψυγμένο δείγμα λευκής τρούφας *Tuber magnatum* (TMAG) μελετήθηκε με δυο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη του δείγματος με την ίνα PDMS απέδωσε δύο ουσίες: hexanal (74.72%) και 3-methylbutanal (12.15%). Ακολούθως παρατίθεται η ανάλυση με την ίνα CAR/PDMS.

5.1.4α Χρωματογράφημα του δείγματος TMAG με την ίνα CAR/PDMS



<i>Tuber magnatum</i>		
Χημική ομάδα	Ταυτοποιημένες ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-octen-3-ol	1,66
<i>Total alcohols</i>		1,66
Aldehyde	2-octenal	1,17
	2,4-decadienal	0,69
	2-heptenal	3,96
	heptanal	2,2
	hexanal	30,55
	2,4-nonadienal	0,81
	2-methyl-2-butenal	0,32
	3-methylbutanal	1,81
	butanedial	0,23
	octanal	0,36
	pentanal	2,08
	propanal	0,95
<i>Total aldehydes</i>		45,13
Alkanes	propane	0,79
<i>Total alkanes</i>		0,79
Amines	2-propen-1-amine	0,48
<i>Total amines</i>		0,48
Aromatic comp.	3-methylanisole	1,92
	benzenacetaldehyde	2,84
	spiro[3.3]heptadiene	0,35
<i>Total aromatic comp.</i>		5,11
Cyclic comp.	2-ethylidenecyclohexanone	10,01
<i>Total cyclic comp.</i>		10,01
Ethers	1,3-bis(3-phenoxyphenoxy)benzene	10,95
<i>Total ethers</i>		10,95
Heterocycles	2,2-dimethyl aziridine	0,52
	2-methyl azetidine	0,35
	4-methyl-2,3-dihydrofuran	0,25
	2-pentylfuran	1,97
<i>Total heterocycles</i>		3,09
Ketones	1-octen-3-one	0,54
	2,5-hexanedione	1,63
	2-heptanone	0,63
	3-octen-2-one	1,17
<i>Total ketones</i>		3,97
Sulfur der.	2,4-dithiapentane	0,97
<i>Total sulfur der.</i>		0,97

Στο δείγμα TMAG με την ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκε μεγάλη ποικιλία πτητικών ενώσεων, στο σύνολό τους τριάντα. Οι ουσίες 2,4-dithiapentane και 1-octen-3-ol, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, καθορίζουν το άρωμα του είδους αυτού (Gioacchini et al., 2008).

Οι παρακάτω δέκα ουσίες **ταυτοποιούνται για πρώτη φορά** στο είδος *T. magnatum*: butanedial, propane, 2-propen-1-amine, spiro[3.3]heptadiene, 2-ethylidenecyclohexanone, 1,3-bis(3-phenoxyphenoxy)benzene, 2,2-dimethylaziridine, 2-methylazetidine, 4-methyl-2,3-dihydrofuran. Επιπροσθέτως, οι ουσίες benzeneacetaldehyde, 2,5-hexanedione και 2-heptanone **ανιχνεύονται για πρώτη φορά** στο συγκεκριμένο είδος αλλά έχουν ταυτοποιηθεί σε άλλα είδη τρούφας. Η ουσία benzeneacetaldehyde ανιχνεύθηκε ξανά στα είδη *T. melanosporum* και

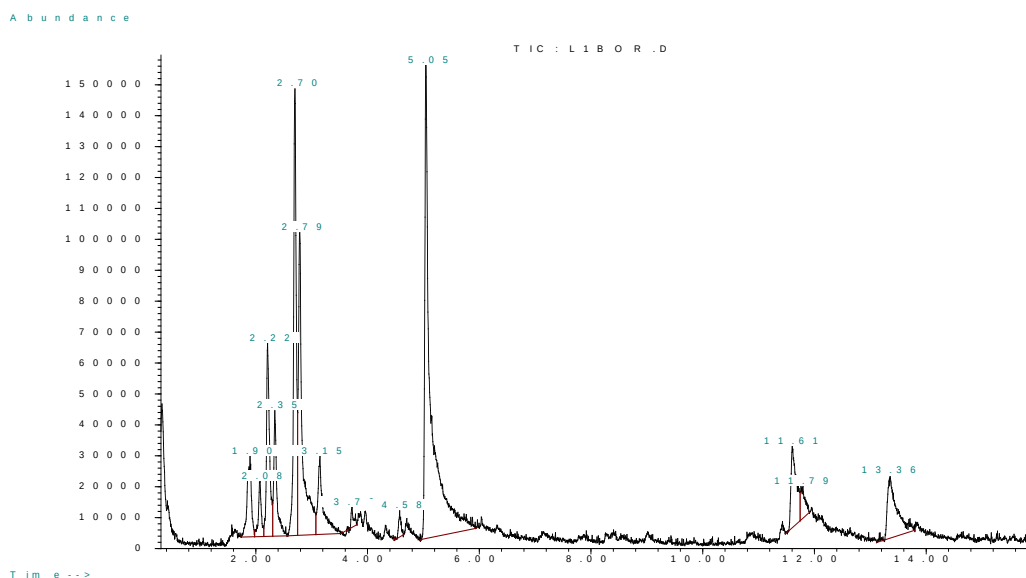
T. magnatum από την Κίνα (Zhang et al., 2016) και προέρχεται από τον καταβολισμό του αμινοξέος phenylalaline (Xiao et al., 2015). Η ουσία 2,5-hexanedione έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. melanosporum* από την Κίνα (Liu et al., 2017). Η ένωση 2-heptanone έχει ανιχνευθεί στα είδη *T. aestivum* και *T. melanosporum* (Molinier et al., 2015; Zhang et al., 2016). Παράγωγα azetidine έχουν ταυτοποιηθεί στον μύκητα *Agaricus bisporus* (Mohamed et al., 2012), αλλά όχι η 2-methylazetidine που ανιχνεύθηκε στο δείγμα TMAG.

Επιπροσθέτως, αξίζει να αναφερθεί ότι η ουσία 2-pentylfuran που ανιχνεύεται και κατατάσσεται στις ετεροκυκλικές ενώσεις, έχει βρεθεί σε αρκετά είδη του γένους *Tuber*, όπως στα *T. magnatum*, *T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. excavatum* (Díaz et al., 2003; Mauriello et al., 2004; Federico Vita et al., 2015; Zhang et al., 2016), ενώ έχει αναφερθεί ότι συντελεί στη γρήγορη ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (Angelini et al. 2015) και παρόλο που δεν είναι γνωστή η συμβίωση του συγκεκριμένου φυτού με τρούφες σύμφωνα με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν είναι αντιστοίχως γνωστό εάν η ουσία 2-pentylfuran βοηθά την ανάπτυξη των φυτών που συμβιώνουν με τις τρούφες.

5.1.5 *Tuber borchii* (TBOR)

Κατεψυγμένο δείγμα μαύρης τρούφας *Tuber borchii* (TBOR) μελετήθηκε με δυο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Ωστόσο η ανάλυση με την ίνα PDMS δεν έδωσε αποτελέσματα ενώ ακολούθως παρατίθεται η ανάλυση με την ίνα CAR/PDMS.

Χρωματογράφημα του δείγματος TBOR με την ίνα CAR/PDMS.



Πίνακας 5: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος με την ίνα CAR/PDMS

<i>Tuber borchii</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-octen-3-ol	35,56
<i>Total alcohols</i>		35,56
Aldehydes	2-methyl-2-butenal	2,70
	2-methyl-2-pentenal	0,44
	2-octenal	0,98
	3-methylbutanal	4,32
	4-pentenal	2,36
	hexanal	20,57
<i>Total aldehydes</i>		29,01
Aromatic comp.	3-methylanisole	3,93
<i>Total aromatic comp.</i>		3,93
Ketones	1-octen-3-one	3,15
	2,3-pentanedione	0,13
	2-butanone	23,65
	3-octanone	11,52
<i>Total ketones</i>		38,45
Sulfur der.	dimethylsulfide	3,76
<i>Total sulfur der.</i>		3,76

Στο δείγμα TBOR με ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκαν δώδεκα ουσίες με κύρια την 1-octen-3-ol με ποσοστό 35,56%, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Splivallo et al., 2015). Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η ουσία 2-butanone, που έχει βρεθεί ξανά σε τρούφες των ειδών *T. aestivum* και *T. brumale* (Mauriello et al., 2004) και έχει συνδεθεί με το άρωμα των ώριμων τρουφών (Díaz et al., 2003; Talou et al., 1987).

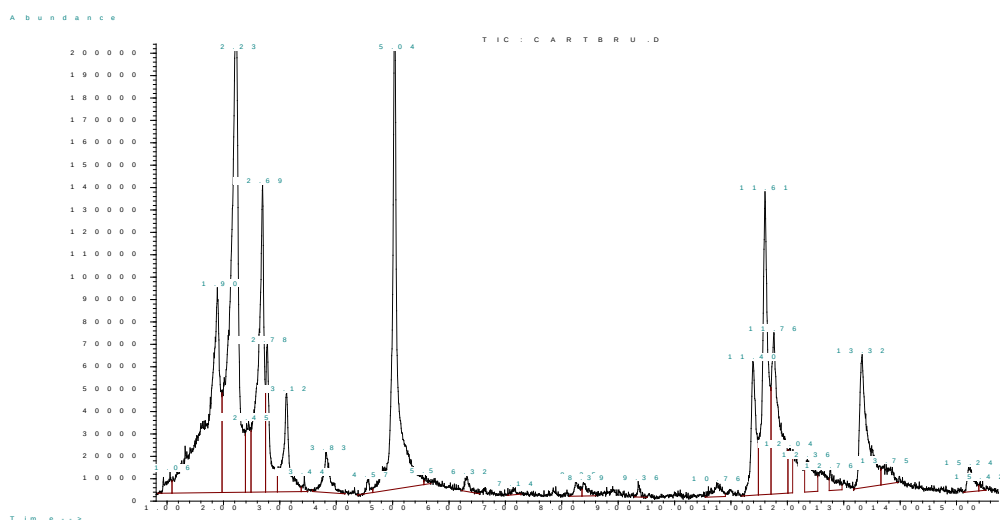
Η ουσία dimethylsulfide ταυτοποιείται **πρώτη φορά στο είδος *T. borchii***, ενώ έχει ταυτοποιηθεί ξανά στα είδη *T. melanosporum* (Díaz et al., 2003), *T. mesentericum*, *T. brumale* (Mauriello et al., 2004) και *T. uncinatum* (Schmidberger et al., 2017).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία στο συγκεκριμένο είδος ταυτοποιούνται τα θειοφαινικά παράγωγα 3-methylthiophene, 2,3-dihydro-5-methylthiophene, 2-methyl-4,5-dihydrothiophene και 3-methyl-4,5(2H)-thiophene (D'Auria et al., 2012; Zeppa et al., 2004), τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν σε αυτήν την μελέτη. Σύμφωνα με μελέτη στο είδος *T. borchii*, όπου απομονώθηκαν βακτήρια που συμβιώνουν στο καρπόσωμα του είδους, προέκυψε ότι ουσιαστικά τα βακτήρια είναι αυτά που παράγουν τα προαναφερθέντα θειοφαινικά παράγωγα (Splivallo et al., 2015).

5.1.6 *Tuber brumale* (TBRU)

Κατεψυγμένο δείγμα τρούφας *Tuber brumale* (TBRU) μελετήθηκε με δυο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη του δείγματος με την ίνα PDMS απέδωσε έξι ουσίες: 1-octen-3-ol (43,42%), 3-methylanisole (13,71%), 3-octanone (12,26%), 1-octen-3-one (8,21%), hexanal (7,20%) και 3-methylbutanal (3,29%). Ακολούθως παρατίθεται η ανάλυση με την ίνα CAR/PDMS.

Χρωματογράφημα του δείγματος TBRU με την ίνα CAR/PDMS.



Πίνακας 6: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος με την ίνα CAR/PDMS.

<i>Tuber brumale</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-octen-3-ol	14,48
	Total alcohols	14,48
Aldehydes	2-methyl-2-butenal	1,56
	2-methylbutanal	3,51
	2-octenal	0,19
	3-methylbutanal	16,28
	heptanal	0,20
	hexanal	20,57
	Total aldehydes	42,31
Alkanes	4-ethyl-2-methylhexane	1,07
Total alkanes		1,07
Alkenes	1,3-pentadiene	15,52
Total alkenes		15,52
Aromatic comp.	3-methylanisole	8,80
Total aromatic comp.		8,8
Ketones	1-octen-3-one	6,00
	2,3-pentanedione	2,90
	2-butanone	1,92
	3-octanone	6,93
Total ketones		17,75

Στο δείγμα TBRU με ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκαν δεκατέσσερες ουσίες με την hexanal να εμφανίζεται με ποσοστό 20,57%, ακολουθούμενη από τις: 3-methylbutanal (16,28%) και 1,3-pentadiene(15,52%).

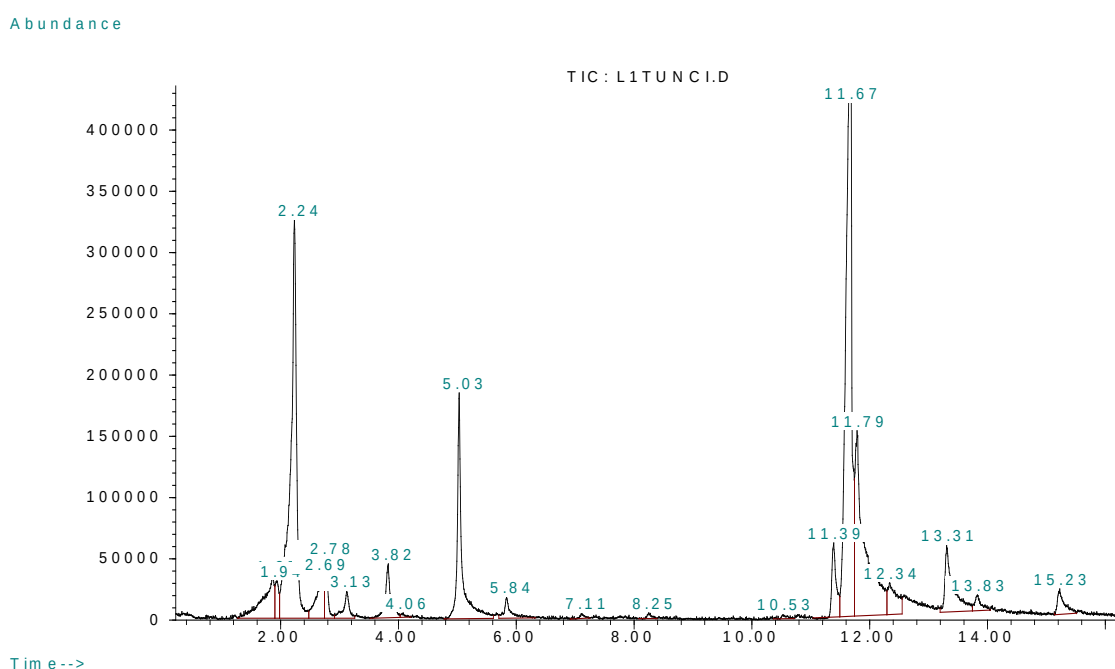
Η ουσία hexanal, που συνδέεται με την οξείδωση των λιπαρών οξέων και το χρόνο παραμονής της τρούφας σε χαμηλές θερμοκρασίες, έχει ταυτοποιηθεί ξανά σε στο είδος *T. aestivum* (Díaz et al., 2003). Η ουσία 3-methylbutanal έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. brumale* (Mauriello et al., 2004) και σε άλλα είδη τρούφας όπως *T. melanosporum* (Díaz et al., 2003) και *T. borchii* (Mauriello et al., 2004).

Η ουσία 1,3-pentadiene ταυτοποιείται **για πρώτη φορά** στο είδος *T. brumale*, ενώ έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. simonea* (March et al., 2006). Η ουσία 2-methyl-2-butenal ταυτοποιείται **για πρώτη φορά** στο είδος, αλλά έχει ανιχνευθεί ξανά στα είδη *T. aestivum*, *T. magnatum*, *T. melanosporum* και *T. borchii* (Costa et al., 2015; Díaz et al., 2003, 2009; Zeppa et al., 2004; Zhang et al., 2016). Η ουσία 2-octenal ταυτοποιείται **για πρώτη φορά** στο είδος, ενώ έχει ταυτοποιηθεί ξανά στα είδη *T. magnatum*, *T. uncinatum*, *T. aestivum* και *T. melanosporum* (Díaz et al., 2003; Schmidberger et al., 2017; Zhang et al., 2016). Η ουσία 2,3-pentanedione ταυτοποιείται **για πρώτη φορά στο είδος**, ενώ έχει ανιχνευθεί ξανά στα είδη *T. magnatum* και *T. uncinatum* (Costa et al. 2015) και παράγεται από τον καταβολισμό των σακχάρων μέσω της αντίδρασης Maillard (Duckham et al., 2001) και τέλος, η ουσία 4-ethyl-2-methylhexane ταυτοποιείται **για πρώτη φορά** στο συγκεκριμένο είδος.

5.1.7 Tuber uncinatum (TUN)

Κατεψυγμένο καρπόσωμα (TUN) δείγμα τρούφας *Tuber uncinatum* μελετήθηκε με δύο διαφορετικής πολικότητας ίνες. Η μελέτη του δείγματος με την ίνα PDMS απέδωσε δύο ουσίες: 1-octen-3-ol (22,35%) και 3-octanone (8,6%). Ακολούθως παρατίθεται η ανάλυση με την ίνα CAR/PDMS.

Χρωματογράφημα του δείγματος TUN με την ίνα CAR/PDMS.



Πίνακας 7: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος TUN με την ίνα CAR/PDMS.

<i>Tuber uncinatum</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-octen-3-ol	35,89
<i>Total alcohols</i>		35,89
Aldehydes	2-methyl-2-butenal	2,71
	2-methylbutanal	4,33
	2-methylpentenal	0,44
	2-octenal	0,98
	3-methylbutanal	4,33
	hexanal	8,74
<i>Total aldehydes</i>		21,53
Aromatic comp.	3-methylanisole	4,3
<i>Total aromatic comp.</i>		4,3
Ketones	3-octanone	11,55
	1-octen-3-one	2,92
	2,3-pentanedione	0,87
	2-butanone	23,72
<i>Total Ketones</i>		39,06
Sulfur der.	dimethylsulfide	3,5
<i>Total sulfur der.</i>		3,5

Με την ίνα CAR/PDMS ταυτοποιήθηκαν δεκατρείς ουσίες με κύριες τις 1-octen-3-ol με ποσοστό 35,89% και 2-butanone με ποσοστό 23,72%. Το συνολικό ποσοστό των C8-πτητικών ενώσεων (1-octen-3-one, 3-octanone, 2-octenal και 1-octen-3-ol) είναι 51,34%. Επίσης, ανιχνεύεται η θειούχα ουσία dimethylsulfide με ποσοστό 3,5%. Η αλδεΐδη 2-methylpentenal **ανιχνεύεται πρώτη φορά** στο συγκεκριμένο είδος. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτά με προηγούμενη μελέτη στην τρούφα *T. uncinatum* (Schmidberger et al., 2017), οι κοινές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι εξής: 1-octen-3-ol, 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 1-octen-3-one, 2-octenal και dimethylsulfide.

5.2 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu σε αιθανολικά εκχυλίσματα τρούφας

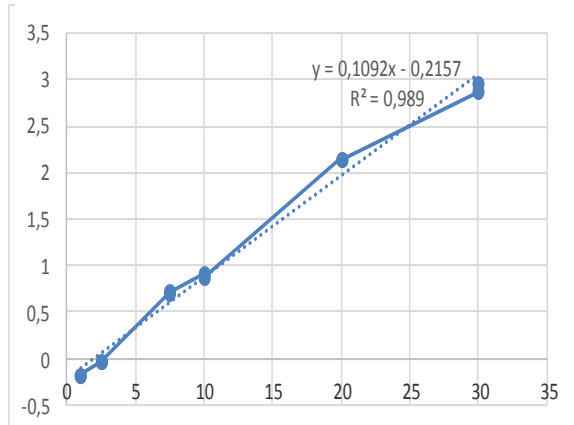
Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών (Folin & Ciocalteu, 1927) και είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος GAE (Gallic Acid Equivalence). Η μέθοδος αργότερα βελτιώθηκε από τους Singleton και Rossi (Singleton & Rossi, 1965) και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών στο κρασί. Από τότε έγινε πολύ δημοφιλής και χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών διαφόρων φυτικών συστατικών.

Το Folin-Ciocalteu είναι ένα μείγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραμικού νατρίου (Na_2O_4) και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4). Παρασκευάζεται με ανάμιξη $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, π. HCl, 85% H_3PO_4 σε ύδωρ και βράσιμο για 10 ώρες. Κατόπιν προστίθεται $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ που του δίνει το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (Singleton & Rossi, 1965). Προκαλείται οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Πρέπει να τονισθεί επίσης ότι οι φαινολικές ενώσεις για να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu απαιτούν βασικό περιβάλλον γι' αυτό πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου το pH του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό (pH=10) και αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Η απόσπαση ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαινολικού ανιόντος, το οποίο ανάγει το αντιδραστήριο σχηματίζοντας σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραιμίου χαρακτηριστικής μπλε απόχρωσης που απορροφά στο ορατό σε μήκος κύματος 725-750nm (Singleton & Rossi, 1965). Αφού η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι μία οξειδοαναγωγή, προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος και εφόσον η αντίδραση βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, το φαινολικό προφίλ που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν την μεταφορά ηλεκτρονίων (Gutfinger, 1981).

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu πραγματοποιήθηκε σε αιθανολικά δείγματα των ειδών τρούφας *T. aestivum* (TA), *T. melanosporum* (TMEL), *T. mesentericum* (TMES), *T. magnatum* (TMAG), *T. borchii* (TBOR), *T. brumale* (TBRU) και *T. uncinatum* (TUN). Το δείγμα TA είναι φρέσκο ενώ όλα τα υπόλοιπα είναι κατεψυγμένα.

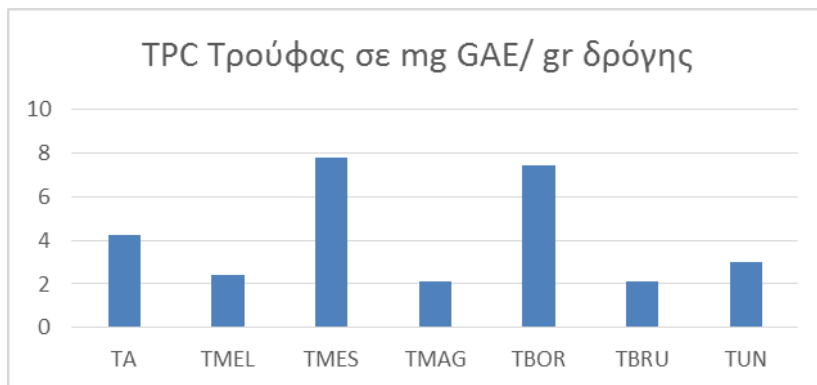
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε με βάση το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών στα δείγματα της μελέτης.



Πίνακας 8: Προσδιορισμός ολικών φαινολικών στα αιθανολικά εκχυλίσματα των δειγμάτων

Τρούφα	mg GAE/ gr εκχυλίσματος	mg GAE/ gr δρόγης
TA	63.18	4.25
TMEL	52.44	2.41
TMES	71.57	7.80
TMAG	28.75	2.11
TBOR	49.28	7.44
TBRU	40.51	2.10
TUN	56.62	3.02

Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση αποτελεσμάτων ολικών φαινολικών των αιθανολικών εκχυλίσμάτων εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/gr δρόγης.



Συμπεραίνουμε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρατηρήθηκε στο *T. mesentericum*, ακολουθούμενη από τα είδη *T. borchii*, *T. aestivum*, *T. uncinatum*, *T. melanosporum*, *T. magnatum* και *T. brumale*.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, οι ελληνικές τρούφες παρουσίασαν υπερδιπλάσια συγκέντρωση φαινολικού περιεχομένου σε σύγκριση με ισπανικά δείγματα των ειδών *T. aestivum* και *T. melanosporum* (Villares et al., 2012) και με ιταλικά δείγματα των ειδών *T. borchii* και *T. brumale* (Angelini et al., 2010).

5.3 Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Απόδοσης (MPLC) στην τρούφα *Tuber aestivum*

Το αιθανολικό εκχύλισμα του δείγματος *Tuber aestivum*, βάρους 0,5g υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (MPLC). Το δείγμα τοποθετήθηκε στη στήλη σε ξηρή μορφή αφού αναμίχθηκε με 1g silica 60H. Η στήλη είχε ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (Silica 60H), με διαστάσεις 15x460mm. Η κινητή φάση ήταν μείγμα κυκλοεξανίου- οξικού αιθυλεστέρα και εν συνεχεία μείγμα οξικού αιθυλεστέρα-μεθανόλης, σε διαφορετικές αναλογίες, όπως περιγράφονται παρακάτω. Τα κλάσματα συνενώθηκαν και ανάλογα με την χρωματογραφική τους εικόνα επιλέχθηκαν αυτά που θα μελετηθούν περαιτέρω με φασματοσκοπία NMR.

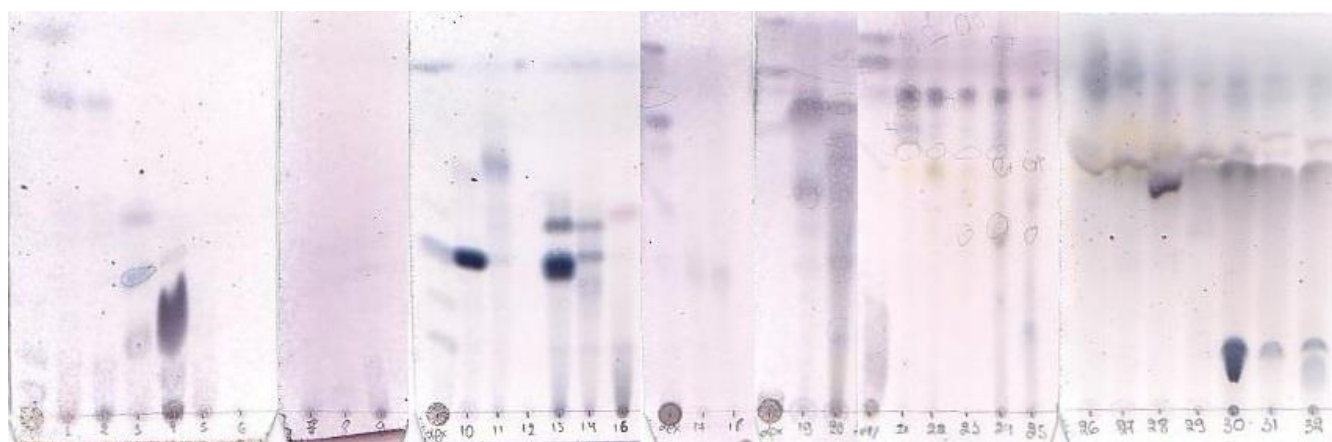
Πίνακας 10: Πίνακας συστημάτων έκλουσης και κλασμάτων

	Διαλύτες	Κλάσματα
C6- EtOAc	95:5	1-45
	90:10	46-75
	85:15	76-106
	80:20	101-136
	75:25	137-164
	70:30	166-197
	65:35	198-228
	60:40	229-249
	50:50	250-270
	25:75	271-295
	0:100	296-315
EtOAc-MeOH	80:20	316-450

Πίνακας 11: Πίνακας συνενώσεων κλασμάτων

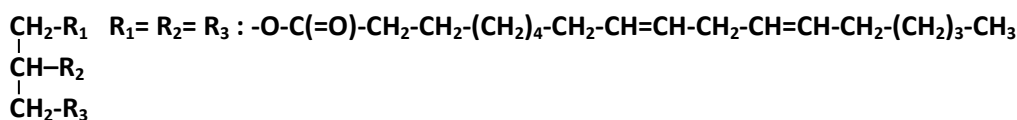
Συνένωση	Κλάσματα
MPA1	A-9
MPA2	10-11
MPA3	12-13
MPA4	14-16
MPA5	17-29
MPA6	30
MPA7	31-34
MPA8	35
MPA9	36-49
MPA10	50
MPA11	51-72
MPA12	73-75
MPA13	76-87
MPA14	88-119
MPA15	120-165
MPA16	166-304

Συνένωση	Κλάσματα
MPA17	305-313
MPA18	314-317
MPA19	318-343
MPA20	344-347
MPA21	348-353
MPA22	354-358
MPA23	359-363
MPA24	364-368
MPA25	369-380
MPA26	381-387
MPA27	388-390
MPA28	391-393
MPA29	394-405
MPA30	406-415
MPA31	416-420
MPA32	421-431



Χρωματογραφική εικόνα των συνενώσεων της στήλης MPA. Οι πλάκες TLC αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά συστήματα πολικότητας για την κατανόησή τους (TLC1 και TLC2 με C6-DCM 50-50, TLC3 με C6-EtOAc 70-30, TLC4 με EtOAc 100%, TLC5 με EtOAc-MeOH 90-10, TLC6 και TLC7 EtOAc-MeOH 60-40).

- **Trilinolein – Τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος**



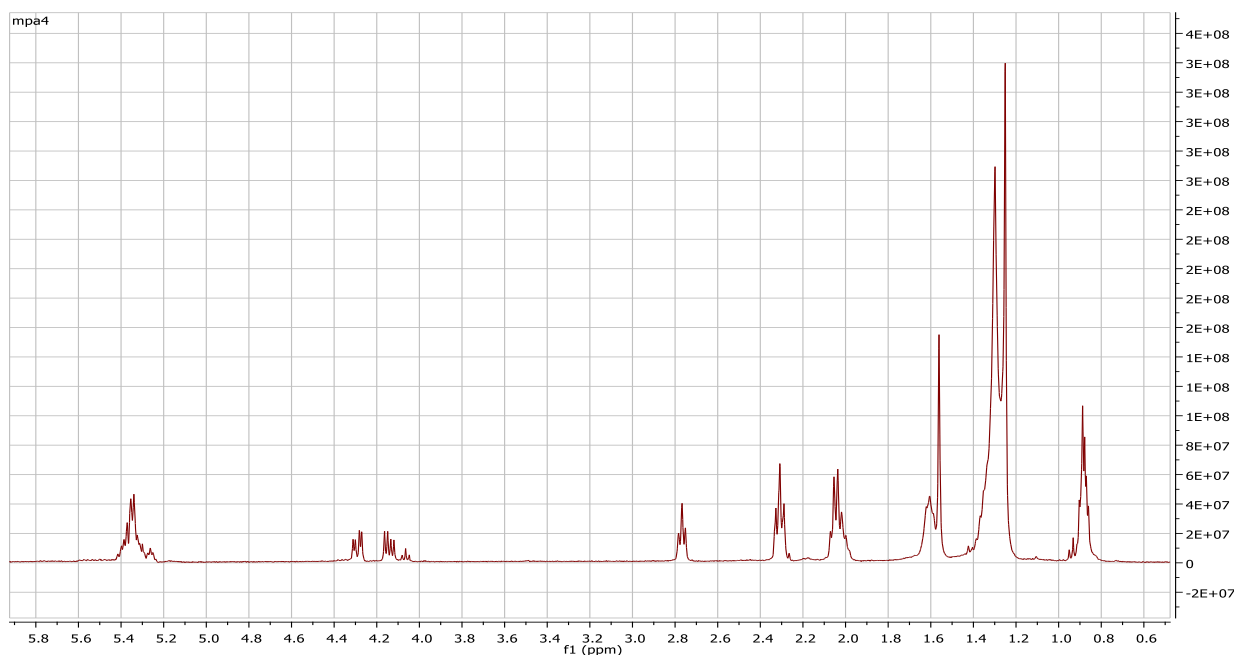
TLC του κλάσματος MPA4 ανεπτυγμένο σε TLC (Silica normal phase) με Cyclohexane: DCM (50:50)

4

Το κλάσμα MPA4 (4,6mg) έχει κίτρινο χρώμα και εμφανίζεται ως σκούρα καφέ κηλίδα σε TLC και ψεκάσμο με θειική βανιλίνη. Η φασματοσκοπική μελέτη σε δευτεριωμένο διαλύτη CDCl_3 και η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Ragasa et al., 2016) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το **τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίσθηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες υποδεικνύουν ότι η εξεταζόμενη ουσία ανήκει στην κατηγορία των τριγλυκεριδίων λιπαρών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, στην κορυφή δ 0,88 εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή τα πρωτόνια των μεθυλίων της θέσης 19. Στην περιοχή δ 1,20-1,30 εμφανίζονται τα πρωτόνια των μεθυλενίων (H-18 H-17, H-16, H-4, H-5, H-6, H-7). Τα βινυλικά πρωτόνια των διπλών δεσμών και το μεθίνιο του τριγλυκεριδίου εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή δ 5,34 (H-12, H-13, H-9, H-10 και CHO), ενώ το μεθυλένιο μεταξύ των διπλών δεσμών εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή δ 2,79 (H-11, t, $J = 6$ Hz). Οι διπλές κορυφές με δ 4,29 και 4,14 αντιστοιχούν στα τέσσερα πρωτόνια των μεθυλενίων του τριγλυκεριδίου (CH_2O , dd, $J = 4 / 12$ Hz) και (dd, $J = 6 / 12$ Hz) αντίστοιχα.

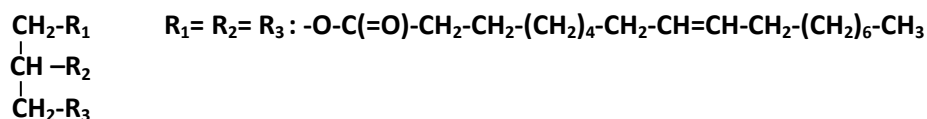
Άτομο	$^1\text{H-NMR}$
19	0,88 (m)
18,17,16,4,5,6,7	1,20-1,30 (m)
8, 14	2,04 (m)
2	2,30 (t, $J = 7.5$ Hz)
11	2,79 (t, $J = 6$ Hz)
CH_2O	4,14 (dd, $J = 4 / 12$ Hz)
CH_2O	4,29 (dd, $J = 6 / 12$ Hz)
12,13,9,10, CHO	5,34 (m)



Εικόνα 38: ^1H -NMR MPA4

Το **τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος** απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Tuber* ενώ έχει απομονωθεί ξανά από είδη μυκήτων *Agaricus bisporus* (Ragasa et al. 2016) και *Lentinus edodes* (Resurreccion et al. 2016), καθώς και σε πλήθος φυτών (Gao et al., 2018). Το συγκεκριμένο τριγλυκερίδιο έχει παρουσιάσει αντιοξειδωτική δράση (Chan et al., 2000) και προστατευτική δράση σε καρδιαγγειακές διαταραχές (Chan et al. 2002).

- **Triolein- Τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέος**



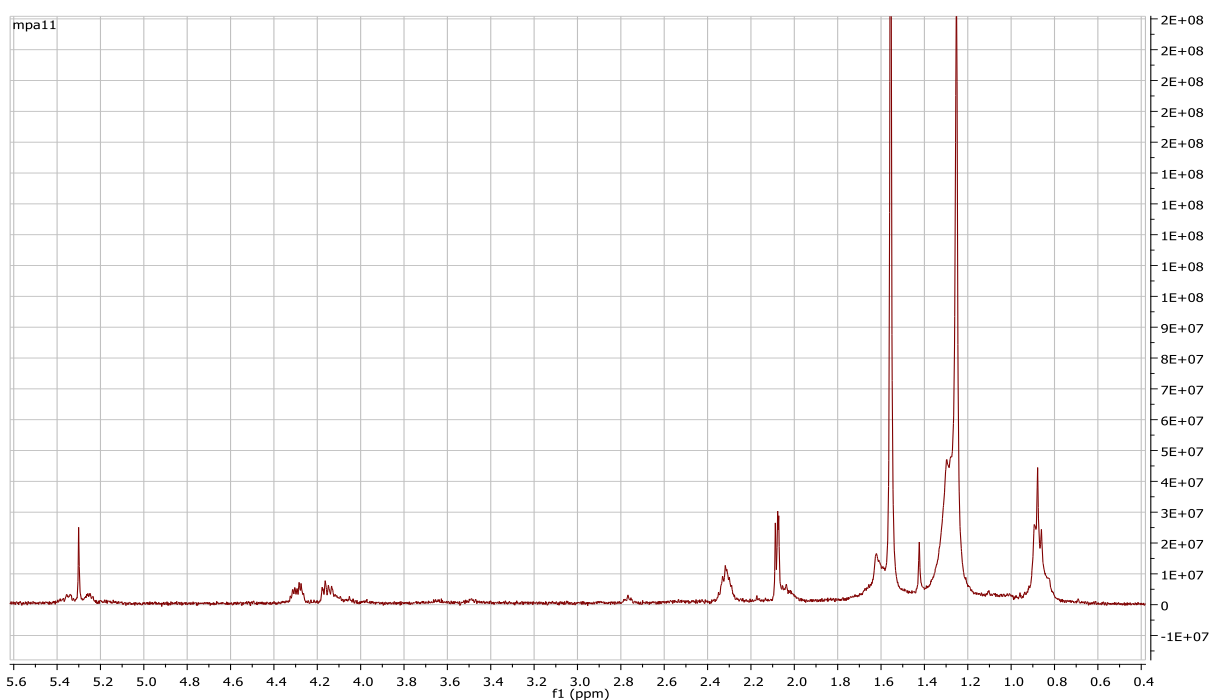
TLC του κλάσματος MPA11 ανεπτυγμένο σε σύστημα C6-EtOAc 70-30

Το κλάσμα MPA11 (1.4mg) είναι κίτρινο και παρουσιάζει αχνή μαύρη κηλίδα σε TLC Silica (normal phase) και ψεκασμό με θειική βανιλίνη. Η φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας σε δευτεριωμένο διαλύτη CDCl_3 με φάσμα ^1H -NMR σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Yaoita et al., 1998) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι το **τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέος**.

Στο φάσμα ^1H -NMR εμφανίσθηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες υπέδειξαν ότι η εξεταζόμενη ουσία ανήκει στην κατηγορία των τριγλυκεριδίων λιπαρών οξέων. Εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το

τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος με σημαντική διαφορά την απουσία της τριπλής κορυφής σε δ 2,79 που αντιστοιχεί στο μεθυλένιο μεταξύ των διπλών δεσμών του λινολεϊκού οξέος.

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$
18	0,88 (m)
4,5,6,7,12,13,14,15,16,17	1,26 (brs)
3	1,61 (m)
8,11	2,04 (q, $J = 7.0 / 14.0$ Hz)
2	2,30 (t, $J = 7.5$ Hz)
CH_2O	4,14 (dd, $J = 6 / 12$ Hz)
CH_2O	4,29 (dd, $J = 4 / 12$ Hz)
CHO	5,26 (m)
9, 10	5,34 (m, $J = 6,6$ Hz)



Εικόνα 44 $^1\text{H-NMR}$ του κλάσματος MPA 11

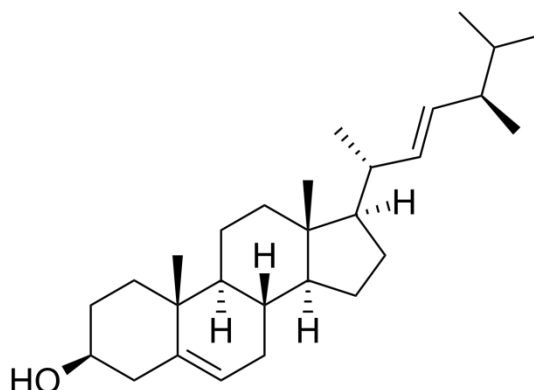
Το **τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέος** απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Tuber*. Ωστόσο έχει απομονωθεί ξανά από είδη μυκήτων *Pleurocybella porrigens* (Amakura et al., 2006) και *C. cornucopioioides* (Magnus, Laćan, Aplin, & Thaller, 1989) και από αρκετά είδη φυτών όπως το *Moringa olifera* (Mishra et al., 2011).

- **Brassicasterol - Βρασσικαστερόλη**



10

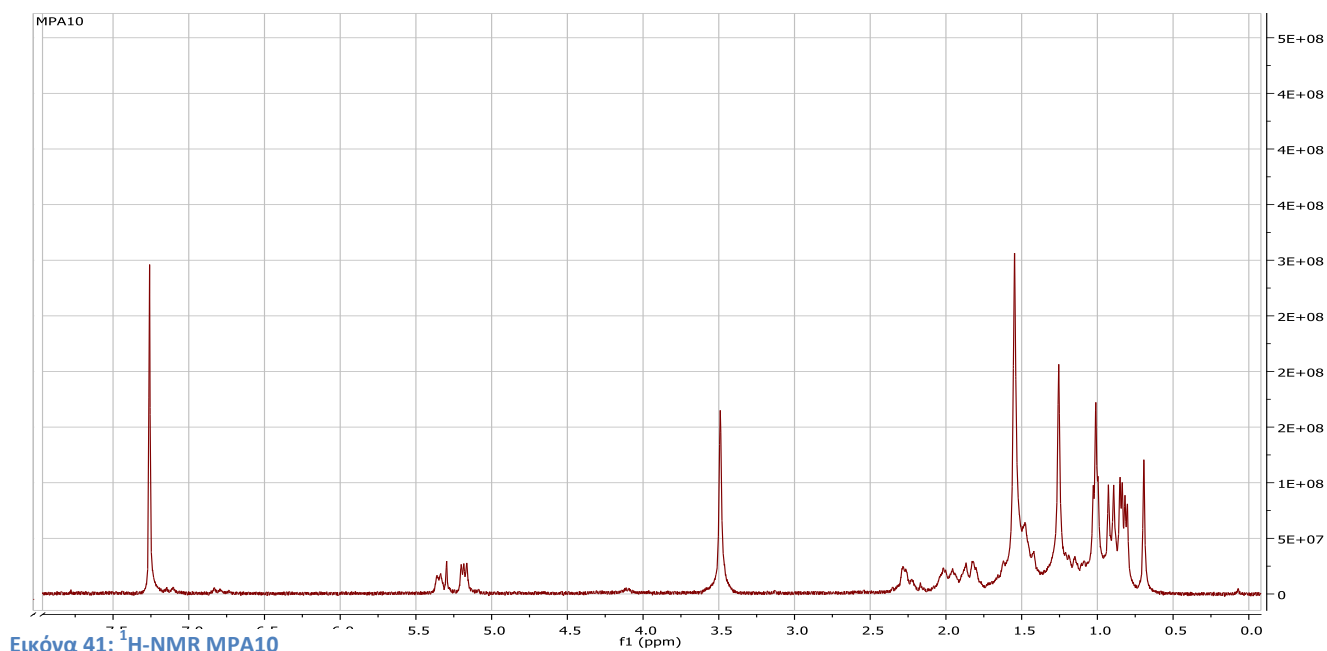
TLC MPA10 του κλάσματος
ανεπτυγμένο σε σύστημα
C6-EtOAc 70-30



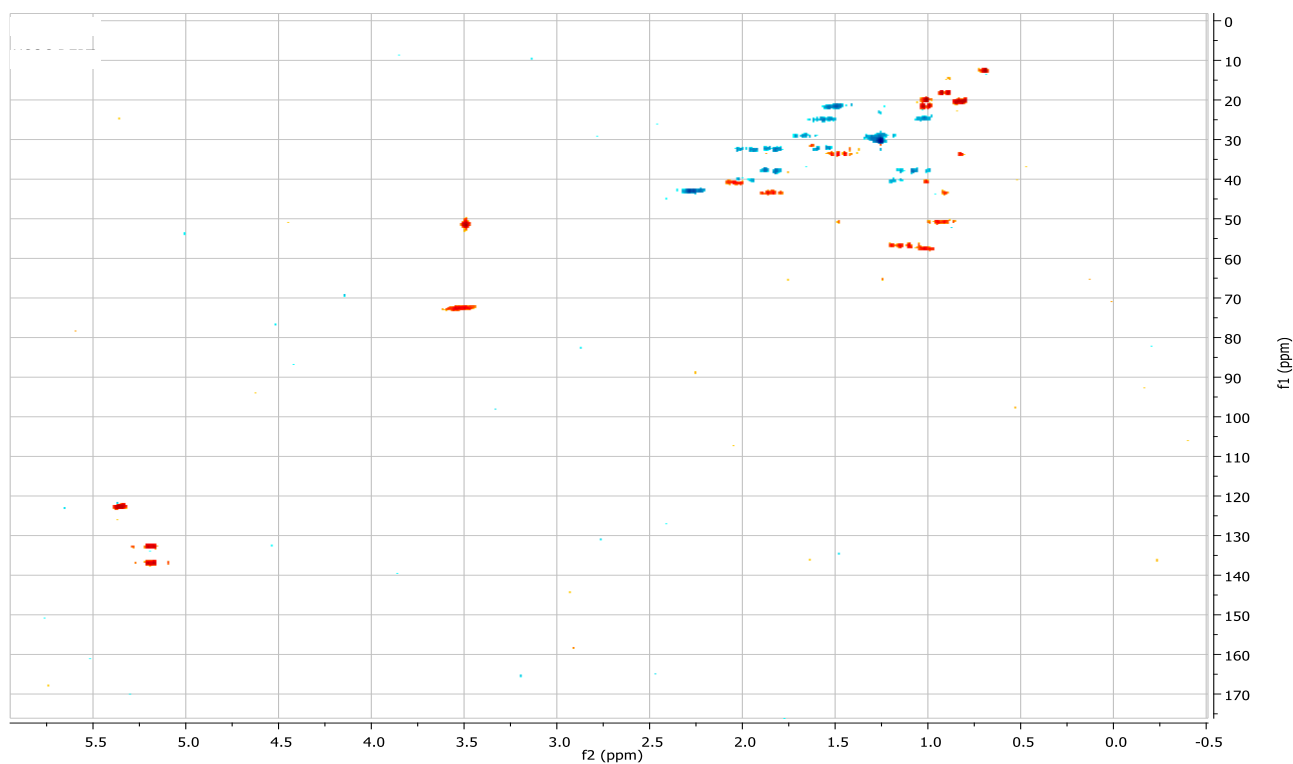
Το κλάσμα MPA10 (2,2mg) είναι άχρωμο και παρουσιάζει μαύρη κηλίδα σε TLC silica (normal phase) και ψεκασμό με θειική βανιλίνη. Η φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας σε CDCl_3 με φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και HMQC, καθώς και η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Resurreccion et al., 2016) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι είναι η ουσία ergosta-5,22-dien-3 β -ol ή αλλιώς **μπρασσικαστερόλη** που ανήκει στην χημική κατηγορία των στερολών.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίσθηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες υπέδειξαν ότι η εξεταζόμενη ουσία ανήκει στην κατηγορία των στερολών εργοστανικού τύπου. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή δ 0,69-1,01 εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των έξι μεθυλίων. Σε δ 5,35 παρουσιάζεται μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και είναι αυτό της θέσης 6 (1H,d, J = 5 Hz). Παρουσιάζεται επίσης μια τριπλή κορυφή σε δ 5,18 που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του διπλού δεσμού στις θέσεις 22 και 23 (2H, t, J = 6 Hz). Τέλος, σε δ 3.53 εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσεως 3.

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$
3	3,53 (1H, m)
6	5,35 (1H,d, J = 5 Hz)
18	0,69 (3H, s)
19	0,82 (3H, s)
21	1,00 (3H, d, J = 6,3 Hz)
22,23	5,18 (3H, t, J = 6 Hz)
26	0,83 (3H, d, J = 6,3 Hz)
27	0,90 (3H, d, J = 6,3 Hz)
28	1,01 (3H, d, J = 6,3 Hz)

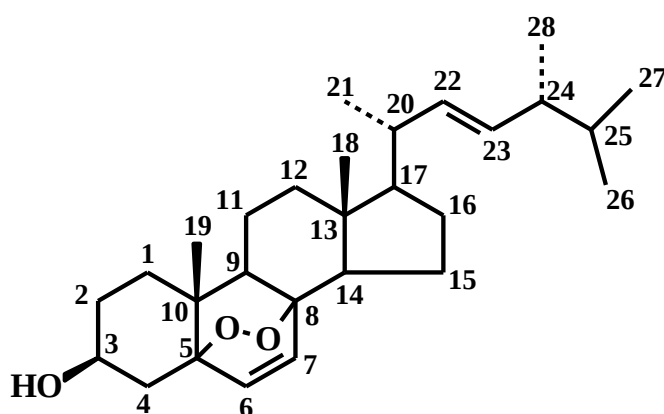


Εικόνα 41: ^1H -NMR MPA10



Η ουσία **μπρασικαστερόλη**, έχει απομονωθεί ξανά στο είδος *T. aestivum* (Mannina et al., 2004), έχει ταυτοποιηθεί στο είδος *T. melanosporum* (Harki et al., 1996) καθώς και σε άλλα είδη μυκήτων όπως στο είδος *Armillaria tabescens* (Herath et al., 2013).

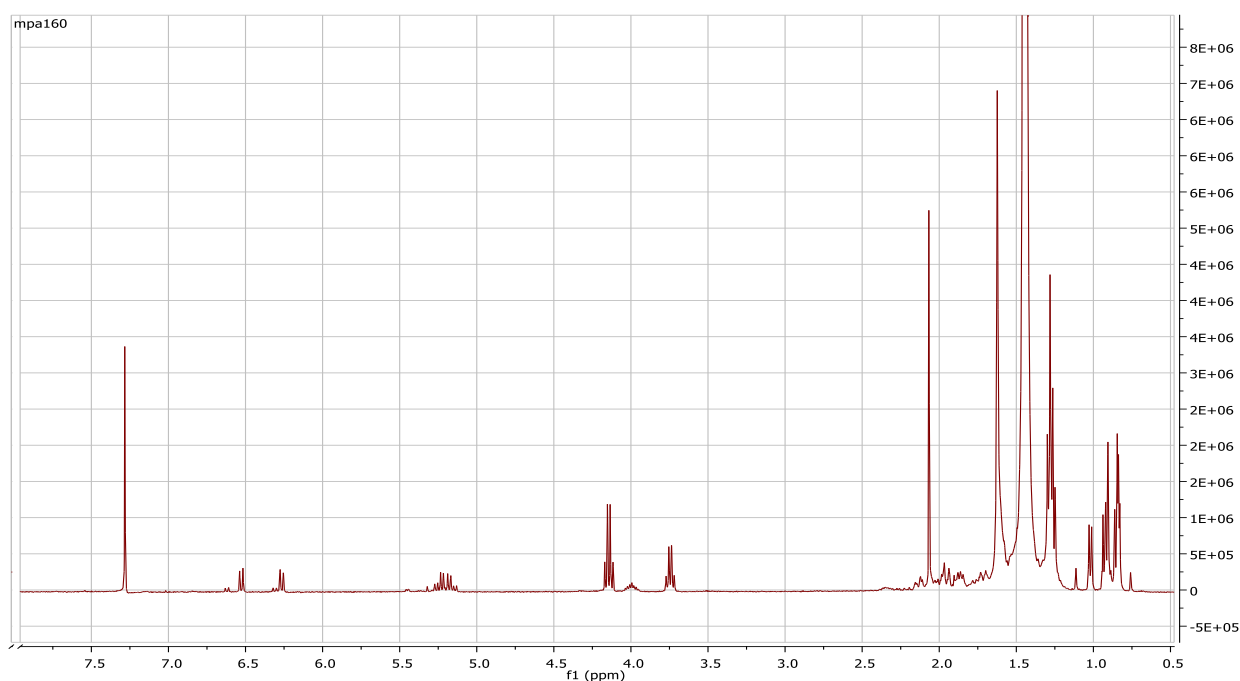
- Ergosterol-5,8-endoperoxide - 5,8-υπεροξειδίο της εργοστερόλης**



Το κλάσμα MPA15 (3,9mg) δεν έχει χρώμα και παρουσιάζει αχνή μαύρη κηλίδα σε TLC silica και ψεκασμό με θειική βανιλίνη. Μετά από τη φασματοσκοπική μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων NMR (^1H -NMR, HSQC, COSY) σε δευτεριωμένο διαλύτη CDCl_3 και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Gao et al., 2001) διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την ουσία 5 α ,8 α -Epidioxysterosta-6,22-dien-3 β -ol που είναι γνωστή ως **5,8-υπεροξειδίο της εργοστερόλης**.

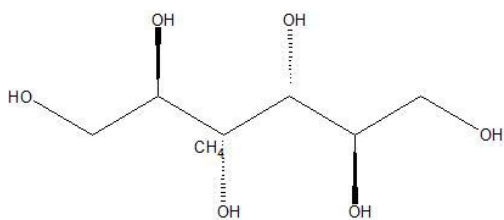
Στο φάσμα ^1H -NMR εμφανίσθηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες υπέδειξαν ότι η εξεταζόμενη ουσία ανήκει στην κατηγορία των στερολών εργοστανικού τύπου. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή δ 0.75-1.00 εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια μεθυλίων. Από αυτές οι τέσσερις είναι διπλές και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-27 (δ 0.81, J = 6.5 Hz), H-26 (δ 0.83, J = 6.6 Hz), H-28 (δ 0.91, J = 6.9 Hz) και H-21 (δ 1.00, J = 6.9 Hz), ενώ οι άλλες δύο είναι απλές και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-18 (δ 0.82) και H-19 (δ 0.88). Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται σε δ 6.51 και 6.24 δύο διπλές κορυφές με J = 8.6 Hz η κάθε μια, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων H-7 και H-6. Επίσης δύο διπλές-διπλών κορυφές [5.23 (1H, dd, J = 15.1 / 7.5 Hz), 5.14 (1H, dd, J = 15.1 / 8.0 Hz)], οι οποίες χαρακτηρίζουν το *trans* διπλό δεσμό στις θέσεις 22 και 23. Τέλος, στα 3.97 ppm εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσεως 3.

Άτομο	^1H -NMR
3	3.97 (1H, m)
6	6.24 (1H, d, J = 8.6 Hz)
7	6.51 (1H, d, J = 8.6 Hz)
18	0.82 (3H, s)
19	0.88 (3H, s)
21	1.00 (3H, d, J = 6.9 Hz)
22	5.14 (1H, dd, J = 15.1 / 8.0 Hz)
23	5.23 (1H, dd, J = 15.1 / 7.5 Hz)
26	0.83 (3H, d, J = 6.6 Hz)
27	0.81 (3H, d, J = 6.5 Hz)
28	0.91 (3H, d, J = 6.9 Hz)



Το **5,8-υπεροξείδιο της εργοστερόλης** απομονώνεται για πρώτη φορά στο γένος *Tuber*. Ωστόσο έχει απομονωθεί ξανά από τους μύκητες *Hydnum repandum* (Wang et al. 2005), *Gomphus clavatus* (Μακροπούλου et al., 2012) και τον θαλάσσιο μύκητα *Talaromyces stipitatus* (Noinart et al., 2017). Οι στερόλες με το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του 5,8-υπεροξειδίου, έχουν παρουσιάσει σε πειράματα *in vitro* αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Bu et al., 2014).

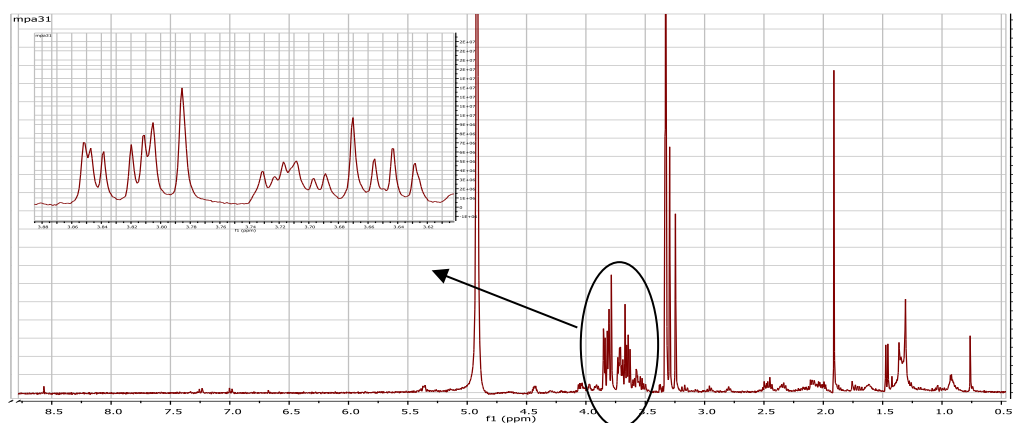
- Mannitol- Μανιτόλη**



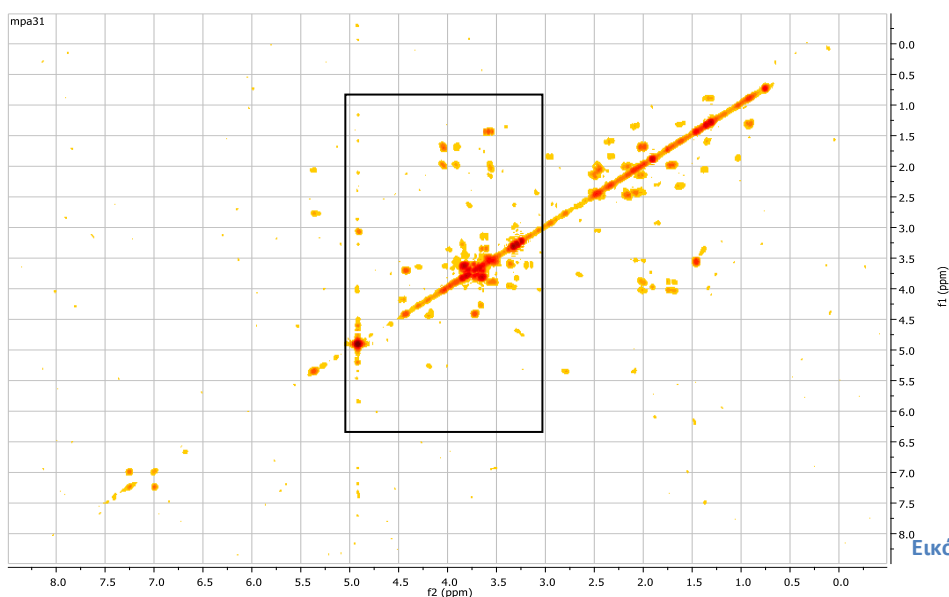
6

Το κλάσμα MPA31 έχει καφέ-κίτρινο χρώμα και παρουσιάζει καφέ κηλίδα σε TLC. Η φασματοσκοπική ανάλυση της ουσίας σε MeOD με φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και COSY, καθώς και η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Mannina et al. 2004), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το σάκχαρο μανιτόλη.

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$
1,6	3,78 - 3,84 (1H,dd, , $J = 11,7/ 2,5$ Hz)
1',6'	3,60-3,66 (1H,dd, , $J = 11/ 5,8$ Hz)
3,4	3,75 (1H, d, , $J = 8$ Hz)
2,5	3,66 (1H, m)



Εικόνα 47: $^1\text{H-NMR}$ του κλάσματος MPA31

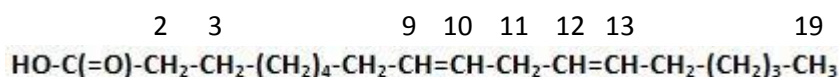


Εικόνα 48: COSY του κλάσματος MPA31

Η μανιτόλη είναι πρωτογενής μεταβολίτης που έχει απομονωθεί ξανά από την τρούφα *T. aestivum* (Mannina et al. 2004). Έχει ταυτοποιηθεί στις τρούφες *Terfezia obliensis*, *Terfezia claveryi* (Kivrak et al. 2015)] και *Tirmania pinoyi* (Stojković et al. 2013). Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί και σε είδη μανιταριών όπως στο *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Lactarius salmonicolor*, *Lactarius volemus*, *Russula delicata*, *Tricholoma imbricatum* (Kalač, 2013).

Η ουσία μανιτόλη ανήκει στα εμπορικά σκευάσματα, στην θεραπευτική κατηγορία των διουρητικών και διαγνωστικών παραγόντων για τη νεφρική λειτουργία, που δρούν μέσω της οσμωτικής διούρησης [ATC B05BC01] (Γαληνός).

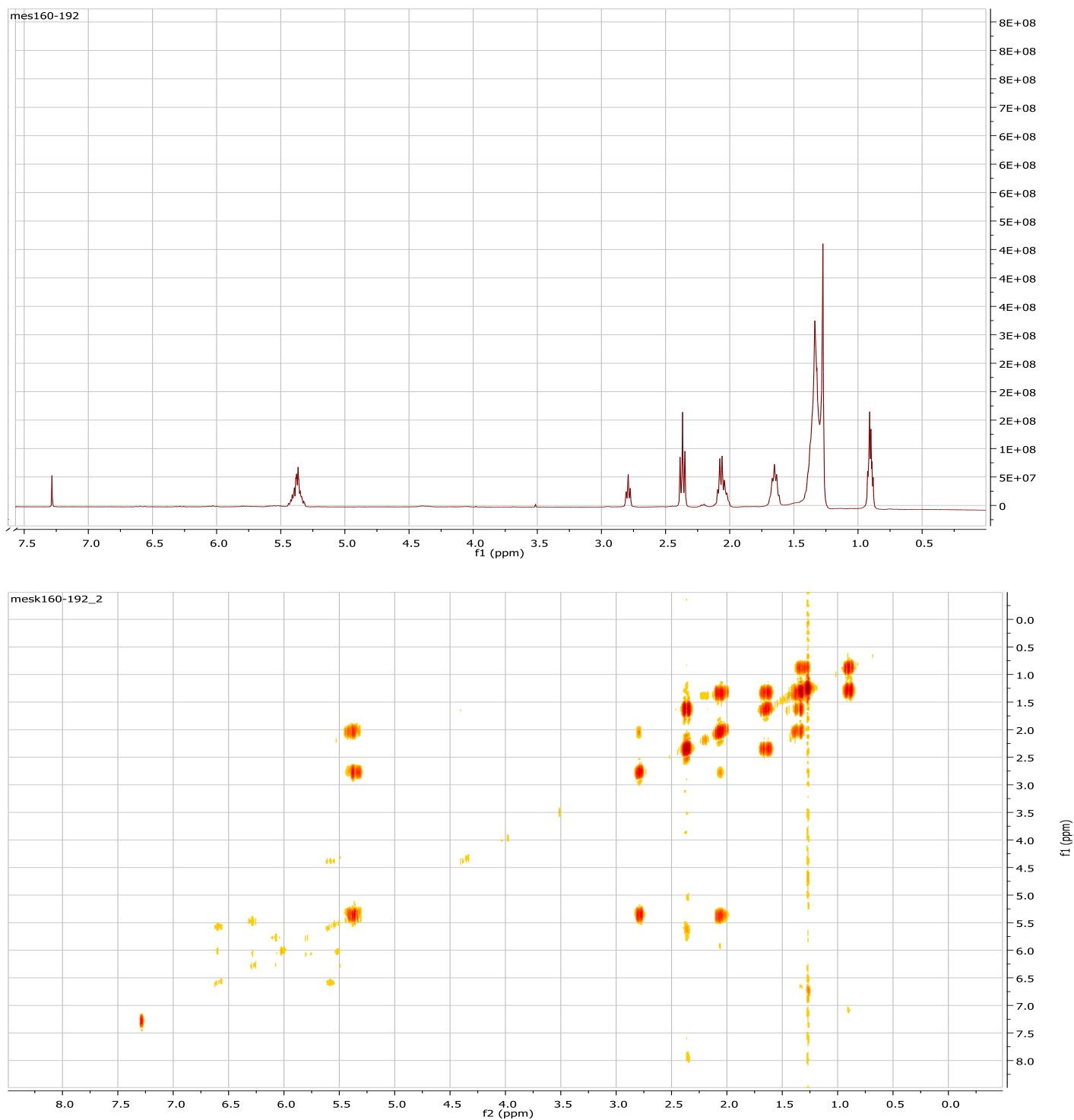
- **Linoleic acid- Λινολεϊκό οξύ**



Φασματοσκοπική μελέτη σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) με φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και COSY και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Kim et al., 2016) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το λιπαρό οξύ λινολεϊκό οξύ.

Στο φάσμα πρωτονίου του λιπαρού οξέος, σε δ 0.89 εμφανίζονται ως μια τριπλή κορυφή τα πρωτόνια του τελικού μεθυλίου και στη περιοχή σε δ 1.29-1.30 εμφανίζονται ως ευρεία απλή κορυφή τα πρωτόνια των μεθυλενίων. Τα πρωτόνια του άνθρακα 2 λόγω της γειτνίασης με την καρβοξυλομάδα εντοπίζονται σε δ 2.30, ενώ τα πρωτόνια της θέσης 3 εντοπίζονται σε δ 1.60. Τα μεθυλένια των θέσεων 8 και 14 λόγω των γειτονικών διπλών δεσμών εντοπίζονται σε δ 2.05 ως πολλαπλή κορυφή, ενώ τα ολεφινικά πρωτόνια ως πολλαπλή κορυφή σε δ 5.34.

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$
19	0,88 (3H, t, $J=7.0$ Hz)
17,16,15,4,5,6,7	1,25 (14H, ,m)
3	1.60 (2H, m)
8,14	2.10 (4H, m)
2	2.30 (2H, dd, $J=2.5/7.3$ Hz)
11	2,76 (2H, t, $J=6.4$ Hz)
12,13,9,10	5,34 (4H, m)



Το **λινολεϊκό οξύ** έχει απομονωθεί ξανά στο είδος *T. aestivum* (Mannina et al., 2004). Έχει ταυτοποιηθεί στα είδη τρούφας *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. borchii* (Angelini et al., 2015) και *T. indicum* (J. Gao et al., 2001). Επιπλέον αυτό το ω-6 λιπαρό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών όπου υποστηρίζεται πως το λινολεϊκό οξύ μεταβολίζεται από ένζυμα της επιδερμίδας, παράγοντας μεταβολίτες με αντιφλεγμονώδη δράση (Ziboh et al., 2000).

5.4 Ανάλυση δειγμάτων ελληνικών ελαίων με άρωμα τρούφας με τη μέθοδο HS-SPME/GC-MS

Όλα τα έλαια υποβλήθηκαν σε ανάλυση των πτητικών τους συστατικών μέσω της μεθόδου HS-SPME/GC-MS με την ίνα CAR/PDMS και τη Διαδικασία III. Τα έλαια τρούφών που μελετήθηκαν είναι ελληνικής προέλευσης και είναι τα εξής:

- **TO1** : Παρθένο ελαιόλαδο με άρωμα *Tuber melanosporum*
- **TO2** : Παρθένο ελαιόλαδο με άρωμα *Tuber melanosporum*
- **TO3** : Παρθένο ελαιόλαδο με άρωμα τρούφας
- **TO4** : Παρθένο ελαιόλαδο με άρωμα *Tuber magnatum*
- **TO5** : Παρθένο ελαιόλαδο με άρωμα *Tuber magnatum*



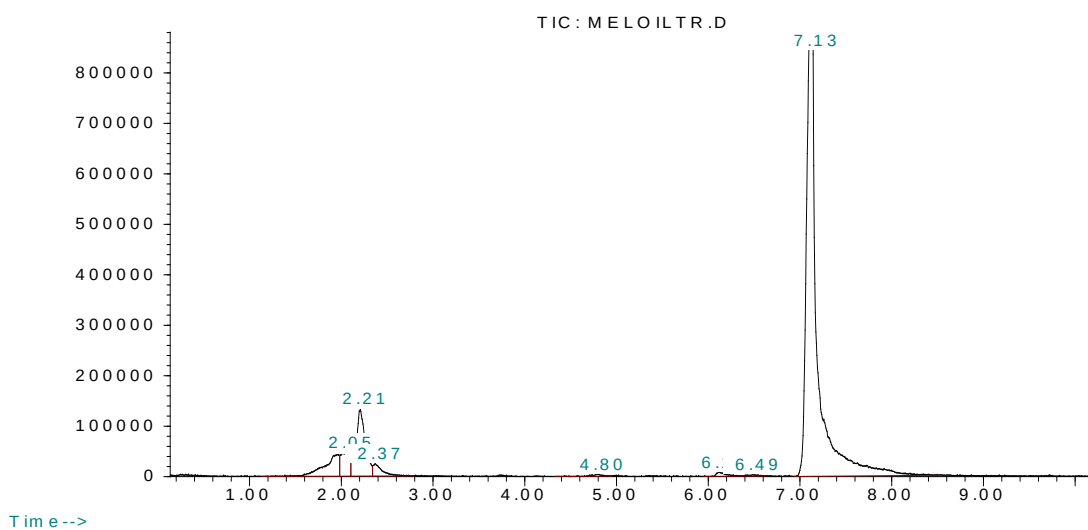
Εικόνα 46: Μέθοδος HS-SPME



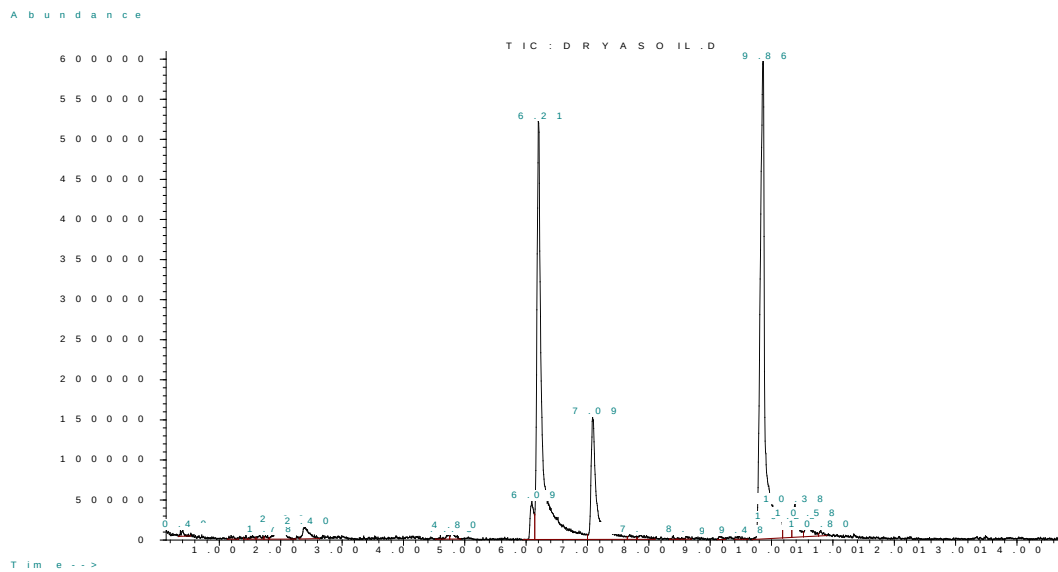
Χρωματογραφήματα των δειγμάτων με την ίνα CAR/PDMS

Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος του δείγματος TO1.

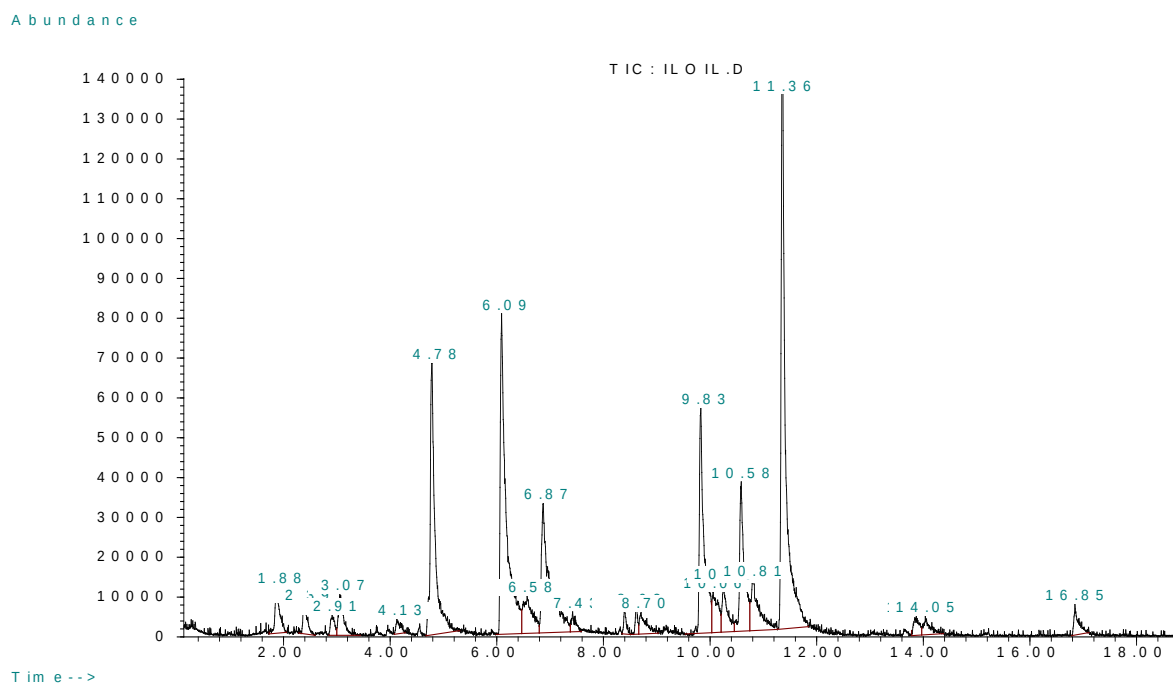
Abundance



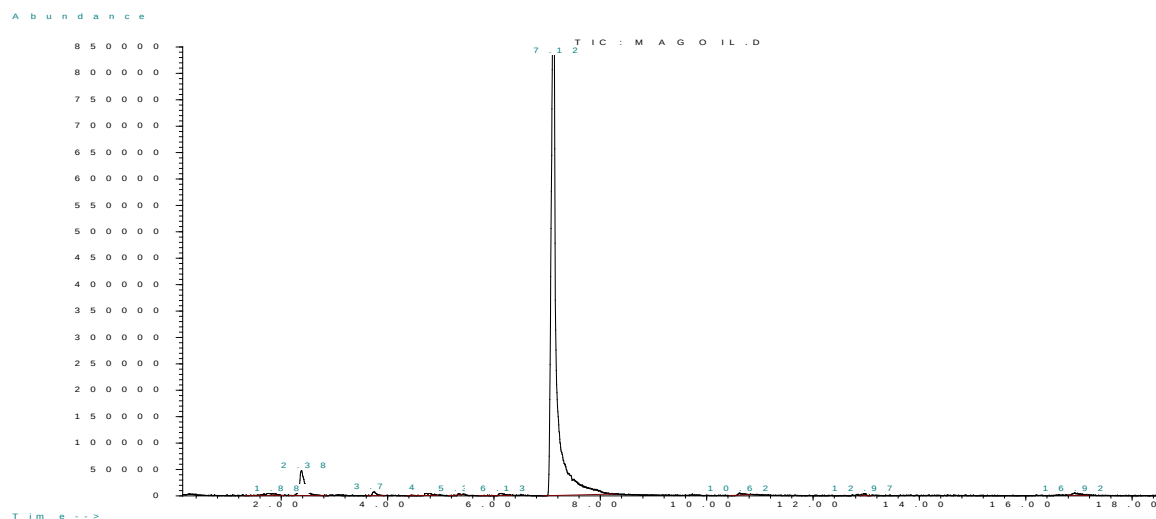
Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος του δείγματος ΤΟ2.



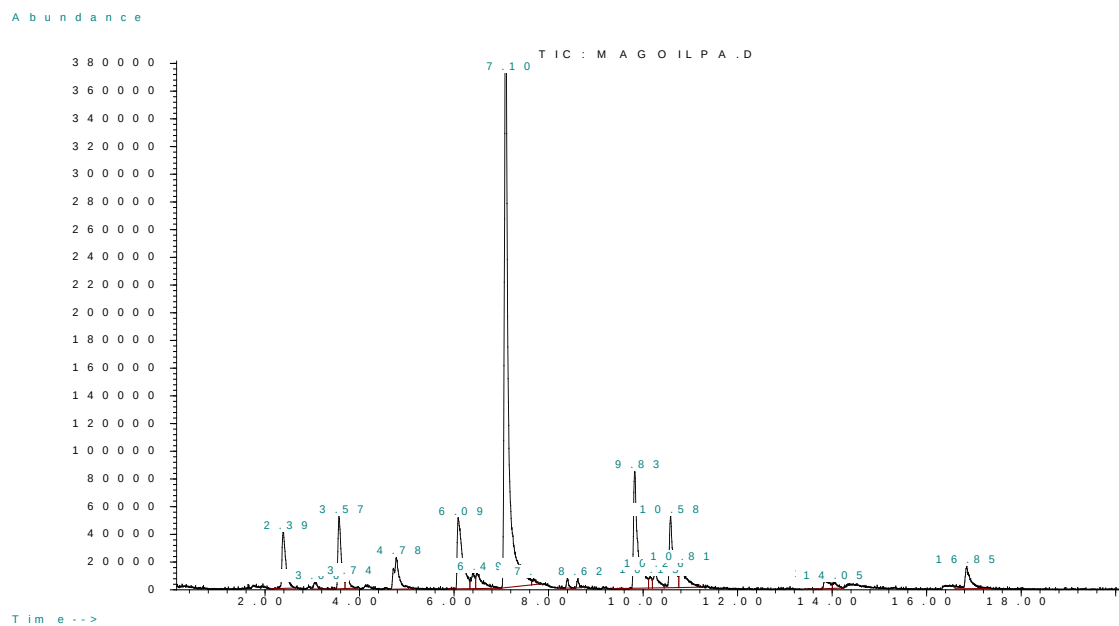
Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος του δείγματος ΤΟ3.



Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος του δείγματος ΤΟ4.



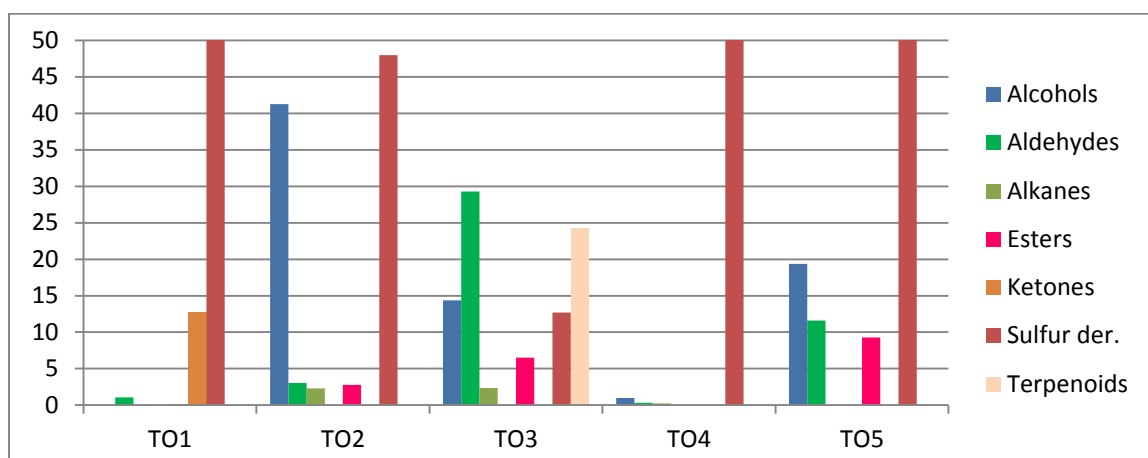
Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος από την ανάλυση του δείγματος ΤΟ5.



Πίνακας 9: Πτητικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν μέσω της μεθόδου HS-SPME με ένα CAR/PDMS στα δείγματα ελαίων

Truffle Oils						
ΔΕΙΓΜΑ		T01	T02	T03	T04	T05
Chemical class	Compound					
Alcohols	4-methylcyclohexanol	-	-	2,01	-	-
	1-decanol	-	-	-	0,59	-
	1-octen-3-ol	-	41,25	12,36	-	10,84
	1-undecanol	-	-	-	-	1,95
	3-methyl-1-butanol	-	-	-	-	4,71
	3-methylpentanediol	-	-	-	0,37	-
	cyclohexanol	-	-	-	-	1,16
	cyclooctanol	-	-	-	-	0,72
<i>Total alcohols</i>			41,25	14,37	0,96	19,38
Aldehydes	hexanal	0,36	0,82	12,23	0,34	3,45
	2-hexenal	0,69	2,21	17,06	-	7,51
	nonanal	-	-	-	-	0,62
<i>Total aldehydes</i>		1,05	3,03	29,29	0,34	11,58
Alkanes	1-methoxy hexane	-	-	-	0,04	-
	2,4-dimethyl hexane	-	-	-	0,18	-
	2-methyl butane	-	-	2,34	-	-
	decane	-	2,29	-	-	-
<i>Total alkanes</i>			2,29	2,34	0,22	
Alkadienes	3-ethyl-1,5-octadiene	-	-	0,6	-	-
	2-methyl-1,3-pentadiene	-	-	-	0,3	0,46
<i>Total alkadienes</i>				0,6	0,3	0,46
Esters	4-hexenol acetate	0,11	-	-	-	-
	3-hexenol acetate	-	1,64	6,52	-	6,09
	acetic acid, decyl ester	-	1,16	-	-	-
	acetic acid, hexyl ester	-	-	-	-	3,19
<i>Total esters</i>		0,11	2,8	6,52		9,28
Ketones	2-butanone	12,73	-	-	-	-
<i>Total ketones</i>		12,73				
Sulfur der.	1-propanethiol	1,78	1,34	-	4,49	4,92
	2,4-dithiapentane	78,25	-	10,59	91,95	48,92
	diallyl sulfide	-	36,1	-	-	-
	allyl isothiocyanate	-	8,89	-	-	-
	carbon disulfide	-	-	2,11	-	-
	dimethyldisulfide	-	-	-	0,55	0,94
	dimethylsulfide	4,74	-	-	-	-
	monomethyl carbotrithioate	-	1,65	-	-	-
<i>Total sulfur der.</i>		84,77	47,98	12,7	96,99	54,78
Terpenoids	limonene	-	-	24,26	-	-
<i>Total terpenoids</i>				24,26		

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, σε ό,τι αφορά τη χημική σύσταση ελαίων τρούφας, είναι ευρέως γνωστό, αυτά τα εμπορικά προϊόντα παράγονται με την προσθήκη συνθετικών αρωματικών ουσιών σε παρθένο ελαιόλαδο, με σκοπό το τελικό προϊόν να προσομοιάσει στο φυσικό άρωμα της τρούφας που δηλώνεται στη συσκευασία του προϊόντος.



Στο συγκριτικό γράφημα που παρατίθεται, ξεχωρίζει η υψηλή συγκέντρωση θειούχων ενώσεων στα μελετηθέντα έλαια τρούφας. Ιδιαίτερα στα δείγματα TO1, TO2, TO4, TO5 το ποσοστό των θειούχων ενώσεων υπερβαίνει το 45% του συνολικού αρώματος του ελαίου με την ουσία 2,4-dithiapentane να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό. Σύμφωνα με τη μελέτη των πτητικών συστατικών της τρούφας που προηγήθηκε αλλά και διεθνείς αναφορές, η ουσία 2,4-dithiapentane είναι η χαρακτηριστική του καρποσώματος *T. magnatum* (Martin et al., 2010). Ωστόσο η εν λόγω ουσία εμφανίζεται στην ανάλυση που έγινε και στο έλαιο του *T. melanosporum*, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι η κύρια αρωματική ουσία που έχει προστεθεί στο ελαιόλαδο για να προσδώσει άρωμα τρούφας στο εμπορικό προϊόν.

Στα έλαια TO2, TO3, TO4 και TO5 ταυτοποιούνται αλκοόλες με συνολική συγκέντρωση από 1% έως 41%. Κοινή ένωση που παρατηρείται στα δείγματα TO2, TO3 και TO5 είναι η 1-octen-3-ol, όπου στο δείγμα TO2 εμφανίζει συγκέντρωση 41,25%. Η ουσία 1-octen-3-ol έχει ανιχνευθεί στα είδη *T. melanosporum* και *T. magnatum*, αλλά όχι σε τόσο υψηλή συγκέντρωση όπως στο εμπορικό έλαιο τρούφας TO2 που αναλύθηκε.

Επιπλέον, παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα, εκτός του TO3, ταυτοποιήθηκε η ουσία 1-propanethiol, που έχει βρεθεί ξανά σε *T. magnatum* (Vita et al., 2015). Η συγκέντρωσή της είναι παρόμοια στα έλαια TO1 και TO2 που σημαίνουν ως έλαια τρούφας *T. melanosporum* και αντίστοιχα στα TO4 και TO5 που σημαίνουν ως έλαια τρούφας από *T. magnatum*.

Παρατηρώντας τις υπόλοιπες θειούχες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, ξεχωρίζουν οι diallyl sulfide, allyl isothiocyanate και carbon disulfide. Η ένωση diallyl sulfide φαίνεται να είναι από τις χαρακτηριστικές ενώσεις του σκόρδου (*Allium* spp.) (Block et al., 2010), ενώ η ένωση allyl isothiocyanate φαίνεται να είναι από τις χαρακτηριστικές πτητικές ουσίες της μουστάρδας (*Brassica nigra*, Brassicaceae) (Kask et al., 2016). Τέλος, μόνο στο δείγμα TO3 ανιχνεύεται το τερπένιο limonene (24,26%), χαρακτηριστικό της οσμής των εσπεριδοειδών, που έχει ανιχνευθεί ξανά σε έλαια τρούφας *T. melanosporum* και *T. magnatum* (Torregiani et al., 2017). Αυτές οι συνθετικές αρωματικές ουσίες είναι κατανοητό ότι προστίθενται για να ενισχύσουν εκτός της οσμής και την φρέσκια και πικαντική γεύση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων εμπορικών προϊόντων.

6.1 Ανάλυση δειγμάτων μανιταριών Ελληνικής και Πολωνικής προέλευσης με τη μέθοδο HS-SPME

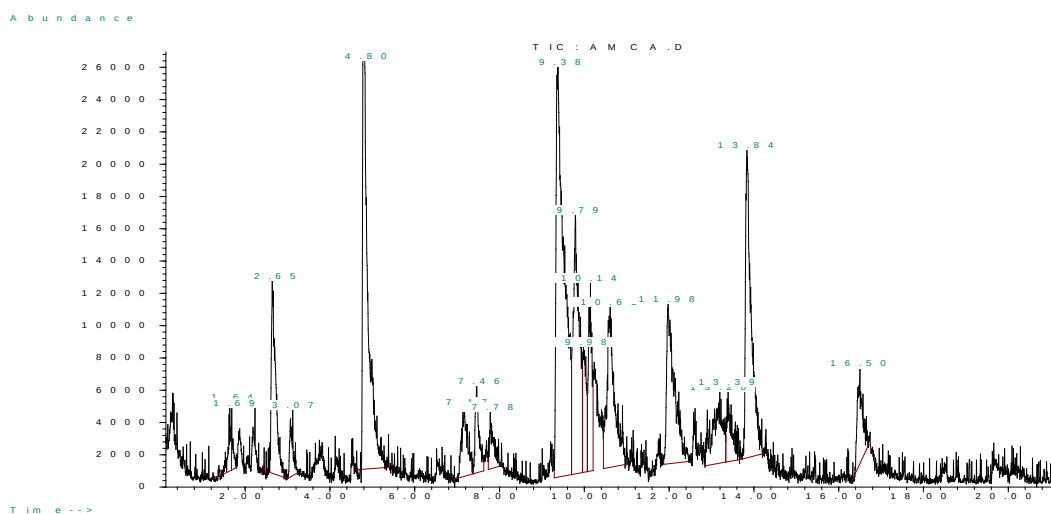
Όλα τα μελετηθέντα είδη μανιταριών (*A. caesarea*, *M. oreades*, *C. cornucopioides*, *B. edulis*, *M. procera*) υποβλήθηκαν σε ανάλυση των πτητικών τους συστατικών με τη μέθοδο HS-SPME/GC-MS, με ίνα CAR/PDMS και τη Διαδικασία II.

Παρακάτω φαίνονται οι κωδικοί των δειγμάτων που αναλύθηκαν

ΕΙΔΟΣ	HS-SPME
<i>A. caesarea</i>	A1
<i>M. oreades</i>	A2
<i>C. cornucopioides</i>	A3
<i>B. edulis</i>	B1
<i>M. procera</i>	B2

6.1.A Ελληνικά μανιτάρια

6.1.A1 Χρωματογράφημα του *Amanita caesarea*



Πίνακας 12: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος A1

<i>Amanita caesarea</i>		A1
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Aldehydes	3-methylbutanal	4,82
	acetaldehyde	4,15
	heptanal	1,95
	hexanal	13,98
	nonanal	10,18
	octanal	7,04
	pentanal	1,11
Tota aldehydes		43,23

Aromatic comp.	3-methylanisole	2,41
	benzaldehyde	21,99
	phenylacetaldehyde	7,2
<i>Total aromatic comp.</i>		31,6
Esters	benzoic acid, methyl ester	5,85
<i>Total esters</i>		5,85

Στο δείγμα A1 ταυτοποιήθηκαν έντεκα πτητικές ουσίες, με την ουσία benzaldehyde να εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση με ποσοστό 21,99% και να έπονται οι hexanal (13,98%) και nonanal (10,18%).

Το συνολικό ποσοστό της χημικής ομάδας των αλδεϋδών (43,23%) καθορίζει το άρωμα του δείγματος και οι ουσίες hexanal, octanal, nonanal και 3-methylbutanal που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία έχουν ταυτοποιηθεί ξανά σε μελέτη πτητικών συστατικών που πραγματοποιήθηκε σε ελληνικό δείγμα *A. ceasarea* (Ouzouni et al, 2009). Επιπροσθέτως οι αλδεϋδες pentanal, hexanal, heptanal, octanal και nonanal έχουν συνδεθεί με την οξείδωση λινολεϊκού και ολεϊκού οξέος (Belitz et al., 2009).

Η παρουσία της ουσίας benzaldehyde έχει συνδεθεί με την διαδικασία ξήρανσης του μύκητα (Hui et al., 2010) ενώ **πρώτη φορά στο είδος** ταυτοποιείται η ένωση benzoic acid methyl ester.

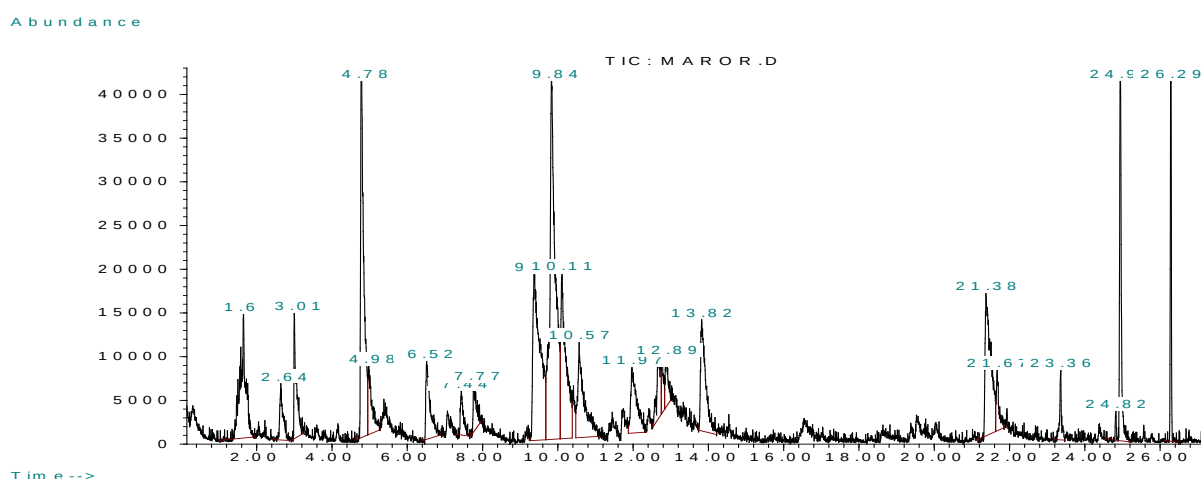
Ακολούθως παρουσιάζονται οι κύριες ουσίες που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα, συγκριτικά με ανάλυση που έγινε σε φρέσκο δείγμα από τα Ζαγοροχώρια της Ηπείρου (Ouzouni, 2009).

Πίνακας 13 Ποιοτική σύγκριση των κύριων ουσιών του δείγματος με βιβλιογραφικά δεδομένα

Ουσίες	A1	Ουζούνη 2009
1-octen-3-ol	-	31.23
3-methylbutanal	4.82	2.97
hexanal	13.98	1.16
benzaldehyde	21.99	0.18
3-octanone	-	41.71

Συγκρίνοντας τις δύο αναλύσεις, παρατηρούνται ποιοτικές ομοιότητες αλλά και ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές που μπορούν να αποδοθούν στη μελέτη των δειγμάτων με διαφορετικής πολικότητας ίνα καθώς και ότι το δείγμα της παρούσας μελέτης είναι αποξηραμένο ενώ της (Ouzouni, 2009) ήταν φρέσκο.

6.1.A2 Χρωματογράφημα του *Marasmius oreades*

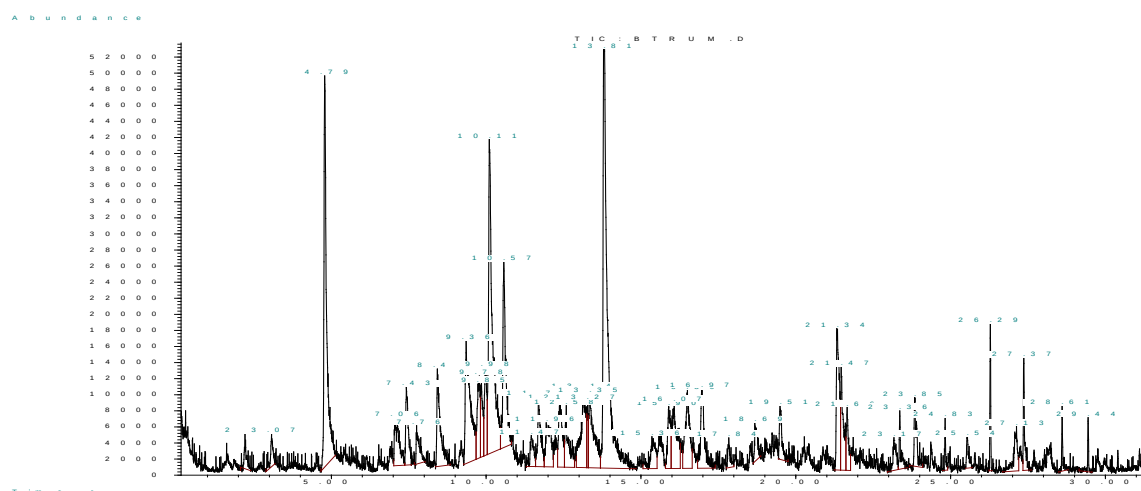


Πίνακας 14: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος A2

<i>Marasmius oreades</i>		
		A2
Χημική ομάδα	Ουσίες	CAR/PDMS
Alcohols	1-hexanol	2,65
	1-octen-3-ol	13,79
	2-ethyl-3-hexen-1-ol	0,85
	<i>Total Alcohols</i>	<i>17,29</i>
Aldehydes	acetaldehyde	0,23
	hexanal	10,78
	heptanal	1,04
	octanal	3,3
<i>Total Aldehydes</i>		<i>15,35</i>
Alkadienes	1,3-octadiene	1,02
<i>Total alkadienes</i>		<i>1,02</i>
Alkanes	2-methylnonane	0,46
<i>Total alkanes</i>		<i>0,46</i>
Aromatic comp.	phenylacetaldehyde	3,03
	2-pentylfuran	5,77
	benzaldehyde	8,31
<i>Total aromatic comp.</i>		<i>23,02</i>
Cyclic comp.	cycloheptane	3,9
<i>Total cyclic comp.</i>		<i>3,9</i>

Στο δείγμα του μανιταριού *Marasmius oreades* (A2), ταυτοποιήθηκαν δεκατρείς πτητικές ενώσεις, με κύριες τις 1-octen-3-ol (13,79%), hexanal (10,78%) και benzaldehyde (8,31%). Κυρίαρχη θέση στο αρωματικό προφίλ του είδους έχουν οι ενώσεις με αρωματικό δακτύλιο (23,02%) με κυριότερη την benzaldehyde που προκύπτει, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κατά τη διάρκεια της ξήρανσης του μύκητα (Hui et al., 2010). Οι C8-πτητικές ενώσεις: 1-octen-3-ol και octanal, με συνολικό ποσοστό (17,09%) προσδίδουν τη χαρακτηριστική μυρωδιά στο μανιτάρι αυτό (Combet et al., 2006). Οι ουσίες που ανιχνεύονται **πρώτη φορά** στο είδος *Marasmius oreades* είναι οι εξής: 2-ethyl-3-hexen-1-ol, 2-methyl-nonane, cycloheptane, phenyl-acetaldehyde και 1,3-octadiene. Η ουσία 1,3-octadiene έχει ταυτοποιηθεί ξανά στο είδος *Pleurotus osteratus* (Roussos et al., 2003).

6.1.A3 Χρωματογράφημα στο δείγμα *Craterellus cornucopioides*



Πίνακας 15: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος A3

<i>Craterellus cornucopioides</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	A3 CAR/PDMS
Aldehydes	butanal	0,61
	decanal	2,63
	heptanal	1,6
	hexanal	8,55
	nonanal	15,64
	octanal	4,59
	pentanal	0,66
	<i>Total Aldehydes</i>	<i>34,28</i>
Aromatic comp.	benzaldehyde	6,31
	phenylacetaldehyde	1,83
	<i>Total Aromatic comp.</i>	<i>8,14</i>
Cyclic comp.	1,4-dimethyl-2-methylenecyclohexane	0,89
	1-methyl-4-methylene cyclohexane	1,79
	cycloheptane	1,44
	<i>Total cyclic comp.</i>	<i>4,12</i>
Heterocycles	2-pentylfuran	9,95
<i>Total heterocycles</i>		<i>9,95</i>
Ketones	2-hexanone	1,77
	2-octanone	2,75
	3-hepten-2-one	2,77
	3-octen-2-one	1,82
	2-undecanone	1,13
	<i>Total Ketones</i>	<i>10,24</i>

Στο δείγμα A3, ταυτοποιήθηκαν δέκα οκτώ πτητικές ουσίες με κύριες τις αλδεΐδες nonanal (15,64%) και hexanal (8,55%) καθώς και την ετεροκυκλική ένωση 2-pentylfuran (9,95%). Οι αλδεΐδες κυριαρχούν στο αρωματικό προφίλ του μύκητα με συνολικό ποσοστό 34,28% ενώ η αρωματική ένωση benzaldehyde που ανιχνεύεται σε ποσοστό 6,3% έχει αναφερθεί επίσης σε προηγούμενη μελέτη γαλλικού δείγματος (Fons et al., 2003).

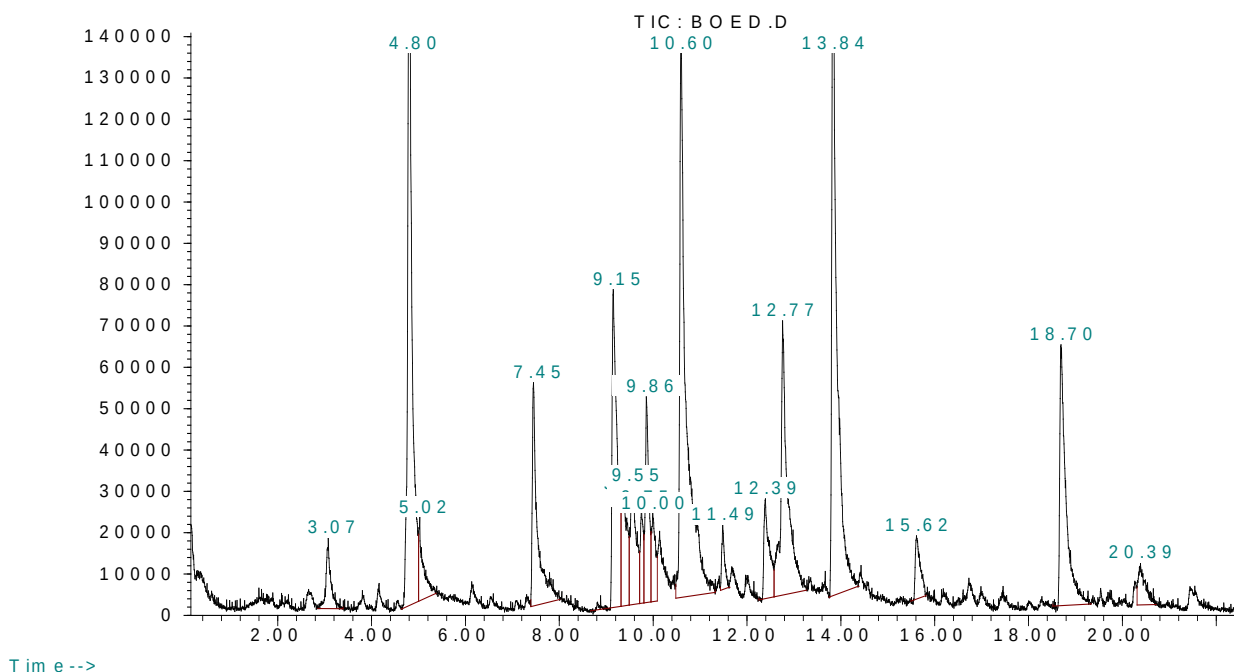
Επιπλέον ανιχνεύεται ποικιλία C8-πτητικών ενώσεων, δηλαδή των 3-octen-2-one, 2-octanone και octanal, που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στο άρωμα μανιταριού (Combet et al., 2006).

6.1.B Μανιτάρια Πολωνικής προέλευσης

6.1.B1 Χρωματογράφημα του δείγματος *Boletus edulis*

Χρωματογράφημα 25: Απεικόνιση Αέριου Χρωματογραφήματος του δείγματος B1

Abundance



Πίνακας 16: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος B1

Boletus edulis		
Χημική ομάδα	Ουσίες	B1 CAR/PDMS
Alcohols	1-octanol	5,29
	1-octen-3-ol	2,59
	Total alcohols	7,88
Aldehydes	2,4-decadienal	1,7
	2,4-nonadienal	1,59
	2-decenal	7,42
	2-heptenal	7,75
	2-hexenal	0,6
	2-nonenal	1,39
	2-octenal	2,53
	3-methylbutanal	1,34
	heptanal	4,32
	hexanal	17,62
	nonanal	13,6
	octanal	20,64
	Total aldehydes	79,5
Alkadienes	3-ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene	0,78
Total alkadienes		0,78
Aromatic comp.	benzaldehyde	2,76
Total aromatic comp.		2,76

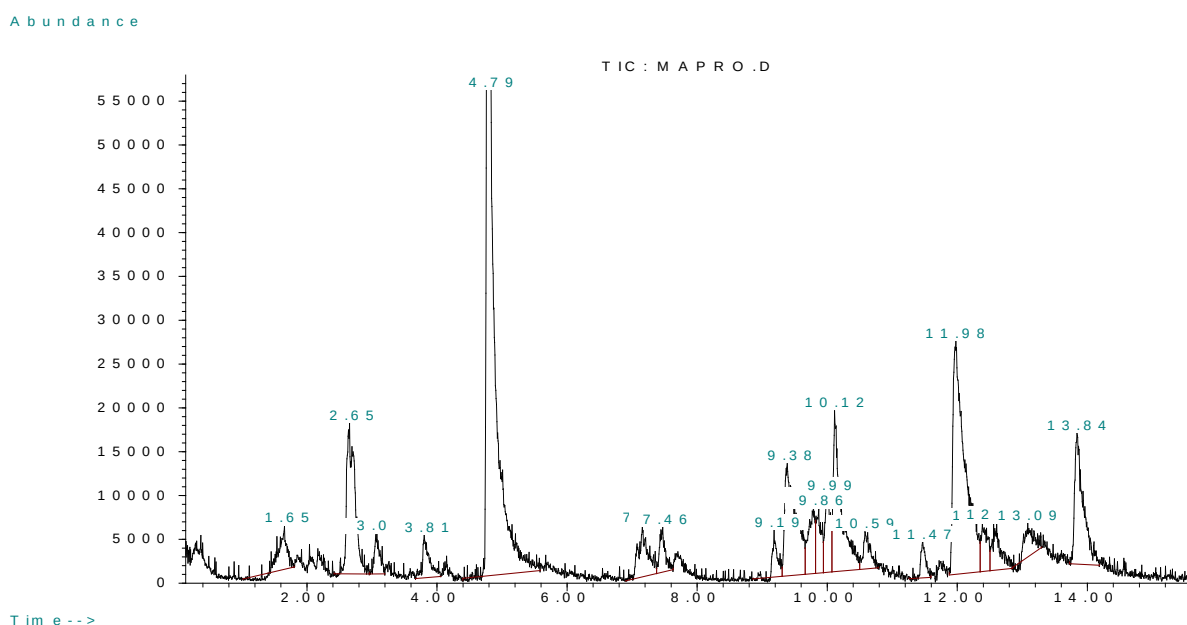
Στο δείγμα B1 ταυτοποιήθηκαν δεκαέξι πτητικές ουσίες με κύριες τις αλδεΐδες octanal (20,64%), hexanal (17,62%) και nonanal (13,6%). Οι αλδεΐδες με συνολικό ποσοστό 79,50% κυριαρχούν στο αρωματικό προφίλ του μύκητα και πολλές από αυτές όπως οι 2,4-decadienal, 2,4-nonadienal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-nonenal, 2-decenal, hexanal, heptanal και octanal έχουν συνδεθεί με την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος, ενώ οι 2-hexenal και 2-heptenal με την οξείδωση του λινολενικού

οξέος και οι ουσίες nonanal, decanal και 2-decenal με την οξείδωση του ολεϊκού οξέος (Belitz et al., 2009).

Οι C8-πτητικές ουσίες 1-octanol, 1-octen-3-ol, octanal και 2-octenal συγκεντρώνουν ποσοστό 24% και όπως αναφέρθηκε πολλές φορές στην μελέτη αυτή, οι ουσίες αυτές έχουν συνδεθεί με τη χαρακτηριστική οσμή των μανιταριών (Combet et al., 2006).

Η ουσία 3-ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene, που έχει ταυτοποιηθεί ξανά σε αυτό το είδος μανιταριού, με την τεχνική της ηλεκτρονικής μύτης (Electronic nose) και αέριας χρωματογραφίας (GC-MS), έχει ταυτοποιηθεί και σε πολλά άλλα είδη μανιταριών όπως *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus abalonus*, *Agrocybe aegirit*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa* και *Coprinus comatus* (Zhou et al., 2015).

5.1.B2 Χρωματογράφημα στο δείγμα *Macrolepiota procera*



Πίνακας 17: Ταυτοποιημένες πτητικές ουσίες του δείγματος B2

<i>Macrolepiota procera</i>		
Χημική ομάδα	Ουσίες	B2 CAR/PDMS
Aldehydes	2-heptenal	0,93
	3-methylbutanal	5,63
	acetaldehyde	2,34
	heptanal	0,75
	hexanal	23,52
	nonanal	4,44
	octanal	1,03
	pentanal	1,17
Total aldehydes		39,81
Aromatic comp.	acetophenone	1,83
	benzaldehyde	8,15
	phenylacetaldehyde	12,62
	styrene	1,63

Total aromatic comp.		24,23
Heterocycles	2-pentylfuran	4,96
Total heterocycles		
Ketones	3-octanone	1,61
Total ketones		1,61
Sulfur der.	3-methylthiopropional	0,75
	benzoyl isothiocyanate	0,97
Total sulfur der.		1,72

Στο δείγμα B2 ταυτοποιήθηκαν δεκαέξι πτητικές ενώσεις με κύριες τις: hexanal (23,52%), phenylacetaldehyde (12,62%) και benzaldehyde (8,15%). Κυρίαρχο ρόλο στο αρωματικό προφίλ και αυτού του δείγματος έχουν οι αλδεΐδες με συνολικό ποσοστό 39,83% και οι ουσίες με αρωματικό δακτύλιο με συνολικό ποσοστό 24,23%. Οι αλδεΐδες pentanal, hexanal, heptanal, 2-heptenal, octanal και nonanal είναι γνωστό πως είναι προϊόντα οξείδωσης του λινολεϊκού οξέος (Belitz et al., 2009).

Όσον αφορά τις αρωματικές ενώσεις, η ουσία acetophenone ταυτοποιείται **πρώτη φορά** στο είδος *Macrolepiota procera*, ενώ έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *Leccinum chromapes* (Gruber et al., 2014). Η αρωματική ένωση styrene ταυτοποιείται για **πρώτη φορά** στο είδος, ενώ έχει ανιχνευθεί στο *Craterellus cornucopioides* (Fons et al., 2003) ενώ η αρωματική ένωση phenylacetaldehyde ανιχνεύεται για **πρώτη φορά** στο είδος, και έχει ταυτοποιηθεί ξανά στα είδη *Agaricus bisporus* (MacLeod et al., 1983), *Ganoderma pefeffferi* (Al-Fatimi et al., 2016) και *Tuber aestivum* (Díaz et al., 2009).

Οι θειούχες ενώσεις συγκεντρώνουν το συνολικό ποσοστό 1,72% και ταυτοποιούνται για **πρώτη φορά** στο είδος. Πιο συγκεκριμένα, η ουσία 3-methylthiopropional έχει ανιχνευθεί ξανά στο είδος *T. aestivum* (Díaz et al., 2009) ενώ η ουσία benzoyl isothiocyanate έχει ανιχνευθεί ξανά στον αποξηραμένο μύκητα *Agaricus bisporus* (MacLeod et al., 1983).

Ακολούθως παρατίθενται οι κύριες ουσίες που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα, συγκριτικά με ανάλυση που έγινε σε φρέσκο δείγμα από την περιοχή Ζαγοροχώρια της Ηπείρου (Ouzouni, 2009).

Πίνακας 18 Ποιοτική σύγκριση των κύριων ουσιών του δείγματος με βιβλιογραφικά δεδομένα

Ουσίες	B2	Ουζούνη 2009
hexanal	23.52	6.22
3-octanone	1.61	74.77
3-methylthiopropional	0.75	-
3-octanol	-	4.49
phenylacetaldehyde	12.62	-

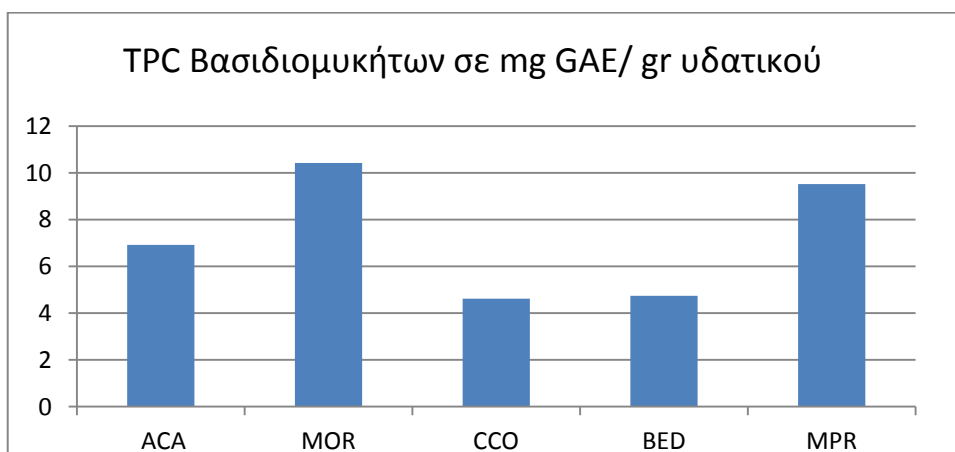
Συγκρίνοντας τις δύο αναλύσεις, παρατηρούνται ποιοτικές και ποσοτικές ομοιότητες και διαφορές που μπορούν να αποδοθούν στη μελέτη των δειγμάτων με διαφορετικής πολικότητας ίνα, καθώς και ότι το δείγμα της παρούσας μελέτης είναι αποξηραμένο ενώ της υπό σύγκριση μελέτης ήταν φρέσκο.

5.3 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και τη χρήση γαλλικού οξέος σε υδατικά εκχυλίσματα μυκήτων ελληνικής και πολωνικής προέλευσης

Στο παρακάτω Διάγραμμα (5) παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε με βάση το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών στα δείγματα της μελέτης

Μύκητες	mg GAE/ gr ξηρού εκχυλίσματος
<i>A. caesarea</i>	6,92
<i>M. oreades</i>	10,43
<i>C. cornucopioides</i>	4,62
<i>B. edulis</i>	4,75
<i>M. procera</i>	9,53

Πίνακας 19: TPC Σε υδατικά εκχυλίσματα Ελληνικών και Πολωνικών μανιταριών εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος ανά gr ξηρού εκχυλίσματος.



Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί παγκοσμίως ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ερευνών σχετικά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μυκήτων, ενώ για την Ελλάδα είναι η πρώτη μελέτη που πραγματοποιείται σε υδατικό εκχύλισμα μυκήτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν ως προς την περιεκτικότητα των μανιταριών σε ολικά φαινολικά συστατικά, συμπεραίνουμε ότι η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών στους μύκητες Ελληνικής προέλευσης παρατηρήθηκε στο *M. oreades*, ενώ ακολουθούν τα *A. caesarea* και *C. cornucopioides*. Η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών στα εξεταζόμενα Πολωνικά δείγματα παρατηρήθηκε στο *M. procera* και ακολούθησε το είδος *B. edulis*.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπου οι μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε υδατικά εκχυλίσματα μανιταριών, με αποτελέσματα μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας, φαίνεται ότι το ελληνικό δείγμα *A. caesarea* παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών σε σχέση με το Ισπανικό δείγμα (Ramirez-Anguiano et al., 2007) ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα των ειδών *C. cornucopioides* και *M. oreades* της παρούσας εργασίας παρουσιάζουν επίσης μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικού περιεχομένου από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των ιδίων ειδών ισπανικού και ινδικού δείγματος (Ramirez-Anguiano et al., 2007; Puttaraj et al., 2006).

Όσον αφορά στα πολωνικά μανιτάρια *B. edulis* και *M. procera* φαίνεται να έχουν μικρότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε σύγκριση με Ισπανικό (Ramirez-Anguiano et al., 2007) και Ινδικό δείγμα (Puttaraj et al., 2006).

Συμπεράσματα μελέτης

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν έντεκα είδη μανιταριών, προερχόμενα από έξι διαφορετικά γένη (*Tuber*, *Amanita*, *Marasmius*, *Craterellus*, *Boletus* και *Macrolepota*). Επιλέχθηκαν φρέσκα, κατεψυγμένα και αποξηραμένα δείγματα για την μελέτη.

Αρχικά, έγινε **για πρώτη φορά ανάλυση του αρωματικού προφίλ ελληνικών τρουφών** του γένους *Tuber*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο HS-SPME με δύο διαφορετικής πολικότητας ίνες σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας (GC-MS). Ομοιότητες μεταξύ των προφίλ των δειγμάτων παρουσιάστηκαν ανάμεσα στα είδη *T. aestivum* με *T. uncinatum*, γεγονός που συμβαδίζει με την **διεθνή ταξινόμηση** (βλ. γενικό μέρος σελ.29).

Οι ουσίες που χαρακτηρίζουν τα μελετηθέντα είδη τρούφας είναι κυρίως θειούχες ενώσεις, αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες και οι πιο χαρακτηριστικές ουσίες είναι οι 1-octen-3-ol, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, dimethylsulfide και 2,4-dithiapentane. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν **78 πτητικές ουσίες, εκ των οποίων οι 19 ανιχνεύονται για πρώτη φορά στα μελετηθέντα είδη:**

***T. aestivum*:** decanol, 2,3-pentanedione

***T. melanosporum*:** 3-triethoxymethyl-3-buten-1-ol, 2-methylbutane, methyl isobutyl sulfide

***T. mesentericum*:** 4-pentenylacetate, 1,2-propanedithiol

***T. magnatum*:** butanedial, 2-propenamine, spiro[3.3] heptadiene, 2-ethylidenecyclohexanone, 1,3-bis(3-phenoxyphenoxy)benzene, 2,2-dimethylaziridine, 2-methylazetidine, 4-methyl-2,3-dihydrofuran

***T. brumale*:** 1,3-pentadiene, 4-ethyl-2-methylhexane

***T. uncinatum*:** 2-methylpentenal

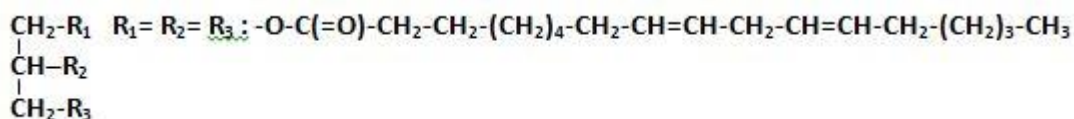
Το αρωματικό προφίλ των μελετηθέντων τρουφών **συγκρίθηκε ποιοτικά με την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία** και τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής: το άρωμα των τρουφών *T. aestivum* και *T. melanosporum* έμοιαζε αρκετά με αυτό των ισπανικών δειγμάτων, το άρωμα των *T. magnatum* και *T. brumale* έμοιαζε με τα ιταλικά δείγματα ενώ το άρωμα του *T. borchii* διέφερε πολύ σε σύγκριση με το ιταλικό δείγμα. Η μελέτη περιορίστηκε μόνο στην ποιοτική σύγκριση, διότι η πλειονότητα των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν κατεψυγμένα ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία είναι φρέσκα.

Κάθε είδος έχει συγκεκριμένες ενώσεις που το διαφοροποιούν στην ανθρώπινη όσφρηση, καθώς και κάθε είδος επηρεάζεται από ένα πλήθος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, όπως η γεωγραφική περιοχή που έχει συλλεχθεί, ο γονότυπός της και το μικροβίωμα που συμβιώνει εντός και εκτός του καρποσώματός του. Η μελέτη αυτή διεξήχθη κυρίως σε κατεψυγμένα καρποσώματα τρουφών, αλλά και σε ένα φρέσκο δείγμα (*Tuber melanosporum*), προκειμένου να διεξαχθούν **συμπεράσματα για τις αλλαγές που επέρχονται στην τρούφα κατά την κατάψυξή της**. Η σύγκριση μεταξύ φρέσκης και κατεψυγμένης δρόγης του προαναφερθέντος είδους, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το άρωμα της τρούφας επηρεάζεται άμεσα από την στιγμή που συλλέγεται από το φυσικό της περιβάλλον. Έτσι, το άρωμα που οσφραίνεται ο συλλέκτης έχει μεγάλη διαφορά σε σχέση με εκείνο του καταναλωτή, λόγω του γρήγορου καταβολισμού σακχάρων, πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και ενζύμων κατά τη διάρκεια της συντήρησης και της κοπής της τρούφας. Επιπλέον, στη μελέτη των κατεψυγμένων ειδών παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση θειούχων ενώσεων, χαρακτηριστικών για το άρωμα της τρούφας. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες *Splivallo et al.*, το μικροβίωμα που συμβιώνει στην επιφάνεια και στο εσωτερικό της τρούφας, είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το άρωμα που εκλύεται. Ωστόσο, το μικροβίωμα αυτό αλλάζει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της τρούφας αλλά και κατά τη διάρκεια της συντήρησής της. Συνεπώς,

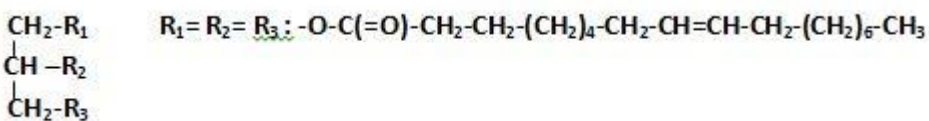
το άκρως ευαίσθητο άρωμα της τρούφας μεταβάλλεται συνεχώς και η μελέτη του πραγματικού αρώματός της κατά την φυσική διαβίωσή της στο δάσος αποτελεί πρόκληση.

Στη συνέχεια, διεξήχθη προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου στα αιθανολικά εκχυλίσματα όλων των τρουφών, όπου αναδείχθηκαν με υψηλότερη περιεκτικότητα τα είδη *T. mesentericum* και *T. borchii* ακολουθούμενα από τα *T. aestivum*, *T. uncinatum*, *T. melanosporum*, *T. magnatum* και *T. brumale*. Από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα, παρατηρείται **υπερδιπλάσια συγκέντρωση φαινολικού φορτίου στα ελληνικά εκχυλίσματα των τρουφών *T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. borchii* και *T. brumale* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα σε ισπανικά και ιταλικά καρποσώματα.**

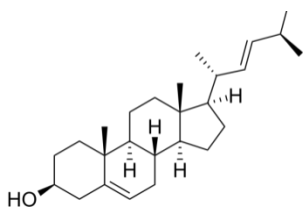
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν διαδικασίες εκχύλισης, απομόνωσης και καθορισμού δομής μεταβολιτών από τη φρέσκια τρούφα *Tuber aestivum*, καθότι είναι μία από τις πιο γνωστές και εμπορεύσιμες τρούφες, που συλλέγεται και καλλιεργείται ευκολότερα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες. Στην ανάλυση αυτή, **απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:** το τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος, το τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέος, το υπεροξείδιο της εργοστερόλης, η βρασικαστερόλη, το σάκχαρο μανιτόλη και το λινολεϊκό οξύ. **Οι πρώτες τρεις ενώσεις απομονώνονται πρώτη φορά στο είδος *Tuber aestivum*.**



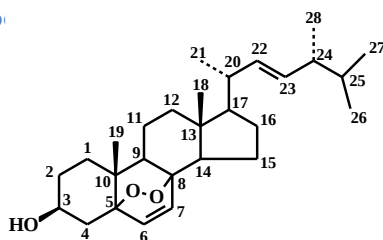
τριγλυκερίδιο του λινολεϊκού οξέος



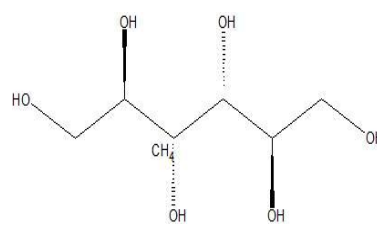
τριγλυκερίδιο του ολεϊκού οξέο



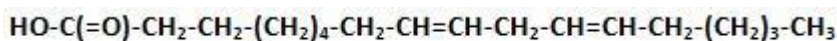
Βρασικαστερόλη



Υπεροξείδιο της εργοστερόλης



Μαννιτόλη



Λινολεϊκό οξύ

Έπειτα, ακολούθησε η **μελέτη του αρωματικού προφίλ πέντε ελαίων τρούφας**, που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις θειούχων ενώσεων προκειμένου να «θυμίζουν» την ελκυστική μυρωδιά της τρούφας, γεγονός το οποίο ενισχύει την επιστημονική άποψη για προσθήκη συγκεκριμένων συνθετικών πτητικών ουσιών σε ελαιόλαδο και συμβαδίζει με πρόσφατες διεθνείς μελέτες. Οι συνθετικές ουσίες που προστίθενται είναι χαμηλού κόστους και χαμηλής τοξικότητας, προκαλώντας ένα δυνατό άρωμα που ελκύει τον καταναλωτή. Στην μελέτη αυτή, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 31 πτητικές ενώσεις, με κυριότερες τις: 1-octen-3-ol, hexanal, 1-propanethiol και 2,4-dithiapentane, εκ των οποίων οι 17 ανιχνεύονται πρώτη φορά σε έλαια τρούφας σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.

Ακολούθως έγινε η **μελέτη του αρωματικού προφίλ των πέντε μανιταριών ελληνικής και πολωνικής προέλευσης**. Η μελέτη των αποξηραμένων δειγμάτων παρουσίασε μια ποικιλία χημικών ομάδων με κυριότερες τις αλδεΐδες και τα αρωματικά παράγωγα. Η υψηλότερη συγκέντρωση αλδεϋδών

παρουσιάστηκε στον μύκητα *B. edulis*. Σημαντικό να αναφερθεί είναι και η παρουσία θειούχων ενώσεων στον μύκητα *M. procera*. Επιπλέον, η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής με βιβλιογραφικά δεδομένα σε αντίστοιχα φρέσκαμανιτάρια οδήγησε στο συμπέρασμα πως η αλλοίωση του αρωματικού προφίλ είναι πολύ μεγάλη κατά την ξήρανση και οδηγεί στην αυξημένη συγκέντρωση συγκεκριμένων ουσιών, όπως benzaldehyde, hexanal, phenylacetaldehyde.

Από τη μελέτη των αποξηραμένωνμανιταριών ταυτοποιήθηκαν: 11 πτητικές ουσίες στο είδος *A. caesarea*, 13 πτητικές ουσίες στο είδος *M. oreades*, 18 πτητικές ουσίες στο είδος *C. cornucopioides*, 16 πτητικές ουσίες στο είδος *B. edulis* και 16 πτητικές ουσίες στο είδος *M. procera*. Από αυτές, 11 ενώσεις ανιχνεύονται για πρώτη φορά στα μελετηθέντα είδη και είναι οι εξής:

A. caesarea: benzoic acid methylester

M. oreades: 2-ethyl-3-hexen-1-ol, 2-methylnonane, cycloheptane, 1,3-octadiene

C. cornucopioides: 1,4-dimethyl-2-methylenecyclohexane, 1-methyl-4-methylenecyclo-hexane, 3-hepten-2-one, 2-undecanone

M. procera: acetophenone, benzoylisothiocyanate

Τέλος, έγινε ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου στα υδατικά εκχυλίσματα των αποξηραμένωνμανιταριών, όπου ξεχώρισαν για την υψηλή τους περιεκτικότητα από τα ελληνικά είδη το *Marasmius oreades* και από τα πολωνικά είδη το *Macrolepiota procera*. Τα ελληνικάμανιτάρια *A. caearea*, *C. cronucopioides* και *M. oreades* παρουσίασαν υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε σύγκριση με μελέτες σε δείγματα ισπανικής και ινδικής προέλευσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acosta-Martínez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D., & Pérez-Alegría, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.05.012>
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., & Lindequist, U. (2016). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Volatile Oil of *Ganoderma pfeifferi* Bres. *Medicines*, 3(2), 10. <https://doi.org/10.3390/medicines3020010>
- Albee-Scott, S. R. (2007). Does secotioid inertia drive the evolution of false-truffles? *Mycological Research*, 111(9), 1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.008>
- Aloupi, M., Koutrotsios, G., Koulousaris, M., & Kalogeropoulos, N. (2012). Trace metal contents in wild edible mushrooms growing on serpentine and volcanic soils on the island of Lesbos, Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78(1), 184–194.
- Amakura, Y., Kondo, K., Akiyama, H., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., & Maitani, T. (2006). Conjugated ketonic fatty acids from *Pleurocybella porrigens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(8), 1213–1215. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.1213>
- Amicucci, A., Zambonelli, A., Giomaro, G., Potenza, L., & Stocchi, V. (1998). Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol Ecol*, 7, 273–277.
- Angelini, P. (2010). Biological activities of methanolic extract from *Tuber aestivum*, *T. borchii*, and *T. brumale* f. *moschatum*, 19, 281–290.
- Angelini, P., Tirillini, B., Fiorini, D., Bricchi, E., & Venanzoni, R. (2015). Can the fatty acids profile of *Tuber aestivum* - *T. uncinatum* species complex have chemotaxonomic value? *Flora Mediterranea*, 25(January 2016), 95–104. <https://doi.org/10.7320/FIMedit25.095>
- Angelini, P., Tirillini, B., Properzi, A., Rol, C., & Venanzoni, R. (2015). Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems*, 149(6), 1000–1009. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.983575>
- Angelini, P., Tirillini, B., Properzi, A., Rol, C., & Venanzoni, R. (2015). Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 149(6), 1000–1009. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.983575>
- Antony-Babu, S., Deveau, A., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C., ... Uroz, S. (2014). Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2831–2847. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12294>
- Ayer, W. A., & Craw, P. A. (1978). Metabolites of the fairy ring fungus, *Marasmius oreades*. Part 2. Norsesquiterpenes, further sesquiterpenes, and agrocycin. *Canadian Journal of Chemistry*, (1).
- Ayer, W. a., Craw, P. a., Stout, T. J., & Clardy, J. (1989). Novel sesquiterpenoids from the fairy ring fungus, *Marasmius oreades*. *Canadian Journal of Chemistry*, 67(5), 773–778. <https://doi.org/10.1139/v89-116>
- Barbieri, E., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Potenza, L., Basaglia, M., ... Stocchi, V. (2010). New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biology*, 114(11–12), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.001>
- Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux, J., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Ceccaroli, P., ... Stocchi, V. (2007). Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation.

- Environmental Microbiology*, 9(9), 2234–2246. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01338.x>
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105(1), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.052>
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2742–2747. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.030>
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.039>
- Beara, I. N., Lesjak, M. M., Četojević-Simin, D. D., Marjanović, Ž. S., Ristić, J. D., Mrkonjić, Z. O., & Mimica-Dukić, N. M. (2014). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of black (*Tuber aestivum* Vittad.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Food Chemistry*, 165, 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.116>
- Belfiori, B., Riccioni, C., Tempesta, S., Pasqualetti, M., Paolocci, F., & Rubini, A. (2012). Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(3), 547–561. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01379.x>
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., Lim, T. Y., Lim, Y. Y., Yule, C. M., & Frazier, R. a. (2009). *Food Chemistry*. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.093>
- Bellesia, F., Pinetti, A., Bianchi, A., & Tirillini, B. (1998). The volatile organic compounds of black truffle (*Tuber melanosporum*. Vitt.) from Middle Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1), 56–58. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199801/02\)13:1<56::AID-FFJ692>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199801/02)13:1<56::AID-FFJ692>3.0.CO;2-X)
- Bhotmange, D. U., Wallenius, J. H., Singhal, R. S., & Shamekh, S. S. (2017). Enzymatic extraction and characterization of polysaccharide from *Tuber aestivum*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.02.001>
- Block, E., Dane, A. J., Thomas, S., & Cody, R. (2010). Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in allium chemistry. 2-propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyl trisulfane S -oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other alliums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4617–4625. <https://doi.org/10.1021/jf1000106>
- Boa, E. (2004). *Wild Edible Fungi: A Global Overview Of Their Use And Importance To People (Non-Wood Forest Products)*. Food & Agriculture Organization of the UN.
- Bonito, G., Smith, M. E., Nowak, M., Healy, R. A., Guevara, G., Cázares, E., ... Vilgalys, R. (2013). Historical Biogeography and Diversification of Truffles in the Tuberaceae and Their Newly Identified Southern Hemisphere Sister Lineage. *PLoS ONE*, 8(1).
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1995). 4 Agarics. In *Fungi of Switzerland*.
- Brodhun, F., Schneider, S., Gobel, C., Hornung, E., & Feussner, I. (2010). PpoC from *Aspergillus nidulans* is a fusion protein with only one active haem. *Biochem J*, 425(3), 553–565. <https://doi.org/10.1042/bj20091096>
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Bu, M., Yang, B. B., & Hu, L. (2014). Natural Bioactive Sterol 5 α ,8 α -endoperoxides as Drug Lead Compounds. *Medicinal Chemistry*, 4(10), 709–716.

- Buzzini, P., Romano, S., Turchetti, B., Vaughan, A., Pagnoni, U. M., & Davoli, P. (2005). Production of volatile organic sulfur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 5(4–5), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.011>
- Ceccaroli, P., Buffalini, M., Saltarelli, R., Barbieri, E., Polidori, E., Ottonello, S., ... Stocchi, V. (2011). Genomic profiling of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 189(3), 751–764. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03520.x>
- Ceruti, A., Fontana, A., & Nosenzo, C. (2003). *Le Specie europea del genere Tuber: Una revisione storica*. Torino: Mus. Req. Sci. Nat.
- Chan, P. Thomas, G.N. Chen, Y.J. Tomlinson, B. (2002). Clinical pharmacology of angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Acta Cardiologica Sinica*, 18(1), 1–10.
- Chan, P., & Tomlinson, B. (2000). Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). *Journal of Clinical Pharmacology*, 40(5), 457–61.
- Chatin, A. D. (1887). *Une nouvelle espèce de truffe*. CR Acad Sci, Paris, 104, 1132.
- Chen, H. P., Zhao, Z. Z., Li, Z. H., Huang, Y., Zhang, S. B., Tang, Y., ... Liu, J. K. (2018). Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Lanostane Triterpenoids from the Polish Edible Mushroom *Macrolepota procera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(12), 3146–3154. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00287>
- Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M., & Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-Inhibitor. *Society*, 70(5), 2823–2829. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2823>
- Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. C., & Burton, K. S. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: Properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, 47(6), 317–326. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0318-4>
- Corrado, F., Simonetti, D., De Roma, A., Criscuolo, D., Cutarelli, A., Cecere, B., ... Varricchio, E. (2016). Genetic characterization and volatile profiles of *Tuber mesentericum* from benevento. *2nd IMEKOFOODS Conference: Promoting Objective and Measurable Food Quality and Safety*, (June).
- Costa, R., Fanali, C., Pennazza, G., Tedone, L., Dugo, L., Santonico, M., ... Mondello, L. (2015). Screening of volatile compounds composition of white truffle during storage by GCxGC-(FID/MS) and gas sensor array analyses. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.054>
- Costa, R., Grazia, S. De, Grasso, E., & Trozzi, A. (2015). Chromatography as Analytical Methodology for the Determination of Volatiles in Wild Mushrooms and Evaluation of Modifications Occurring during Storage, 2015.
- Council, M. (2004). *National Food and Nutrient Analysis Program Wave 9b*. Dublin CA.
- Courts, E., & Vooght, D. (2016). *Royal Taste*.
- Culleré, L., Ferreira, V., Chevret, B., Venturini, M., Sánchez-Gimeno, A. C., & Blanco, D. (2010). Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 122(1), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.024>
- Culleré, L., Ferreira, V., Venturini, M. E., Marco, P., & Blanco, D. (2013). Chemical and sensory effects of the freezing process on the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). *Food Chemistry*,

- Cvak, L., Jegorov, A., Sedmera, P., Havlíček, V., Ondráček, J., Hušák, M., ... Granzin, J. (1994). Ergogaline, a new ergot alkaloid, produced by *Claviceps purpurea*: isolation, identification, crystal structure and molecular conformation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (8), 1861–1865. <https://doi.org/10.1039/P29940001861>
- D'Auria, M., Racioppi, R., Rana, G. L., & Laurita, A. (2012). Studies on Volatile Organic Compounds of *Tuber borchii* and *T. asae-foetida*. *Journal of Chromatographic Science*, 28(20), 1709–1717. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms060>
- Dar, G., Bhagat, R., & Khan, M. (2002). *Biodiversity of the Kashmir Himalaya*. Anmol Publications PVT.
- De Roman, M., & Boa, E. (2004). IN S International Seminar on Ethnomycology COLLECTION , MARKETING AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI IN SPAIN, 16(2).
- Devshri, U., Wallenius, H. J., Sionghal, S. R., & Shamekh, S. (2017). *Enzymatic Extraction and Characterization of Polysaccharides from Tuber aestivum* (2017). Devshri U, Bhotmange, Jaane H. Wallenius, Rekha S. Sionghal and Salem S. Shamekh. *Bioactive Carbohydrates % Dietary Fiber*. 10:1-9. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber* (Vol. 10).
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various Mushroom Species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(3), 536–551.
- Díaz, P., Ibáñez, E., Reglero, G., & Señoráns, F. J. (2009). Optimization of summer truffle aroma analysis by SPME: Comparison of extraction with different polarity fibres. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.017>
- Díaz, P., Ibáñez, E., Señoráns, F. J., & Reglero, G. (2003). Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1017(1–2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.016>
- Douet, J. P., Castroviejo, M., Mabru, D., Chevalier, G., Dupré, C., Bergougnoux, F., ... Médina, B. (2004). Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(4), 668–673. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2643-9>
- Duc-Maugé, B., & Duplessy, B. (1998). *Le Livre de la Truffe*. (Edisud., Ed.). Aix-en-Provence, France.
- Duckham, S. C., Dodson, A. T., Bakker, J., & Ames, J. M. (2001). Volatile flavour components of baked potato flesh. A comparison of eleven potato cultivars. *Nahrung - Food*, 45(5), 317–323. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20011001\)45:5<317::AID-FOOD317>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20011001)45:5<317::AID-FOOD317>3.0.CO;2-4)
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 665–703. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>
- Fogel, R., & Peck, S. B. (1975). *Ecological studies of hypogeous fungi. I. Coleoptera associated with sporocarps. Mycologia*. <https://doi.org/10.2307/3758335>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). "On tyrosine and tryptophane determinations in proteins." *J. Biol. Chem*, 73(2), 627–650.
- Fons, F., Rapior, S., Eyssartier, G., & Bessiere, J. M. (2003). Volatile compounds in the *Cantharellus*, *Craterellus* and *Hydnum* genera. *Cryptogamie Mycologie*, 24(4), 367–376.
- Fратиanni, F., Luccia, A., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2007). *Mutagenic and antimutagenic properties of*

- aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated Tuber aestivum black truffle: A preliminary study. Food Chemistry* (Vol. 204). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.014>
- Gao, J., Wang, C., Zhang, A., & Liu, J. (2001). A new trihydroxy fatty acid from the ascomycete, Chinese truffle *Tuber indicum*. *Lipids*, 36(12), 1365–1370. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0853-y>
- Gao, P., Jin, J., Liu, R., Jin, Q., & Wang, X. (2018). Chemical Compositions of Walnut (*Juglans regia* L.) Oils from Different Cultivated Regions in China. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(7), 825–834. <https://doi.org/10.1002/aocs.12097>
- Garofoli, A. (1906). *Funghi e tartufi*.
- Garscha, U., & Oliw, E. H. (2009). Leucine/valine residues direct oxygenation of linoleic acid by (10R)- and (8R)-dioxygenases: Expression and site-directed mutagenesis of (10R)-dioxygenase with epoxylalcohol synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13755–13765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808665200>
- Gioacchini, A. M., Menotta, M., Guescini, M., & Saltarelli, R. (2008). Geographical traceability of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) by the analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 22, 3147–3153. <https://doi.org/10.1002/rcm.3714>
- Gruber, G., Kerschensteiner, L., & Steglich, W. (2014). Chromapedic acid, pulvinic acids and acetophenone derivatives from the mushroom *leccinum chromapes* (boletales). *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 69(4), 432–438. <https://doi.org/10.5560/ZNB.2014-3307>
- Gryndler, M., & Hršelová, H. (2012). Isolation of bacteria from ectomycorrhizae of *Tuber aestivum* Vittad. *Acta Mycologica*, 47(2), 155–160.
- Gutfinger, T. (1981). "Polyphenols in olive oils." *J Am Oil Chem S*, 58(11), 966–968.
- Hall, I. P., Yun, W., & Amicucci, A. (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology*, 21(10). [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00204-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00204-X)
- Harki, E., Bouya, D., & Dargent, R. (2006). Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 99(2), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.030>
- Harki, E., Klaebe, A., Talou, T., & Dargent, R. (1996). Identification and quantification of *Tuber melanosporum* Vitt. sterols. *Steroids*, 61(10), 609–612. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00121-3)
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., Van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism (Applied and Environmental Microbiology (2008) 74, 8, (2259-2266)). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3920. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-08>
- Healy, R. A., Smith, M. E., Bonito, G. M., Pfister, D. H., Ge, Z. W., Guevara, G. G., ... McLaughlin, D. J. (2013). High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology*, 22(6), 1717–1732. <https://doi.org/10.1111/mec.12135>
- Herath, H. M. T. B., Jacob, M., Wilson, A. D., Abbas, H. K., & Nanayakkara, N. P. D. (2013). New secondary metabolites from bioactive extracts of the fungus *Armillaria tabescens*. *Natural Product Research*, 27(17), 1562–1568. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.738206>
- Hui, Y. H., Chen, F., & Nollet, L. M. L. (2010). *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470622834>

- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., & Aloupi, M. (2013). Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378–385.
- Kask, K., Kännaste, A., Talts, E., Copolovici, L., & Niinemets, Ü. (2016). How specialized volatiles respond to chronic and short-term physiological and shock heat stress in *Brassica nigra*. *Plant Cell and Environment*, 39(9), 2027–2042. <https://doi.org/10.1111/pce.12775>
- Kim, H. J., Kim, H. M., Ryu, B., Lee, W. S., Shin, J. S., Lee, K. T., & Jang, D. S. (2016). Constituents of PG201 (Layla®), a multi-component phytopharmaceutical, with inhibitory activity on LPS-induced nitric oxide and prostaglandin E2 productions in macrophages. *Archives of Pharmacal Research*, 39(2), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0654-z>
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., & Stalpers, J. (2001). *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of Fungi* (Tenth). CAB International.
- Konkol, N., McNamara, C. J., & Mitchell, R. (2010). Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.12.008>
- Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A., & Stanojković, T. (2016). Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.01.008>
- Krogh, D. (2011). *Biology: A Guide to the Natural World*. Benjamin Cummings.
- Lebel, T., & Beever, R. (2014). *Beever RE, Lebel T (2014). Truffles of New Zealand: a discussion of bird dispersal characteristics of fruit bodies. Auck. Bot Soc. 69(2), 170-178. Auckland Botanical Society Journal (Vol. 69).*
- Li, D., WenHong, Z., BaoHua, K., Min, Y., & HaiRu, C. (2009). Inhibition effects of the extract and polysaccharide in macrofungus on TMV. *Journal of Yunnan Agricultural University*.
- Liu, T., Feng, T., Chen, W., & Technology, A. (2017). Identification of Volatile Flavour Components of *Tuber melanosporum* Using Simultaneous Distillation-Extraction, 2017(6), 483–487. <https://doi.org/10.17221/31/2017-CJFS>
- MacLeod, A., & Panchasara, S. D. (1983). Volatile aroma components, particularly glucosinolate products, of cooked edible mushroom (*Agaricus bisporus*) and cooked dried mushroom. *Phytochemistry*, 22(3), 705–709. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86966-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86966-6)
- Magnus, V., Laćan, G., Aplin, R. T., & Thaller, V. (1989). Glycerol tridehydrocrepenynate from the basidiomycete *Craterellus cornucopioides*. *Phytochemistry*, 28(11), 3047–3050. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80277-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80277-8)
- Makropoulou, M., Aligiannis, N., Gonou-Zagou, Z., Pratsinis, H., Skaltsounis, A. L., & Fokialakis, N. (2012). Antioxidant and Cytotoxic Activity of the Wild Edible Mushroom *Gomphus clavatus*. *Journal of Medicinal Food*, 15(2), 216–221. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0107>
- Mannina, L., Cristinzio, M., Sobolev, A. P., Ragni, P., & Segre, A. (2004). High-Field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study of Truffles (*Tuber aestivum vittadini*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7988–7996.

- March, R. E., Richards, D. S., & Ryan, R. W. (2006). Volatile compounds from six species of truffle - Head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 249–250, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.12.038>
- Marletto, F. (1969). *La microflora della rizosfera delle tartufoie, I. I blastomiceti dei tartufi e della rizosfera delle tartufoie*.
- Marley, G. (2010). *Chanterelle Dreams, Amanita Nightmares*. Chelsea Green Publishing.
- Martin-Santafe, M., Perez-Forteza, V., Zuriaga, P., & Barriuso, J. (2014). Phytosanitary problems detected in truffle cultivation in Spain. A review. *Forest Systems*, 23(2), 307–316. <https://doi.org/10.5424/fs/2014232-04900>
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., ... Wincker, P. (2010). Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, 464(7291), 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nature08867>
- Mauriello, G., Marino, R., D'Auria, M., Cerone, G., & Rana, G. L. (2004). Determination of Volatile Organic Compounds from Truffles via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 42(6), 299–305. <https://doi.org/10.1093/chromsci/42.6.299>
- Mello, A., Nosenzo, C., Meotto, F., & Bonfante, P. (1996). Rapid typing of truffle mycorrhizal roots by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycorrhiza*, 6, 417–421.
- Micheli, P. A. (1729). *Nova Plantarum Genera*. Florence: Paperninii, B.
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact* (2nd Editio). CRC Press.
- Mishra, G., Singh, P., Verma, R., Kumar, S., & Srivastav, S. (2011). Traditional uses , phytochemistry and pharmacological properties of Moringa oleifera plant : An overview. *Der Pharmacia Lettre*, 3(2), 141–164.
- Mohamed, E. M. (2012). Chemical profile, agaritine and selenium content of agaricus bisporus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(6), 911–920. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000600015>
- Moldavan, M., Grodzynska, G., Wasser, S., & Storozhuk, V. (2001). Effects of some higher Basidiomycetes extracts on the neurons activity. *Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal*.
- Molinier, V., Murat, C., Frochot, H., Wipf, D., & Splivallo, R. (2015). Fine-scale spatial genetic structure analysis of the black truffle *Tuber aestivum* and its link to aroma variability. *Environmental Microbiology*, 17(8), 3039–3050. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12910>
- Money, N. (2011). *Mushroom*. Oxford University Press.
- Ney, K., & Freitag, W. (1980). *Trüffel-aroma*.
- Noinart, J., Buttachon, S., Dethoup, T., Gales, L., Pereira, J. A., Urbatzka, R., ... Kijjoo, A. (2017). A new ergosterol analog, a new bis-anthraquinone and anti-obesity activity of anthraquinones from the marine sponge-associated fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207. *Marine Drugs*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/md15050139>
- Nowak, Z. (2015). *Truffle: A Global History*. Reaktion Books (May 15, 2015).
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehalotis, C., Nerud, F., Antoniou, T., Merhautova, V., & Zervakis, G. I. (2012). Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere*, 88(5), 620–626.

- Ouzouni, P. (2009). *Determination of basic composition, metal content and identification of volatile components with SPME-GC/MS in greek wild edible mushroom species*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. <https://doi.org/10.12681/eadd/27125>
- Pacioni, G., Bellina-Agostinone, C., & D'Antonio, M. (1991). On the odour of *Tuber mesentericum*. *Mycological Research*, 95(8), 1016–1017. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80101-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80101-9)
- Pacioni, G., Cerretani, L., Procida, G., & Cichelli, A. (2014). Composition of commercial truffle flavored oils with GC-MS analysis and discrimination with an electronic nose. *Food Chemistry*, 146, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.016>
- Pacioni, G., Leonardi, M., Aimola, P., Ragnelli, A., Rubini, A., & Paolocci, F. (2007). Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. *Mycological Research*, 111(12), 1450–1460. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.016>
- Pacioni, G., Rapino, C., Zarivi, O., Falconi, A., Leonardi, M., Battista, N., ... Maccarrone, M. (2015). Truffles contain endocannabinoid metabolic enzymes and anandamide. *Phytochemistry*, 110, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.012>
- Pagnol, J. (2000). *La truffle*. (Minareva, Ed.). Geneva. Switzerland.
- Palacios, I., Moro, C., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., García-Lafuente, A., & Villares, A. (2011). Use of modified atmosphere packaging to preserve mushroom quality during storage. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3(3), 196–203. <https://doi.org/10.2174/2212798411103030196>
- Paolocci, F., Rubini, A., Riccioni, C., & Arcioni, S. (2006). Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2390–3. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2390-2393.2006>
- Papaspyridi, L. A., Aligiannis, N., Topakas, E., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A. L., & Fokialakis, N. (2012). Submerged Fermentation of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor as a Promising Alternative for the Effective Production of Bioactive Metabolites. *Molecules*, 17(3), 2714–2724.
- PARKER-RHODES, A. F. (1955). the Basidiomycetes of Skokholm Island: Xii. Correlation With the Chief Plant Associations. *New Phytologist*, 54(2), 259–276. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1955.tb06179.x>
- Pelusio, F., Nilsson, T., Montanarella, L., Tilio, R., Larsen, B., Facchetti, S., ... Madsen, J. (1995). Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Volatile Organic Sulfur Compounds in Black and White Truffle Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2138–2143. <https://doi.org/10.1021/jf00056a034>
- Person, C. H. (1801). *Synopsis methodica fungorum*. Göttingen.
- Persoon, C. (1801). No Title. In *Synopsis Methodica Fungorum*.
- Piloni, M., Tat, L., Tonizzo, A., & Battistutta, F. (2005). Aroma characterisation of white truffle by GC-MS and GC-O [Gas Chromatography; Mass Spectrometry; Olfactometry]. *Italian Journal of Food Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfs.2005.04.008>
- Poe, M. R. (2009). *Wild Mushrooms, Forest Governance, and Conflict in the Northern Sierra of Oaxaca*. ProQuest.
- Puttaraju, N., Venkateshaiah, S., Dharmesh, S., Urs, S., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9764–9772. <https://doi.org/10.1021/jf0615707>

- Queirós, B., Barreira, J. M., Sarmiento, A. C., & Ferreira, I. F. R. (2009). In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60 Suppl 6(January), 160–72. <https://doi.org/10.1080/09637480903153845>
- Ragasa, C., Reyes, J., Tan, M., Brkljaca, R., & Urban, S. (2016). Sterols and Lipids from *Agaricus bisporus*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(10), 1451–1453.
- Ragasa, C. Y., Reyes, J. M. A., Tan, M. C. S., Brkljača, R., & Urban, S. (2016). Sterols and lipids from *Agaricus bisporus*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(10), 1451–1453.
- Ramesh, C., & Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Phcog Res*.
- Ramirez-Anguiano, A. C., Santoyo, S., Reglero, G., & Soler-Rivas, C. (2007). Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2272–2278.
- Ramsbottom, J. (1953). *Mushrooms & Toadstools*.
- Resurreccion, N., Shen, C., & Ragasa, C. Y. (2016). Chemical Constituents of *Lentinus edodes*, 8(4), 117–120.
- Riccioni, C., Belfiori, B., Rubini, A., Passeri, V., Arcioni, S., & Paolocci, F. (2008). *Tuber melanosporum* outcrosses: Analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist*, 180(2), 466–478. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02560.x>
- Riousset, L., Riousset, G., Chevalier, G., & Bardet, M. (2001). *Truffes d'Europe et de Chine*.
- Rishikesh, M. (2003). *Some wild edible mushrooms of Siang valley: Arunachal Pradesh*. Plant Archives.
- Romaní, A. M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C., & Tranvik, L. J. (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology*, 87(10), 2559–2569. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2559:IOBAFO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2559:IOBAFO]2.0.CO;2)
- Roussos, S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Augur, C. (2003). *New Horizons in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers.
- Ruimi, N., Petrova, R. D., Agbaria, R., Sussan, S., Wasser, S. P., Reznick, A. Z., & Mahajna, J. (2010). Inhibition of TNF α -induced iNOS expression in HSV-tk transduced 9L glioblastoma cell lines by *Marasmius oreades* substances through NF- κ B- and MAPK-dependent mechanisms. *Molecular Biology Reports*, 37(8), 3801–3812. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0035-0>
- Sarikurkcü, C., Tepe, B., Semiz, D. K., & Solak, M. H. (2010). Evaluation of metal concentration and antioxidant activity of three edible mushrooms from Mugla, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1230–1233. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.033>
- Savini, S., Loizzo, M. R., Tundis, R., Mozzon, M., Foligni, R., Longo, E., ... Boselli, E. (2017). Fresh refrigerated *Tuber melanosporum* truffle: effect of the storage conditions on the antioxidant profile, antioxidant activity and volatile profile. *European Food Research and Technology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2927-x>
- Schmidberger, P. C., & Schieberle, P. (2017). Characterization of the Key Aroma Compounds in White Alba Truffle (*Tuber magnatum* pico) and Burgundy Truffle (*Tuber uncinatum*) by Means of the Sensomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), 9287–9296. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04073>
- Selosse, M.-A., Faccio, A., Scappaticci, G., & Bonfante, P. (2004). Chlorophyllous and Achlorophyllous

- Specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) Are Associated with Ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles. *Microbial Ecology*, 47(4), 416–426. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2034-3>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *Am j Enol Viticult*, 16(3), 144–158.
- Splivallo. (2006). Ph . D Course in Biology and Biotechnology of Fungi Truffles Volatiles and Exudates Investigation of their Role in Truffle / Plant Interactions, 2003–2004.
- Splivallo, R. (2012). Production of Natural Truffle From Truffle Mycelium.
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., & Karlovsky, P. (2015). Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2647–2660. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521>
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., & Karlovsky, P. (2015). Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2647–2660. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521>
- Splivallo, R., & Ebeler, S. E. (2015). Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6), 2583–2592. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6360-9>
- Stielow, B., & Menzel, W. (2010). Complete nucleotide sequence of TaV1, a novel totivirus isolated from a black truffle ascocarp (*Tuber aestivum* Vittad.). *Archives of Virology*, 155(12), 2075–2078. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0824-8>
- Streiblová, E., Gryndlerová, H., & Gryndler, M. (2012). *Truffle brûlé: An efficient fungal life strategy. FEMS microbiology ecology* (Vol. 80). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01283.x>
- Talou, T., Delmas, M., & Gaset, A. (1987). Principal Constituents of Black Truffle (*Tuber melanosporum*) Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(5), 774–777. <https://doi.org/10.1021/jf00077a031>
- Talou, T., Gaset, A., Delmas, M., Kulifaj, M., & Montant, C. (1990). Dimethyl sulphide: the secret for black truffle hunting by animals? *Mycological Research*, 94(2), 277–278. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80630-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80630-8)
- Tang, Y., Li, H. M., & Tang, Y. J. (2012). Comparison of sterol composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruited bodies. *Food Chemistry*, 132(3), 1207–1213. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.077>
- Theochari, I., Nikolaou, A., & Poulou, A. (2002). Resources of *Pleurotus osteratus* and *Pleurotus eryngii* in Greece: perspectives for cultivation and mushroom production. *ISHS Acta Horticulturae* 579: II Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes
- Torregiani, E., Lorier, S., Sagratini, G., Maggi, F., Vittori, S., & Caprioli, G. (2017). Comparative Analysis of the Volatile Profile of 20 Commercial Samples of Truffles, Truffle Sauces, and Truffle-Flavored Oils by Using HS-SPME-GC-MS. *Food Analytical Methods*, 10(6), 1857–1869. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0749-2>
- Tran Van, L., & Le Duy, T. (1991). Linchi mushrooms as biological monitors for ¹³⁷Cs pollution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Letters*, 155(6), 451–458. <https://doi.org/10.1007/BF02163640>
- Trappe, J. M. (1962). Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. *Botanical Review*, 28(4), 538–606. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4353659>

- Tsai, S., Tsai, H., & Mau, J. (2008). Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry*, 107(3), 977–983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.080>
- Tudzynski, P., Correia, T., & Keller, U. (2001). Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5–6), 593–605. <https://doi.org/10.1007/s002530100801>
- UKAI, S., HARA, C., KURUMA, I., & TANAKA, Y. (1983). POLYSACCHARIDES IN FUNGI. XIV. ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE POLYSACCHARIDES FROM THE FRUIT BODIES OF SEVERAL FUNGI. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 6(12), 983–990. <https://doi.org/10.1248/bpb1978.6.983>
- Urban, A., Neuner-Plattner, I., Krisai-Greilhuber, I., & Haselwandter, K. (2004). Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two Tuber species. *Mycological Research*, 108(7), 749–758. <https://doi.org/10.1017/S0953756204000553>
- Vahdatzadeh, M., Deveau, A., & Splivallo, R. (2015a). The Role of the Microbiome of Truffles in Aroma Formation: a Meta-Analysis Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 6946–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-15>
- Vahdatzadeh, M., Deveau, A., & Splivallo, R. (2015b). The role of the microbiome of truffles in aroma formation: A meta-analysis approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 6946–6952. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-15>
- Vaidya, J. G., & Rabba, A. S. (1993). Fungi in Folk Medecine. *Mycologist*, 7(3), 131–133.
- Vieira, V., Marques, A., Barros, L., Barreira, J. C. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Insights in the antioxidant synergistic effects of combined edible mushrooms: phenolic and polysaccharidic extracts of *Boletus edulis* and *Marasmius oreades*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51(2), 109–112. Retrieved from <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/7368>
- Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Ramos, Á. (2012). Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.12.003>
- Vita, F., Taiti, C., Pompeiano, A., Bazihizina, N., Lucarotti, V., Mancuso, S., & Alpi, A. (2015). Volatile organic compounds in truffle (*Tuber magnatum* Pico): comparison of samples from different regions of Italy and from different seasons. *Scientific Reports*, 5(1), 12629. <https://doi.org/10.1038/srep12629>
- Vita, F., Taiti, C., Pompeiano, A., Bazihizina, N., Lucarotti, V., Mancuso, S., & Alpi, A. (2015). Volatile organic compounds in truffle (*Tuber magnatum* Pico): Comparison of samples from different regions of Italy and from different seasons. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep12629>
- Vittadini, C. (1831). *Monographia Tuberacearum*. [https://doi.org/us.archive.org/Vittadini Monogr. Tuberacearum](https://doi.org/us.archive.org/Vittadini_Monogr.Tuberacearum)
- Wang, J., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2007). A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*, 28, 560–565. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.10.004>
- Wang, S., & Marcone, M. F. (2011). The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles. *Food Research International*, 44(9), 2567–2581. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.008>
- Wang, X., Du, J., Tan, R., & Liu, J. (2005). Chemical constituents of basidiomycete *Hydnum repandum*. *Zhongcaoyao*, 36(8), 1126–1130.

- Wang, X. N., Wang, F., Du, J. C., Ge, H. M., Tan, R. X., & Liu, J. K. (2005). A new marasmane sesquiterpene from the basidiomycete *Russula foetens*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 60(10), 1065–1067.
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 258–274.
- WeiHong, P., BingCheng, G., Wei, T., & Yong, G. (2003). "Studies on economic mushrooms in Longmen mountain areas." *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*.
- Whittaker, R. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163(3863). <https://doi.org/10.1126/science.163.3863.150>
- Xiao, D. R., Liu, R. S., He, L., Li, H. M., Tang, Y. L., Liang, X. H., ... Tang, Y. J. (2015). Aroma improvement by repeated freeze-thaw treatment during *Tuber melanosporum* fermentation. *Scientific Reports*, 5, 17120. <https://doi.org/10.1038/srep17120>
- Yaoita, Y., Amemiya, K., Ohnuma, H., Furumura, K., Masaki, A., Matsuki, T., & Kikuchi, M. (1998). Sterol Constituents from Five Edible Mushrooms. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46(6), 944–950. <https://doi.org/10.1248/cpb.46.944>
- Yokokawa, H., & Mitsuhashi, T. (1981). The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry*.
- Zacchi, L., & Angelini, P. (2003). Yeast distribution in a truffle – field ecosystem, 53(3), 275–282.
- Zambonelli, A. (2016). *True Truffle (Tuber spp.) in the World* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5>
- Zeppa, S., Gioacchini, A. M., Guidi, C., Guescini, M., Pierleoni, R., Zambonelli, A., & Stocchi, V. (2004). Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 18(2), 199–205. <https://doi.org/10.1002/rcm.1313>
- Zervakis, G. I. (2005). Cultivation of the King-Oyster Mushroom *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quél. on Substrates Deriving from the Olive-Oil Industry. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(3), 486–487.
- Zhang, N., Chen, H., Sun, B., Mao, X., Zhang, Y., & Zhou, Y. (2016). Comparative analysis of volatile composition in chinese truffles via GC × GC/HR-TOF/MS and electronic nose. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijms17040412>
- Zheng, S., Li, C., Ng, T., & Wang, H. (2007). A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochemistry*, 42(12), 1620–1624. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.09.004>
- Zhou, J., Feng, T., & Ye, R. (2015). Differentiation of eight commercial mushrooms by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Sensors*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/374013>
- Ziboh, V., Miller, C. C., & Cho, Y. (2000). Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: Generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 SUPPL.), 361–366. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.361s>
- Zoltan, K. (1986). *Mushrooms Of The Vali Forest Central Hungary*. Botanikai Kozlemenyek.
- Žurga, S., Pohleven, J., Renko, M., Bleuler-Martinez, S., Sosnowski, P., Turk, D., ... Sabotič, J. (2014). A novel β -trefoil lectin from the parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) is nematotoxic. *FEBS Journal*, 281(15), 3489–3506. <https://doi.org/10.1111/febs.12875>

- Βασδέκης, Ε. Π. (2013). *Συγκριτική μελέτη αντιοξειδωτικής και βιολογικής δράσης αυτοφυών λαχανευόμενων φυτών και εδώδιμων μυκήτων από το Εθνικό Πάρκο Βόρειας Πίνδου*. Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας. Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Γεννάδιος, Π. Γ. (1914). *Φυτολογικό Λεξικό Γενναδίου*.
- Δήμου, Δ. (2005). Βρώσιμα και Θεραπευτικά Μανιτάρια. In *Μορφολογία Ανατομία Μυκήτων*. Retrieved from <http://www.ethnopharmacology.gr>
- Ευστρατιάδου, Μ. Α. (2009). *Μελέτη του εδώδιμου μακρομύκητα Pleurotus ostreatus, γνωστός για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, σε βυθισμένες καλλιέργειες*. Τομέας Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- Μάλλιαρης, Β. (2006). *Η σημασία των εδώδιμων μανιταριών στις σύγχρονες διατροφικές αξίες και η συμβολή των βιοχημικών ιδιοτήτων τους στη σύγχρονη φαρμακολογία*.
- Ντανάση, Α. (2007). *Η καλλιέργεια του μανιταριού Lentinula edodes και οι φαρμακευτικές του ιδιότητες*. Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπόνων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας
- Πανουκλιάς, Ν. (2013). *Ελληνικές τρούφες- Μελέτη πτητικών συστατικών*, Τομέας Φαρμακογνωσίας-Χημείας Φυσικών προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διαδικτυακές πηγές:

Άγρια Μανιτάρια (www.agriamanitaria.gr)

Γαληνός (<https://www.galinos.gr/>)

Κουτσογιάννης, Δ. 2015. “Πύλη Για Την Ελληνική Γλώσσα” (<http://www.greek-language.gr>).

Chemical Book (http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6852694.htm).

Dryas Greek Truffle (<http://www.g-troufa.gr/>)