



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής



Πτυχιακή Μελέτη

Ανίχνευση πιθανής πρεβιοτικής δράσης
σε βασιδιομύκητες

ΣΕΚΚΙΔΟΥ ΜΙΚΑΕΛΑ

A.M.: 21141

Τριμελής επιτροπή:

Κυριακού Αδαμαντίνη - Επιβλέπουσα

Κώτσου Μαρία

Ζερβάκης Γεώργιος

Στη Φωτεινή...

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κυρία Κυριακού Αδαμαντίνη τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για να ασχοληθώ με τον τομέα της έρευνας όσο και για την καθοριστική βοήθειά της σε κάθε αναγκαία στιγμή. Επίσης θέλω να την ευχαριστήσω για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Δρ Κώτσου Μαρία για τη σημαντική βοήθειά της τόσο στη διεξαγωγή του πειράματος όσο και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής κυρία Μήτσου Ευδοκία η οποία παρά την πληρότητα των δικών της υποχρεώσεων ανέλαβε τη μύησή μου στον κόσμο της έρευνας και ήταν πάντα πρόθυμη να λύσει κάθε απορία μου αλλά και να βοηθήσει οποτεδήποτε ήταν απαραίτητο.

Ευχαριστώ επίσης τη συμφοιτήριά μου Τζούμα Μαγδαληνή χωρίς τη βοήθεια της οποίας η ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας πτυχιακής μελέτης δεν θα ήταν εφικτή και τη συμφοιτήριά μου και συνοδοιπόρο μου στο επίπονο αυτό έργο, με την οποία μοιραστήκαμε όλες τις ανησυχίες και τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν Ροηλίδη Αθανασία.

Δε θα μπορούσα φυσικά να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πρακτική, ηθική και ψυχολογική στήριξη που μου έδωσαν όλο αυτό το διάστημα αλλά και τους αγαπημένους μου φίλους για τη συμπαράστασή τους.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	6
Abstract.....	7
Θεωρητικό Μέρος	8
1. Εισαγωγή:	9
1.1. Ιστορική αναδρομή	9
1.2. Γαστρεντερικό σύστημα	9
1.3. Εντερικός μικροβιόκοσμος	10
1.4. Εντερικός μικροβιόκοσμος και ξενιστής.....	11
1.5. Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου - SCFA.....	12
1.6. Προβιοτικά.....	13
1.7. Διαιτητικές ίνες.....	13
1.8. Πρεβιοτικά	14
1.9. Ινουλίνη ως πρεβιοτικό	16
1.10. Πρεβιοτικά και ξενιστής	16
1.11. Ευεργετικά αποτελέσματα β-γλυκανών στην υγεία	17
1.12. β-γλυκάνες ως υποψήφια πρεβιοτικά	19
2. Βασιδιομύκητες	19
2.1. Βιολογική δομή μυκήτων/ βασιδιομυκήτων.....	19
2.2. Σημαντικότητα μανιταριών στην ιστορία.....	21
2.3. Διατροφική αξία	21
2.4. Ευεργετικές ιδιότητες	23
2.5. Περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες	25
2.6. Υποθέσεις πιθανής πρεβιοτικής δράσης.....	26
2.7. Βασιδιομύκητες του γένους Pleurotus.....	27
2.8. Βασιδιομύκητες του γένους Ganoderma	28
3. Κυτταροτοξικότητα:	30
3.1. Εισαγωγικά	30
3.2. Επιλογή κυττάρων για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράση	31
Σκοπός.....	32
Πειραματικό Μέρος.....	33
4. Μεθοδολογία.....	34
4.1. Προετοιμασία του υλικού	36

4.1.1.	Καλλιέργεια μανιταριών - λυοφιλίωση καρποφοριών	36
4.2.	Κυτταροτοξικότητα	36
4.2.1.	In vitro δοκιμασία ζύμωσης μανιταριών	36
4.2.1.1.	Λυοφιλίωση υπερκειμένων της in vitro ζύμωσης	37
4.2.2.	Κύτταρα	38
4.2.3.	Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	39
4.2.4.	Ανάπτυξη κυττάρων σε δοχεία καλλιέργειας (φλάσκες)	40
4.3.	Μελέτη Κυτταροτοξικότητας	42
4.3.1.	Καλλιέργεια των κυττάρων σε βοθρία	42
4.3.2.	Επίδραση υπερκειμένων στις κυτταροκαλλιέργειε, και καταμέτρηση κυττάρων	42
4.3.3.	Προσδιορισμός Κυτταροτοξικότητας:	43
4.4	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	44
5.	Αποτελέσματα	45
	Συζήτηση.....	56
	Συμπεράσματα	59
	Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής μελέτης προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:	59
	Βιβλιογραφία.....	60

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος φαίνεται να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού ενώ η σύστασή του επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων η δίαιτα, η αντιβιοτική θεραπεία και το φυσικό περιβάλλον. Τα πρεβιοτικά είναι εκλεκτικά ζυμώσιμα συστατικά τα οποία επιτρέπουν συγκεκριμένες αλλαγές, στη σύνθεση ή/και στη δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου και προσδίδουν όφελος ευεξίας και υγείας στον ξενιστή. Σήμερα ως πρεβιοτικά έχουν κατοχυρωθεί οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης (ITF) και οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), ενώ υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανεύρεση νέων πρεβιοτικών. Οι β-γλυκάνες που περιέχονται σε φυσικά προϊόντα όπως η βρώμη, το κριθάρι αλλά και το κυτταρικό τοίχωμα πολλών ανώτερων μυκήτων, εξετάζονται για την πιθανή πρεβιοτική τους δραστηριότητα. Οι βασιδιομύκητες λόγω του υψηλού περιεχομένου τους σε β-γλυκάνες και των πολλαπλών ευεργετικών ιδιοτήτων τους παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον ως πιθανά πρεβιοτικά.

Σκοπός: Η μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης των υποψηφίων πρεβιοτικών μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.

Μεθοδολογία: Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκαν λυοφιλωμένα βασιδιοκάρπια από δύο είδη βασιδιομυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*, τα οποία υπέστησαν *in vitro* ζύμωση για 24 ώρες από εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ινουλίνη (τεκμηριωμένο πρεβιοτικό). Στη συνέχεια διαφοροποιημένα Caco-2 κύτταρα επώαστηκαν με το υπερκείμενο των ζυμώσεων αυτών, το οποίο περιελάμβανε τα προϊόντα της ζύμωσης. Τέλος, προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα (%) των κυττάρων με τη χρήση της χρωστικής μπλε τρυπάνης.

Αποτελέσματα: Τα βασιδιοκάρπια των βασιδιομυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* δεν εμφανίζουν τοξική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μετά από ζύμωση 24 ωρών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αντίθετα, επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου αντίστοιχα με την ινουλίνη.

Abstract

Introduction: The gut microbiota seems to play a crucial role on humans' health. The composition of the gut microbiota is affected by factors such as diet, antibiotic treatment and the environment. The prebiotics are selectively fermented components that allow specific changes in the composition or/and activity of the gut microbiota and confer health benefits and wellness to the host. Nowadays Inuline Type Fructans (ITF) and Galactooligosaccharides (GOS) are the only registered prebiotics, while there is a great interest on investigating novel prebiotics. β -glucans which are present in natural foods such as oat, barley and the cell wall of many higher fungi, are investigated for their potential prebiotic effect. The basidiomycetes due to their high content in β -glucans and their multiple health effects attract great research interest as potential prebiotics.

Purpose: The purpose of this study was to investigate the potential cytotoxic effect of the products from *in vitro* fermentation of the potential prebiotic mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* by the gut microbiota of health subjects.

Methods: In this study lyophilized mushrooms from *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* cultures have been fermented *in vitro* for 24h by gut microbiota of healthy subjects. Inulin was used as the positive control. Differentiated Caco-2 cells were incubated with the fermentation supernatant and the viability (%) of the Caco-2 cells was determined by the trypan blue exclusion test.

Results: The fermentation products of the mushrooms by the gut microbiota do not show any toxic effect on the epithelial cells of colon. Instead, they induce the viability of Caco-2 cells similar to inulin.

Θεωρητικό Μέρος

1. Εισαγωγή:

1.1. Ιστορική αναδρομή

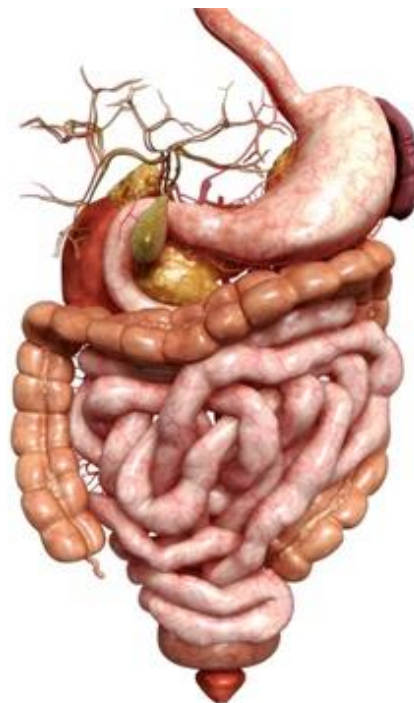
Ο Ιπποκράτης στην αρχαία Ελλάδα το 460-370π.Χ. ο οποίος θεωρείται ο πατέρας της Ιατρικής αναφέρει ότι « Όλες οι ασθένειες προέρχονται από το έντερο». Πολύ πιο μακριά από την Ελλάδα, στην Ανατολική Ασία και συγκεκριμένα στην Κίνα, υποστηρίζεται στην Παραδοσιακή Κινέζικη Ιατρική ότι «Η ρίζα της καλής και κακής υγείας κατοικεί στο έντερο». Φαίνεται λοιπόν, ότι η καλή λειτουργία του εντέρου και ο ρόλος της στην υγεία, προβλημάτιζε τους ανθρώπους από αρχαιοτάτων χρόνων. Το ίδιο ενδιαφέρον συνεχίζεται και στις μέρες μας. Δεδομένου των προβληματισμών αυτών, θεωρείται αναγκαία η συνέχιση της έρευνας για κατάκτηση περισσότερης γνώσης και ανίχνευση νέων μεθόδων που συνδέονται με τη σχέση της καλής λειτουργίας του εντέρου και της υγείας του οργανισμού [1].

1.2. Γαστρεντερικό σύστημα

Το γαστρεντερικό σύστημα είναι ένα από τα βασικότερα ανατομικά συστήματα του ανθρώπου. Ο ρόλος του είναι η είσοδος, η πέψη, η απορρόφηση και η αποβολή της τροφής.

Ο γαστρεντερικός σωλήνας περιλαμβάνει τη στοματική κοιλότητα, το φάρυγγα, τον οισοφάγο, τον στόμαχο, το λεπτό έντερο (δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα, ειλεός) και το παχύ έντερο (ανιόν, εγκάρσιο, κατión, ορθό). Τα επικουρικά του τμήματα αποτελούνται από τους σιελογόνους αδένες, το ήπαρ, τη χοληδόχο κύστη και το πάγκρεας. Αυτά, δεν αποτελούν μέρη του γαστρεντερικού σωλήνα, αλλά μέσω συνδετικών πόρων εκκρίνουν απαραίτητες ουσίες για την πέψη των τροφών.

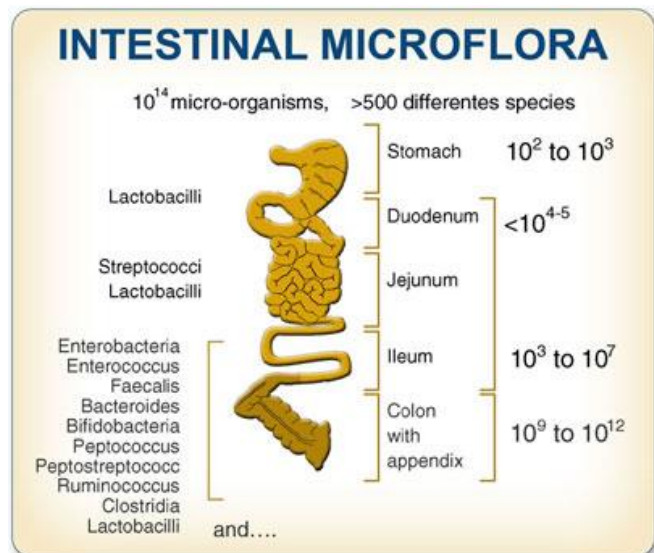
Η τροφή, προσλαμβάνεται από το στόμα όπου γίνεται η μάσησή της και η ανάμειξή της με το σάλιο που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες ώστε να σχηματιστεί ο βλωμός. Στο στόμα, γίνεται μηχανική διάσπαση της τροφής και μερική υδρόλυση των υδατανθράκων από το ένζυμο α-αμυλάση. Στη συνέχεια, μέσω της



κατάποσης, ο βλωμός προωθείται δια μέσου του οισοφάγου στο στομάχι ώστε να προχωρήσει η διαδικασία της πέψης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η πέψη των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών μέσω της έκκρισης ουσιών όπως το HCl (υδροχλωρικό οξύ), τις πεψίνες από τα τοιχώματα του στομάχου, τη χολή από το ήπαρ, τη θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη από το πάγκρεας κτλ. Ακολούθως, οι δομικές μονάδες των τροφών που προκύπτουν απορροφώνται στο λεπτό έντερο. Οι άπεπτες ουσίες προωθούνται στο παχύ έντερο όπου αποθηκεύονται προσωρινά ώστε να γίνει η διαδικασία συμπύκνωσής τους μέσω απορρόφησης άλατος και νερού. Στη συνέχεια η αποβολή τους από τον οργανισμό (αφόδευση) γίνεται με συστολές του ορθού και αποβάλλονται από τον πρωκτό.

1.3. Εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο άνθρωπος στην εντερική του οδό, συμβιώνει με ένα σύνολο μικροοργανισμών (βακτήρια, ιούς – φάγους-, αρχαία, μύκητες), που ονομάζονται εντερικός μικροβιόκοσμος - gut microbiota. Ο όρος «εντερικό μικροβίωμα» - gut microbiome αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων των μικροβίων του εντερικού μικροβιόκοσμου. Το οικοσύστημα αυτό περιέχει περίπου 400-500 διαφορετικά είδη μικροβίων [2].



Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα, μόνο τα 10 τρισεκατομμύρια κύτταρα είναι οργανικά ανθρώπινα κύτταρα ενώ τα υπόλοιπα 90 τρισεκατομμύρια κύτταρα είναι μικροοργανισμοί. Εκτός από «εντερικό μικροβίωμα» χαρακτηρίζεται και ως «μεταγονιδίωμα» ή «δεύτερο γονιδίωμα» [3]. Υπολογίζεται ότι το 70% περίπου αυτών δεν μπορεί να καλλιεργηθεί με τις συνήθεις μικροβιολογικές τεχνικές.

Η πλειοψηφία του εντερικού μικροβιόκοσμου αποτελείται από αυστηρά αναερόβιους μικροοργανισμούς καθώς διαφέρουν σημαντικά από τους αναερόβιους και τους αερόβιους μικροοργανισμούς. Οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που απαντώνται στο έντερο του ανθρώπινου οργανισμού ανήκουν στα φύλα Bacteroidetes και Firmicutes (Ζυμομύκητες). Σε

μικρότερες αναλογίες βρίσκονται τα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria και Cyanobacteria. Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου δεν είναι ομοιογενής αλλά διαφοροποιείται τόσο ως προς την ποιότητα όσο και ως προς την συγκέντρωση των μικροοργανισμών στα διάφορα τμήματα του εντέρου. Μερικά από τα βακτήρια που μπορεί να συναντώνται στον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus* [4].

1.4. Εντερικός μικροβιόκοσμος και ξενιστής

Η σχέση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ξενιστή είναι συμβιωτική. Δηλαδή ο ξενιστής προσφέρει στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς χώρο διαμονής και τροφή, ενώ εκείνοι ευνοούν τη λειτουργία του οργανισμού του ξενιστή. Έτσι ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει ένα ρόλο κλειδί στην υγεία του οργανισμού. Προωθεί την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη λειτουργία της πέψης, του μεταβολισμού των φαρμάκων, της αποτοξίνωσης, της παραγωγής βιταμινών και της πρόληψης εγκατάστασης παθογόνων βακτηρίων. Η ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος συμβαίνει κατά τη μετα-εμβρυική ηλικία [2, 5].

Η αποίκηση της γαστρεντερικής οδού από μικροοργανισμούς ξεκινάει μετά τη γέννηση. Υπάρχουν αναφορές σχετικά με την ανακάλυψη βακτηρίων στον πλακούντα παρόλο που δεν έχει διευκρινιστεί αν τα βακτήρια αυτά φτάνουν τελικά στο έμβρυο [3, 6]. Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου στα βρέφη διαφοροποιείται αναλόγως της μεθόδου του τοκετού. Δηλαδή αν το παιδί γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό, φέρει τα βακτήρια που ζουν στο γυναικείο κόλπο ενώ αν γεννηθεί με καισαρική τομή φέρει τα βακτήρια του δέρματος και κυρίως του περιβάλλοντος στο οποίο γεννιέται [7]. Το μεταγονιδίωμα των βρεφών χαρακτηρίζεται από τον εμπλουτισμό γονιδίων απαραίτητων για την αποδόμηση απλών σακχάρων (π.χ. λακτόζη) ενώ στα βρέφη που έχουν απογαλακτιστεί χαρακτηρίζεται από ποικιλία γονιδίων μεταξύ των οποίων από γονίδια αποδόμησης πολυσακχαριτών και παραγωγής βιταμινών [3, 7].

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες όπως η διαίτα, η αντιβιοτική θεραπεία και η περιβαλλοντική έκθεση σε μικροοργανισμούς. Επιπλέον παράγοντες είναι το φύλο, η ηλικία και η γεωγραφική καταγωγή του ατόμου. Στον

Πίνακα 1 παρατίθενται οι μεταβολές του εντερικού μικροβιόκοσμου στις διάφορες ηλικίες [2].

Αντιστοίχως η αντιβιοτική θεραπεία, η κατάχρηση οινόπνεύματος και η ακατάλληλη (λανθασμένου προτύπου) διαίτα μπορούν να οδηγήσουν σε υπερανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτού του τύπου η ανισορροπία ονομάζεται *δυσβίωση*. Η δυσβίωση μπορεί να έχει δυσχερείς επιδράσεις στην υγεία του ατόμου όπως διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, εμφάνιση άσθματος (AHR), φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (IBD) αλλά και ανάπτυξη παχυσαρκίας [3, 5].

Πίνακας 1.1

Νεογνική ηλικία		Παιδική ηλικία	Ενήλικες	Ηλικιωμένοι
Η μικροχλωρίδα εξαρτάται από τον τρόπο γέννησης		Νέα στελέχη αντικαθιστούν παλαιότερα	Σχετικά σταθερή σύνθεση μικροχλωρίδας σε κάθε άτομο	
Φυσιολογικός τοκετός	Καισαρική	Αύξηση της ποικιλίας	Διαφοροποιημένη μικροχλωρίδα μεταξύ ατόμων	Σημαντικά διαφοροποιημένες μικροχλωρίδες σε σχέση με νεότερες ηλικίες
Η μικροχλωρίδα από τη μητέρα: • Lactobacillus • Prevotella	• Staphylococcus • Corynebacterium • Propionibacterium • Ευπάθεια σε παθογόνα • Κίνδυνος αλλεργικών νοσημάτων	Πρώιμη μικροβιοτική ανάπτυξη = υψηλού βαθμού αστάθεια Μεταβολές λόγω διατροφής ή νόσου	Η μικροχλωρίδα μεταβάλλεται αλλά με μικρότερο ρυθμό από ό,τι στην παιδική ηλικία	

A. –Φ.Α. Μεντής, Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ορόλος του στην υγεία και στη νόσο, Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, 2013

1.5. Λιπαρά Οξέα Βραχέας Αλύσου - SCFA

Η παραγωγή των λιπαρών οξέων βραχέας αλύσου (SCFA – ShortChainFattyAcids) ως κύρια προϊόντα του μεταβολισμού του εντερικού μικροβιόκοσμου (αποτέλεσμα των ζυμώσεων που διεξάγει στο παχύ έντερο) φαίνεται να κατέχει καίριο ρόλο στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Τα SCFA που μελετώνται ως προς τις ευεργετικές τους ιδιότητες είναι κυρίως το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ.

Τα SCFA παράγονται από τα βακτήρια που κατοικούν στο παχύ έντερο. Αναφέρεται ότι τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* παράγουν μέσω ζύμωσης γαλακτικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια μεταβολίζεται από τους «αξιοποιητές γαλακτικού οξέος» με αποτέλεσμα να

προκύπτει το βουτυρικό οξύ [8, 9]. Το βουτυρικό οξύ φαίνεται να είναι το SCFA με τη μεγαλύτερη ευεργετική δράση στον οργανισμό.

Στο παχύ έντερο όπου παράγονται μειώνουν το pH, με αποτέλεσμα να δημιουργούν αντίξοες συνθήκες για παθογόνους μικροοργανισμούς [9, 10]. Η υδατοδιαλυτότητά τους, τους επιτρέπει να απορροφώνται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Κυρίως χρησιμοποιείται το βουτυρικό οξύ το οποίο μάλιστα προτιμάται ακόμα και αν είναι διαθέσιμη η γλυκόζη ή η γλουταμίνη. Τα SCFA χρησιμοποιούνται και μεταβολίζονται στον μύες και στον εγκέφαλο ενώ το προπιονικό οξύ μεταβολίζεται στο ήπαρ. Ο μεταβολισμός του προπιονικού οξέος στο ήπαρ, μπορεί να προωθή τη μείωση της ηπατικής παραγωγής χοληστερόλης [9, 11].

Τα ευεργετικά αποτελέσματα από την παρουσία SCFA όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιτελούνται και μέσω της δράσης τους σε άλλα μόρια. Όπως για παράδειγμα στους υποδοχείς GRP41 και GRP43, επιδρούν σε νευροπεπτίδια και άλλα.

1.6. Προβιοτικά

«Οι ζωντανοί οργανισμοί οι οποίοι χορηγούμενοι σε επαρκή ποσότητα έχουν ωφέλιμη επίδραση στον ξενιστή» ονομάζονται προβιοτικά [2, 12]. Τα περισσότερα προβιοτικά ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η ευεργετική τους δράση φαίνεται ότι ασκείται με 3 τρόπους. Πρώτος τρόπος είναι η αναστολή της ανάπτυξης άλλων βακτηρίων στο έντερο προάγοντας την παραγωγή αντιμικροβιακών ή μεταβολικών παραγόντων. Δεύτερος τρόπος είναι η ενίσχυση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού και τρίτος τρόπος η τροποποίηση των μηχανισμών ανοσίας του γαστρεντερικού συστήματος [2].

Δεδομένου αυτών φαίνεται η σημαντικότητα στη διατήρηση μιας υγιούς ισορροπίας στον εντερικό μικροβιόκοσμο ευνοώντας τα προβιοτικά βακτήρια.

1.7. Διαιτητικές ίνες

Οι διαιτητικές ίνες σύμφωνα με την επιτροπή CODEX Alimentarius (2009) ορίζονται ως πολυμερή υδατανθράκων με 10 ή περισσότερα μονομερή τα οποία δεν υδρολύονται από ενδογενή ένζυμα στο λεπτό έντερο. Αυτά μπορεί να είναι εδώδιμοι υδατάνθρακες που υπάρχουν φυσικά στα τρόφιμα που καταναλώνουμε, πολυμερή υδατανθράκων που

απομονώθηκαν από ωμά τρόφιμα με φυσικές, ενζυμικές ή χημικές μεθόδους ή συνθετικά πολυμερή υδατανθράκων [13].

Στο παχύ έντερο οι διαιτητικές ίνες ενδέχεται να υφίστανται ολική ή μερική ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο με αποτέλεσμα πιθανώς ευεργετικές συνέπειες στον οργανισμό του ξενιστή τους. Οι θετικές επιδράσεις που μπορεί να έχουν σχετίζονται με την επίδραση που έχουν στους μικροοργανισμούς του εντέρου, ευνοώντας την ανάπτυξη κάποιων μικροβιακών πληθυσμών αλλά και τις διάφορες αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια στην γαστρεντερική οδό.

Για παράδειγμα, κάποιες διαιτητικές ίνες προωθούν το αίσθημα του κορεσμού μέσω της διάτασης του στομάχου λόγω του αυξημένου χρόνου μάσησης που απαιτούν συνήθως τα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες και των προϊόντων των ζυμώσεων των μικροοργανισμών του εντέρου. Λόγω του αυξημένου χρόνου μάσησης προωθείται η παραγωγή και έκκριση σιέλου καθώς και έκκριση γαστρικού υγρού το οποίο οδηγεί σε αύξηση της γαστρικής διάτασης. Η διάταση του στομάχου πραγματοποιείται και από μερικές ίνες οι οποίες έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν μόρια νερού, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο όγκος τους. Η διάταση του στομάχου πιστεύεται ότι δίνει το έναυσμα στα προσαγωγά πνευμονογαστρικά νεύρα ότι υπάρχει πλήρωσή του και αυτό συμβάλλει στο αίσθημα κορεσμού κατά τη διάρκεια των γευμάτων αλλά και μετά από αυτά.

Επιπλέον μερικές διαιτητικές ίνες επιβραδύνουν την γαστρική κένωση και μειώνουν το ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης στο λεπτό έντερο. Όταν η απελευθέρωση την γλυκόζης στο λεπτό έντερο γίνεται με αργό ρυθμό αμβλύνεται και η απόκριση της ινσουλίνης. Επομένως αυτή η αργή και σταθερή μεταγευματική απόκριση ινσουλίνης στη γλυκόζη συχνά συσχετίζεται με τον κορεσμό [9].

1.8. Πρεβιοτικά

Οι Gibson και Roberfroid (1995) εισήγαγαν τον όρο «πρεβιοτικά» ώστε να διαφοροποιηθούν από τον όρο «προβιοτικά». Το πρόθεμα «πρε» σημαίνει «πριν από» ή «για το» [14, 15]. Επομένως τα πρεβιοτικά ορίστηκαν από τους ίδιους ως «άπεπτα συστατικά των τροφίμων που επιδρούν θετικά στον ξενιστή, προωθώντας εκλεκτικά την ανάπτυξη ή/και τη δράση ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο έντερο με αποτέλεσμα τη βελτίωση της υγείας του ξενιστή». Το 2008 οι Gibson και Probert τροποποίησαν τον ορισμό για τα πρεβιοτικά ως «εκλεκτικά ζυμώσιμα συστατικά τα οποία επιτρέπουν συγκεκριμένες αλλαγές,

στη σύνθεση ή/και στη δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου και προσδίδουν όφελος ευεξίας και υγείας στον ξενιστή». Σήμερα χρησιμοποιείται ένας τρίτος ορισμός ο οποίος τέθηκε το 2008 στο 6^ο Συνέδριο Διεθνούς Επιστημονικής Εταιρίας Προβιοτικών και Πρεβιοτικών στο Λονδίνο του Οντάριο. Κατά τον 3^ο ορισμό «Ένα διαιτητικό πρεβιοτικό είναι ένα εκλεκτικά ζυμώσιμο συστατικό το οποίο έχει ως αποτέλεσμα συγκεκριμένες αλλαγές, στη σύνθεση ή/και στη δράση του γαστρεντερικού μικροβιόκοσμου, ως εκ τούτου προσδίδει όφελος στην υγεία του ξενιστή» [14].

Τα κριτήρια που έχουν τεθεί ώστε ένα συστατικό των τροφίμων να μπορεί να χαρακτηριστεί ως πρεβιοτικό είναι τα εξής:

- Εμφανίζει αντίσταση στην ανώτερη εντερική οδό
- Υφίσταται ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο
- Έχει ευεργετική επίδραση στον ξενιστή
- Προωθεί εκλεκτική αύξηση και ανάπτυξη προβιοτικών
- Παρουσιάζει σταθερότητα στην επεξεργασία των τροφίμων [16]

Τα πρεβιοτικά φαίνεται να προωθούν την εκλεκτική αύξηση και ανάπτυξη ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων, όπως στελεχών των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* στο έντερο. Παράλληλα καταστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Clostridium* και *Bacteroides*. Έχοντας ως γνώμονα την πιο πάνω διαπίστωση οι Palframan et al. το 2003 σχεδίασαν ένα συγκριτικό ποσοτικό εργαλείο για τη μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης *in vitro*. Αυτό το εργαλείο είναι γνωστό ως Πρεβιοτικός Δείκτης (PI – Prebiotic Index). Η αύξηση των *Bifidobacterium* ή/και *Lactobacillus* προσδίδει θετικό αποτέλεσμα στον δείκτη (PI) ενώ η αύξηση των *Bacteroides* και *Clostridium* αρνητικό. Ο πρεβιοτικός Δείκτης (PI) πιο συγκεκριμένα ορίζεται ως:

$$Prebiotic\ Index = \frac{Bif}{Total} - \frac{Bac}{Total} + \frac{Lac}{Total} - \frac{Clos}{Total}$$

Όπου Bif: *Bifidobacterium*, Bac: *Bacteroides*, Lac: *Lactobacillus*, Clos: *Clostridium* ως οι αντίστοιχοι μικροβιακοί πληθυσμοί που καταμετρώνται στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή του δείγματος.

1.9. Ινουλίνη ως πρεβιοτικό

Μέχρι σήμερα έχουν κατοχυρωθεί δύο (2) συστατικά των τροφίμων τα οποία μπορούν να χαρακτηρισθούν ως πρεβιοτικά. Το πρώτο συστατικό είναι οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης (ITF – inulin-typefructans) και το δεύτερο συστατικό οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS – galacto-oligosaccharides). Πιο συγκεκριμένα στην κατηγορία των ITF υπάγονται η ινουλίνη (μικρό έως μεγάλο μέγεθος πολυμερών), οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS – ενζυματική σύνθεση από φρουκτόζη) και η ολιγοφρουκτόζη (μερική ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης) [17]. Οι GOS υπάγονται στην ευρύτερη κατηγορία των γαλακτανών. Επίσης, πρεβιοτική δράση μπορούν να έχουν μίγματα των γαλακτανών με τις FOS γνωστά ως GOS-FOS ή scGOS – lcFOS (shortchaingalacto- oligosaccharides, longchainfructo-oligosaccharides).

Η ινουλίνη ανήκει στις διαλυτές διαιτητικές ίνες [9]. Η σύνθεσή της γίνεται από γραμμικές αλυσίδες αποτελούμενες από μόρια φρουκτόζης συνδεδεμένα με β -(1,2) δεσμούς και ένα τελικό μόριο γλυκόζης. Είναι άπεπτη από τα ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού ενώ υφίσταται ζύμωση στο παχύ έντερο. Θεωρείται ότι ανήκει στις φυτικές ίνες με πρεβιοτική δράση αυξάνοντας τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* [8, 10], ενώ έχει προταθεί ότι πιθανώς να ευνοεί την ανάπτυξη και άλλων ευεργετικών βακτηρίων που ζουν στο έντερο [18]. Επίσης σύμφωνα με τους Petry et al., [19] η κατανάλωση ινουλίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την απορρόφηση του σιδήρου από το εντερικό επιθήλιο του δωδεκαδακτύλου σε γυναίκες με χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου στο αίμα.

Οι ευεργετικές της ιδιότητες φαίνεται ότι εναποτίθενται κυρίως στην εκλεκτική αύξηση στελεχών των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, στην παραγωγή SCFA και στην μείωση του pH του εντερικού αυλού μέσω της παραγωγής των SCFA. Η μείωση του pH εμποδίζει την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

Το αλεύρι, τα κρεμμύδια, η μπανάνα, το σκόρδο και τα ραδίκια είναι μερικά από τα τρόφιμα που περιέχουν εκ φύσεως μερικές ποσότητες ινουλίνης.

1.10. Πρεβιοτικά και ξενιστής

Τα οφέλη που αποκομίζει ο ξενιστής μέσω της συστηματικής κατανάλωσης πρεβιοτικών σχετίζονται άμεσα με την εκλεκτική ανάπτυξη ή/και ενεργότητα ενός ή

περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου. Συνοπτικά τα οφέλη αυτά αναφέρονται ως εξής:

- Βελτίωση ή/και σταθεροποίηση της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου
- Βελτίωση της εντερικής λειτουργίας (σταθεροποίηση, τακτικότητα, συνοχή κοπράνων)
- Μείωση του κινδύνου εντερικών λοιμώξεων
- Αύξηση της απορρόφησης μεταλλικών στοιχείων
- Βελτίωση της υγείας του ερειστικού συστήματος
- Ρύθμιση της γαστρεντερικής παραγωγής πεπτιδίων
- Ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας μέσω του μεταβολισμού
- Ρύθμιση του αισθήματος κορεσμού

Επίσης συμμετέχουν στην έναρξη και ρύθμιση των ανοσολογικών μηχανισμών, βελτιώνουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού και μειώνουν τη μεταβολική ενδοτοξαιμία. Φαίνεται ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και μεταβολικού συνδρόμου. Επιπλέον φαίνεται να μειώνεται ο κίνδυνος και να βελτιώνεται η διαχείριση της εντερικής φλεγμονής όπως και να μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του εντέρου [14].

1.11. Ευεργετικά αποτελέσματα β-γλυκανών στην υγεία

Οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες με μοναδικό δομικό λίθο τη γλυκόζη. Περιλαμβάνουν το γλυκογόνο, την κυτταρίνη και τη δεξτράνη. Η συμπύκνωση των μορίων της γλυκόζης μπορεί να γίνει από την υδροξυλομάδα (-OH) οποιουδήποτε ατόμου άνθρακα (του μορίου γλυκόζης) καταλήγοντας στη διαμόρφωση α- ή β-ανωμερούς και στην τελική διαμόρφωση μονής ή τριπλής έλικας [20] με ή χωρίς διακλαδώσεις [17]. Παρά τον μεγάλο αριθμό πιθανών συνδυασμών που μπορούν να προκύψουν, στη φύση απαντώνται μόνο μερικοί από αυτούς. Το μοριακό τους βάρος ποικίλλει από δεκάδες έως χιλιάδες kDa όπως και η διαλυτότητα τους στο νερό. Η βιολογική τους δράση βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις τους με υποδοχείς β-γλυκοπυρανόζης οι οποίοι υπάρχουν στα λευκοκύτταρα. Το μοριακό τους βάρος, όπως και η υδατοδιαλυτότητά τους, είναι δύο παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν αυτήν την αλληλεπίδραση με εμφανές πλεονέκτημα στις β-γλυκάνες που

παρουσιάζουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα [20]. Οι φυσικές ιδιότητες των γλυκανών εξαρτώνται κυρίως από την προέλευσή τους.

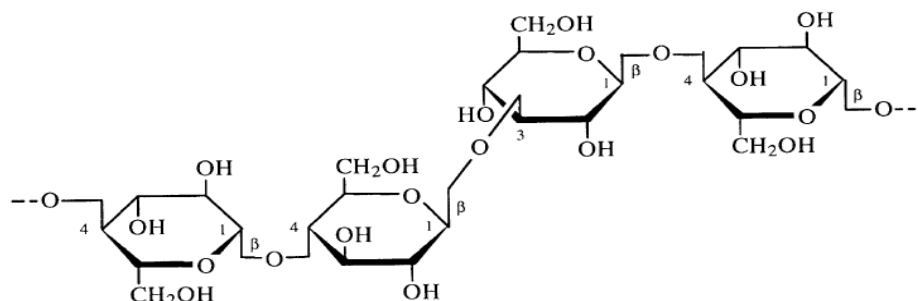


Figure 1 The basic structure of β -glucans with combination bonds (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4).
Data from Velisek (1999)⁴.

Οι β -γλυκάνες απαντώνται σε διάφορα φυτά με διαφορετικές μορφές. Οι β -1,3-D-γλυκάνες και οι β -1,4-D-γλυκάνες βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των ανώτερων φυτών και στους καρπούς μερικών δημητριακών π.χ. στη βρώμη. Οι μύκητες, οι μούχλες και οι ζύμες συνθέτουν κυρίως β -1,3-D-γλυκάνες και β -1,6-D-γλυκάνες [20].

Έχει φανεί ότι η αυξημένη κατανάλωση β -γλυκανών προωθεί την αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης με αποτέλεσμα να μπορούν να συμβάλουν στη θεραπεία του Σακχαρώδη Διαβήτη II. Επίσης φαίνεται να προωθούν τη δραστηριότητα των μακροφάγων. Έτσι αυξάνεται η παραγωγή των IL-1, IL-6 και IL-8 οι οποίες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή άλλων λευκοκυττάρων.

Όσον αφορά στις δυσλιπιδαιμίες έχει αναφερθεί σε μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια και χάμστερ ότι οι β -γλυκάνες έδειξαν να έχουν σημαντικό ρόλο στην μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα. Στους ανθρώπους, οι β -γλυκάνες από μύκητες, μειώνουν τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL χοληστερόλης, ελεύθερων λιπαρών οξέων ενώ παράλληλα αυξάνουν ελαφρώς τα επίπεδα HDL χοληστερόλης στο αίμα. Τα χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης πιθανώς σχετίζονται με αυξημένη ποσότητα λεπτίνης η οποία παράγεται από τον λιπώδη ιστό και αναφέρεται ότι η ποσότητα της λεπτίνης είχε παραχθεί αποκλειστικά λόγω της συμπληρωματικής χορήγησης β -γλυκανών. Επομένως, οι β -γλυκάνες προωθούν εμμέσως την βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ [20].

Η δράση τους επηρεάζεται από το pH που συναντούν κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα λευκοκύτταρα. Αν το pH είναι αλκαλικό τότε η δομή της τριπλής έλικας

αποδιατάσσεται σχηματίζοντας μονή έλικα. Η μονή έλικα φαίνεται να παρουσιάζει σημαντικότερη ευεργετική δράση λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύεται σε μόρια ανοσοσφαιρινών που βρίσκονται στον ορό του αίματος. Ένα πιο ουδέτερο περιβάλλον στο διάλυμα της γλυκάνης αυξάνει την κοινοποίηση των μορίων της μονής έλικας με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο διαθέσιμα για πρόσδεση στις πρωτεΐνες. Έτσι ρυθμίζεται η παραγωγή αντισωμάτων από τα μακροφάγα. Αν το pH είναι όξινο οι υδροξυλομάδες (-OH) αποδιατάσσονται, με αποτέλεσμα την μείωση της βιολογικής δράσης των γλυκανών [20].

1.12. β-γλυκάνες ως υποψήφια πρεβιοτικά

Οι β-γλυκάνες έχουν προταθεί ως πιθανά πρεβιοτικά συστατικά των τροφίμων. Η έρευνα μέχρι τώρα έχει δείξει ότι οι προϋποθέσεις κατάταξής τους σε συστατικά τροφίμων με πρεβιοτική δράση πληρούνται. Καταρχάς παρουσιάζουν αντίσταση στα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπινου σώματος και φαίνεται ότι προωθούν την υγεία του ξενιστή τους. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι προωθούν εκλεκτικά την αύξηση των ευεργετικών μικροοργανισμών του εντέρου όπως τα βακτήρια των γενών *Lactobacillus* και τα *Bifidobacterium* ενώ οι ίδιες υφίστανται ζύμωση [17]. Τέλος οι β-γλυκάνες μπορούν να διατηρούν τη δομή τους κατά τη μαγειρική παρασκευή των τροφίμων που τις περιέχουν [17, 21].

2. Βασιδιομύκητες

2.1. Βιολογική δομή μυκήτων/ βασιδιομυκήτων

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι ευκαριωτικοί οργανισμοί και αποτελούν ένα από τα 5 Βασίλεια των έμβιων όντων με κυτταρική δομή. Τα κύτταρά τους δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι (<0,1mm). Όταν όμως σε κάποια φάση του βιολογικού τους κύκλου σχηματίσουν καρποφορίες που μπορεί να φτάσουν από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και πάνω από μισό μέτρο γίνονται ορατοί και χαρακτηρίζονται ως μακρομύκητες.

Οι Βασιδιομύκητες είναι ένα από τα φύλα τους. Τα κύτταρα των βασιδιομυκήτων ονομάζονται υφές ενώ το σώμα τους το οποίο δημιουργείται από το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο. Η κάθε υφή περιβάλλεται από κυτταροπλασματική μεμβράνη και

κυτταρικό τοίχωμα ενώ στο εσωτερικό περιέχεται το κυτταρόπλασμα στο οποίο βρίσκονται διάφορα οργανίδια και ο πυρήνας του κυττάρου. Για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων πραγματοποιείται αύξηση του κυτταροπλάσματος, επιμήκυνση και διακλάδωση της υφής και μιτωτική διαίρεση του πυρήνα. Έτσι σχηματίζεται ένας πολυπύρηνος οργανισμός που μπορεί στη συνέχεια να αναπτυχθεί σε καινούριο μυκήλιο. Οι υφές των Βασιδιομυκητών φέρουν κατά διαστήματα εγκάρσια διαφράγματα που έχουν την ιδιότητα (επειδή δεν είναι πλήρη) να επιτρέπουν την μετακίνηση μορίων και την επικοινωνία των κυττάρων κατά μήκος των υφών. Κατά την παραγωγή αναπαραγωγικών οργάνων ή όταν υπάρχει ανάγκη απομάκρυνσης τραυματισμένων ή γηρασμένων υφών σχηματίζονται πλήρη εγκάρσια διαφράγματα.

Η αναπαραγωγή των Βασιδιομυκητών γίνεται εγγενώς ή αγενώς. Η εγγενής αναπαραγωγή τους, προϋποθέτει τη σύζευξη δύο πυρήνων με τους γαμέτες αντιθέτου φύλου. Οι γαμέτες των βασιδιομυκήτων ονομάζονται βασιδιοσπόρια και σχηματίζονται στα βασίδια τα οποία είναι εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα και βρίσκονται στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια των βασιδιοκαρπίων, των μανιταριών. Ακολουθεί ο σχηματισμός του ζυγωτού που οδηγεί σε μυκήλιο με νέο γονότυπο. Αντιθέτως κατά την αγενή αναπαραγωγή παράγονται μετά από μιτωτική διαίρεση του πυρήνα τα κονίδια από εξειδικευμένες υφές, τις κονιδιοφόρες υφές. Οι κονιδιοφόρες υφές σχηματίζονται από τις υφές του μυκηλίου ή από υφές που βρίσκονται στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια σύνθετων καρποφοριών αγενούς αναπαραγωγής. Τα κονίδια μετά την εκβλάστησή τους παράγουν ένα νέο μυκήλιο το οποίο θεωρητικά έχει τον ίδιο γονότυπο με το μητρικό μυκήλιο.

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και μπορούν να προσλαμβάνουν τις οργανικές ενώσεις που χρειάζονται για την τροφή τους με τρεις (3) τρόπους οι οποίοι χρησιμοποιούνται και για τη διάκρισή τους. Αρχικά διακρίνονται ως σαπροφυτικά καθώς τρέφονται αποικοδομώντας τις οργανικές ενώσεις νεκρών κυττάρων άλλων οργανισμών. Είναι γνωστό ότι είναι σημαντικοί αποικοδομητές στον πλανήτη. Δεύτερη διάκριση αποτελούν τα παρασιτικά τα οποία τρέφονται εις βάρος άλλων ζωντανών οργανισμών και συχνά μπορεί να προκαλέσουν τον θάνατο στον ξενιστή. Τρίτη διάκριση είναι αυτή των μυκορριζικών. Χαρακτηρίζονται από τη συμβιωτική σχέση των μυκήτων με τις ρίζες των δέντρων ώστε να παίρνουν οι ίδιοι τις οργανικές ενώσεις που χρειάζονται προσδίδοντας παράλληλα στο φυτό μεγαλύτερη απορροφησιμότητα ύδατος και ανόργανων στοιχείων [22].

Η παρούσα μελέτη, ασχολείται με 2 είδη των Βασιδιομυκήτων, το *Pleurotus ostreatus* και το *Ganoderma lucidum*.

2.2. Σημαντικότητα μανιταριών στην ιστορία

Τα μανιτάρια δεν είναι μια τροφή η οποία έχει διαδοθεί τα τελευταία χρόνια αλλά βρίσκουμε την ύπαρξή τους και τη χρήση τους στην αρχαιότητα. Υπάρχουν αναφορές για τη χρήση τους από πολιτισμούς σε διαφορετικές χώρες ακόμα και σε διαφορετικές Ηπείρους [23].

Η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή μέσω καλλιέργειας είναι η Κίνα ακολουθούμενη από τις Η.Π.Α., την Ολλανδία, τη Γαλλία, Την Ισπανία, την Πολωνία, την Ιταλία, τον Καναδά, την Ιρλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο [24]. Το έτος 2007 η Κίνα παρήγαγε πάνω από 1,5 εκατομμύρια τόνους μανιταριών αριθμός ο οποίος αντικατοπτρίζει αύξηση της παραγωγής κατά 65% μέσα σε 10 χρόνια [16].

Από την αρχαιότητα τα μανιτάρια χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα και παράλληλα είχαν θεραπευτική εφαρμογή. Στη Νιγηρία γίνεται χρήση τους για τη θεραπεία των πονοκεφάλων, του κρυώματος, του πυρετού, της δυσκοιλιότητας, της αρθρίτιδας, διαφόρων μορφών νεοπλασιών, για την ελάττωση της υπέρτασης, για τη μείωση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και την προστασία των ηπατικών κυττάρων όπως και στη θεραπεία αρρώστων αγελάδων. Επίσης, χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της υπέρμετρης ανάπτυξης του εμβρύου ώστε να διευκολυνθεί ο τοκετός [25]. Στην Κίνα είναι ευρέως διαδεδομένα τόσο ως τρόφιμο και διαιτητικό συμπλήρωμα όσο και ως φαρμακευτικό τρόφιμο στην παραδοσιακή Κινέζικη ιατρική για πάνω από 2000 χρόνια και πιστεύεται ότι είναι το «ελιξίριο της ζωής» [16, 26].

Στην αρχαία Ελλάδα υπήρχε η πεποίθηση ότι τα μανιτάρια ήταν μία τροφή που παρείχε δύναμη στους στρατιώτες. Οι Ρωμαίοι τα θεωρούσαν ως «τροφή των θεών» όπως αντιστοίχως οι Αιγύπτιοι τα θεωρούσαν προτέρημα των προνομιούχων – βασιλέων και κανείς «κοινός θνητός» δεν είχε το δικαίωμα να καταναλώσει αυτήν την ανεκτίμητη τροφή [26].

Επίσης οι Αιγύπτιοι κοσμούσαν τους τάφους τους με σχετικά ποιήματα όπως το ακόλουθο: «Χωρίς φύλλα, χωρίς μπουμπούκια, χωρίς λουλούδια: όμως από φρούτα: ως τρόφιμο, ως τονωτικό, ως φάρμακο: ολόκληρη η πλάση είναι ανεκτίμητη» θέλοντας να τονίσουν τη σημαντικότητα των μανιταριών στη ζωή τους [25].

2.3. Διατροφική αξία

Τα μανιτάρια κατατάσσονται στην ομάδα των λαχανικών. Τα ωμά λαχανικά, θεωρητικά περιέχουν 5γρ υδατανθράκων, 3γρ πρωτεϊνών και 1-4γρ διαιτητικών ινών σε 1

φλιτζάνι. Η περιεκτικότητα σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά για κάθε λαχανικό διαφέρει. Στην περίπτωση των μανιταριών, η αυξημένη περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, η μειωμένη περιεκτικότητά τους σε λίπη και το μειωμένο θερμιδικό τους περιεχόμενο, επιτρέπει τη χρησιμοποίησή τους σε δίαιτες χαμηλών θερμίδων σε μία ισορροπημένη δίαιτα ή σε μια χορτογαφική δίαιτα [27].

Η χημική σύσταση των μανιταριών και η ποσοστιαία περιεκτικότητά τους σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, μεταβάλλεται αναλόγως της σύστασης του εδάφους (θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας), των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν κατά την καλλιέργεια και το στέλεχος του μανιταριού. Θεωρείται ότι καλή αναλογία C/N (άνθρακας προς άζωτο) του υποστρώματος για την καλλιέργειά τους είναι 40:1 ενώ το προτιμότερο pH (για τα *Pleurotus* spp.) είναι 5,5. Ένας άλλος παράγοντας που καθορίζει τη σύσταση του μανιταριού είναι το στάδιο ανάπτυξής του [27]. Η ακριβής σύσταση του μανιταριού όμως που θα φτάσει στον καταναλωτή επηρεάζεται και από τη διαδικασία και τις μαγειρικές παρασκευές που θα υποστεί [26].

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη κυμαίνεται από 200-250g/Kg (περίπου 19-35%) επί ξηρής μάζας κάτι το οποίο κατατάσσει τα μανιτάρια ως λαχανικό με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από τα περισσότερα λαχανικά. Συγκρινόμενα με άλλα πρωτεϊνούχα τρόφιμα περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία σε αλβουμίνες και σφαιρίνες και μικρότερη αναλογία σε προλαμίνες και γλουτελίνες [27]. Επίσης περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τους ενήλικες. Σε μεγαλύτερη αναλογία βρίσκονται τα αμινοξέα λευκίνη, βαλίνη, γλουταμίνη, γλουταμινικό οξύ και ασπαρτικό οξύ [26].

Τα μανιτάρια, ως λαχανικά περιέχουν στη ξηρή τους μάζα κυρίως υδατάνθρακες. Το εύρος της ποσότητας των υδατανθράκων τους κυμαίνεται από 20% έως πάνω από 70% επί ξηρής μάζας κάτι το οποίο εξαρτάται κυρίως από το στέλεχος του μανιταριού αλλά και από άλλους παράγοντες όπως το υπόστρωμα καλλιέργειας, οι συνθήκες θερμοκρασίας και pH που επικρατούν στην καλλιέργεια κ.α.. Στα περισσότερα λαχανικά οι υδατάνθρακες που περιλαμβάνονται είναι στην μορφή του αμύλου. Στην περίπτωση των μανιταριών όμως οι υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται ως αποθήκη βρίσκονται στη μορφή του γλυκογόνου [25]. Εκτός από το γλυκογόνο η κατηγορία των υδατανθράκων στα μανιτάρια περιλαμβάνει ραμνόζη, ξυλόζη, φουκόζη, αραβινόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη, μαννόζη, μαννιτόλη, σακχαρόζη, μαλτόζη, τριαλόζη, ημικυτταρίνη, χιτίνη και γλυκάνες στις οποίες μάλιστα αποδίδονται πολλές από τις εκτιμώμενες ευεργετικές τους ιδιότητες.

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε λιποειδή περιορίζεται σε 20-30g/Kg επί ξηρής μάζας (2-6%). Συναντώνται τρία (3) κύρια λιπαρά οξέα. Αυτά είναι το πολυακόρεστο

λινολειακό οξύ (C18:2), το μονοακόρεστο ολειακό οξύ (C18:1) και το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (C16:0). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχουν ανιχνευθεί trans- ισομερή των ακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία έχουν κατηγορηθεί για την αθηρογένεση και άλλες επιβλαβείς επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα [26].

Τέλος, στη χημική ανάλυση των μανιταριών παρουσιάζεται η τέφρα. Καταλαμβάνει τα 80-120g/Kg επί ξηρής μάζας (5-12%). Σε αυτήν εντοπίζονται πολλά σημαντικά μικροσυστατικά και απαραίτητα στοιχεία. Στην τέφρα εντοπίζουμε βιταμίνες σε μεγάλες ποσότητες όπως η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη και το φυλλικό οξύ και ίχνη των βιταμινών C, B1, B12, D, E [26]. Τα μανιτάρια είναι η μοναδική τροφή φυτικής προέλευσης στην οποία περιέχεται βιταμίνη D και ιδιαιτέρως στα άγρια μανιτάρια, σε σύγκριση με τα μανιτάρια που βρίσκονται σε καλλιέργειες. Τα στοιχεία που απαντώνται στην τέφρα των μανιταριών είναι το νάτριο (Na), το κάλιο (K), το μαγνήσιο (Mg), ο φώσφορος (P), το θείο (S), ο ψευδάργυρος (Zn), ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το μαγγάνιο (Mn) και το σελήνιο (Se) [25, 27].

Η περιεκτικότητα του εδάφους όμως σε διάφορα συστατικά, μπορεί να προσδώσει στα μανιτάρια στοιχεία τα οποία έχουν επιβλαβείς δράσεις στον οργανισμό του καταναλωτή. Για παράδειγμα τα βαρέα μέταλλα αρσενικό, κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος, ψευδάργυρος μπορούν να δηλητηριάσουν και να επιφέρουν τον θάνατο στον καταναλωτή. Επίσης τα ραδιενεργά στοιχεία κάλιο (K), ρουβίδιο (Rb) και καίσιο (¹³⁷Cs) μπορούν να βλάψουν τον οργανισμό. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών των τοξικών στοιχείων βρέθηκαν σε μανιτάρια τα οποία φύονταν σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές. Σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωσή τους διαδραματίζει εκτός από τη συγκέντρωσή τους στο έδαφος και το στέλεχος του μανιταριού, το στάδιο ωριμότητάς του και ο ρυθμός ανάπτυξής του [27].

2.4. Ευεργετικές ιδιότητες

Τα μανιτάρια φαίνεται να έχουν σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες στον καταναλωτή τους κάτι το οποίο όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είχαν ανακαλύψει διάφοροι πολιτισμοί σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης χιλιάδες χρόνια πριν. Οι ευεργετικές αυτές ιδιότητες καταγράφονται παρακάτω [27, 28].

- Ανοσορύθμιση
- Αποτοξίνωση
- **Αντικαρκινική δράση**
- Αντιφλεγμονώδης δράση

- Αναλγητική δράση
- **Αντιοξειδωτική δράση**
- Αντιδιαβητική δράση
- Αντιμικροβιακή δράση
- Αντιαλλεργική δράση
- Προστασία ήπατος
- Καρδιοπροστατευτική δράση
- **Ρύθμιση λιπιδαιμικού προφίλ**
- **Πιθανή πρεβιοτική δράση**
- Καλλυντική χρήση

Η *αντιοξειδωτική δράση* των μανιταριών οφείλεται στις βιοδραστικές εργοστερόλες και στις πολυφαινολικές ενώσεις τις οποίες περιέχουν. Έχει φανεί ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα εμποδίζοντας έτσι την περεταίρω οξείδωση και καταστροφή των κυττάρων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε δυσχερή αναδόμηση κυττάρων, καρκίνο και καρδιαγγειακές παθήσεις.

Οι β-γλυκάνες που περιέχονται σε συνδυασμό με πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δημιουργούν φαίνεται να έχουν αντικαρκινική δράση. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες χρησιμοποιώντας κυτταροκαλλιέργειες, για *in vitro* πειράματα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του αίματος, της λέμφου, του μαστού, της ουροδόχου κύστεως, του προστάτη, του ήπατος, των πνευμόνων και του μυελού των οστών στα οποία εκφράστηκε *αντικαρκινική δράση*. Έχουν καταγραφεί πέντε (5) μηχανισμοί δράσης οι οποίοι αναφέρονται ακολούθως:

1. Ενεργοποίηση / ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης του οργανισμού
2. Κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα
3. Αναστολή της αγγειογένεσης που σχηματίστηκε από τα καρκινικά κύτταρα του όγκου
4. Αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και της μεταστατικής τους συμπεριφοράς
5. Απενεργοποίηση καρκινογένεσης μέσω κυτταροπροστασίας [26]

Επίσης, μπορούν να παρέχουν προστατευτική δράση σε μολύνσεις και ενίσχυση στην αποθεραπεία ασθενών μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία.

Οι πολυσακχαρίτες που περιέχονται στα μανιτάρια, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση και στις *δυσλιπιδαιμίες* [20, 26] και στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι β-γλυκάνες (β-(1,3)-D-γλυκάνες), οι πηκτίνες, η χιτίνη και η χιτοξάνη δρουν στη μείωση της ολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης. Επιπλέον, οι β-γλυκάνες μειώνουν τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) καθώς αυξάνουν ελαφρώς τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Σχετικά με της β-γλυκάνες από μανιτάρια του γένους *Pleurotus ostreatus* υπάρχει η άποψη ότι επιδρούν στον λιπιδαιμικό έλεγχο αυξάνοντας την έκκριση της ενδογενούς χοληστερόλης και των μεταβολιτών της και η άποψη ότι αυξάνει στο ήπαρ την ενεργοποίηση του ενζύμου 7α-υδροξυλάση της χοληστερόλης η οποία είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά οξέα για να ακολουθήσει η αποβολή τους [27].

Επίσης υπάρχει πιθανή συσχέτιση των β-γλυκανών με τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα. Η λεπτίνη είναι μία ορμόνη που εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα και δρα στον υποθάλαμο προωθώντας τον έλεγχο της όρεξης και του κορεσμού [20]. Εκκρίνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα σε ανθρώπους με χαμηλότερο σωματικό βάρος. Κατά τη χορήγηση συμπληρωμάτων β-γλυκανών, σε ανθρώπους [29], αυξήθηκαν τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα και αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι μπορεί να συμβάλουν στην μείωση της παχυσαρκίας και άλλων συνοδών νοσημάτων [20]. Επιπλέον στον έλεγχο των δυσλιπιδαιμιών συμβάλλουν και οι διαιτητικές ίνες που περιέχουν μέσω της μείωσης της απορρόφησης εξωγενούς χοληστερόλης, της αύξησης της έκκρισης των χολικών οξέων αλλά και την παραγωγή SCFA (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ) από τα βακτήρια του εντέρου μέσω ζύμωσης τα οποία αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των χοληστερόλης από το ήπαρ.

2.5. Περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες

Είναι φανερό λοιπόν ότι οι ευεργετικές ιδιότητες των μανιταριών εναποτίθενται κατά κύριο λόγο στις β-γλυκάνες τις οποίες περιέχουν.

Η συγκέντρωσή β-γλυκανών στα μανιτάρια είναι 0,21-0,53g/100g επί ξηρής μάζας. Η αναλογία υδατοδιαλυτών β-γλυκανών κυμαίνεται από 54-82% ενώ των μη υδατοδιαλυτών από 16-46%. Οι πιο πάνω αναλογίες διαφοροποιούνται αναλόγως του στελέχους μεταξύ του ίδιου γένους. Για παράδειγμα στο *Pleurotus ostreatus*, αναφέρεται το σύνολο των β-γλυκανών να είναι 38mg/100g επί ξηρής μάζας και το ποσοστό των υδατοδιαλυτών 62,8% ενώ των μη υδατοδιαλυτών 37,8% επί ξηρής μάζας. Στα μανιτάρια τα οποία έχουν μαγειρευτεί η συγκέντρωση των β-γλυκανών αυξάνεται λόγω της αφυδάτωσης που υφίστανται [16].

Οι μορφές που συναντώνται συχνότερα στα μανιτάρια είναι οι (1→3), (1→6), (1→4)-β-γλυκάνες. Η βιολογική τους επίδραση στον οργανισμό εξαρτάται από τη δομή τους και τα σύμπλοκα που δύνανται να σχηματίζουν με πρωτεΐνες. Όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχει μία β-γλυκάνη και καθώς αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητά της τόσο αυξάνεται η βιοδραστικότητά της. Επίσης, σημαντική επίδραση στη βιοδραστικότητά τους έχουν και οι διακλαδώσεις οι οποίες απαντώνται όπως και οι μορφές τους στον βασικό σκελετό της β-γλυκάνης. Έχει φανεί ότι όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια των μανιταριών εκχύλισμα από τον πυρήνα ελιών προωθείται αύξηση της συνθετάσης της β-1,3-γλυκάνης, επομένως και η συγκέντρωση της γλυκάνης [20].

2.6. Υποθέσεις πιθανής πρεβιοτικής δράσης

Όπως έχει προαναφερθεί πιο πάνω οι β-γλυκάνες έχουν προταθεί ως υποψήφια πρεβιοτικά συστατικά των τροφίμων. Η βάση αυτής της πρότασης είναι η πλήρωση των προϋποθέσεων που απαιτούνται ώστε ένα συστατικό των τροφίμων να θεωρείται ως πρεβιοτικό. Αρχικά παρουσιάζουν αντίσταση στα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπινου σώματος στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα. Ακολούθως υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας και προωθούν εκλεκτικά την αύξηση και ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων του εντέρου. Τέλος τους έχει αποδοθεί πλήθος ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ξενιστή – καταναλωτή τους ενώ δεν μεταβάλλονται κατά τις μαγειρικές παρασκευές [16]. Οι βασιδιομύκητες λόγω της περιεκτικότητάς τους σε β-γλυκάνες και της γενικότερης ευεργετικής εικόνας που παρουσιάζουν βρίσκονται υπό διερεύνηση για την πιθανή πρεβιοτική δράση που μπορεί να παρέχουν ως τρόφιμα. Τα φώτα, πέφτουν στα μανιτάρια, λόγω της διαδεδομένης παραγωγής, καλλιέργειας και κατανάλωσής τους παγκοσμίως. Επίσης, η καλλιέργειά τους απαιτεί μικρό σχετικά κόστος και οι μαγειρικές τους παρασκευές είναι άφθονες και ευφάνταστες.

Για την μελέτη της ανίχνευσης της πιθανής πρεβιοτικής τους δράσης οι πιο συχνά απαντώμενες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τον έλεγχο της αύξησης γνωστών προβιοτικών στελεχών, και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFA).

Στη μελέτη τους οι Synytsya et al. (2008) έδωσαν θετικά αποτελέσματα ως προς την πιθανή πρεβιοτική δράση των μανιταριών χρησιμοποιώντας βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus*. Φάνηκε ότι οι εν λόγω βασιδιομύκητες προωθούσαν την ανάπτυξη 4 στελεχών του γένους *Lactobacillus*, 3 στελεχών του γένους *Bifidobacterium* και 2 στελεχών του είδους

Enterococcus faecium [16]. Η αύξηση των λακτοβακίλλων φάνηκε να εξαρτάται από το στέλεχος αλλά και από το στέλεχος του μανιταριού που εξετάστηκε (*Pleurotus ostreatus* ή *Pleurotus eryngii*) και από τη φάση στην οποία απομονώθηκε το υπό εξέταση συστατικό (γλυκάνη). Δηλαδή αν είναι υδατοδιαλυτή ή παραλήφθηκε στην αλκαλική φάση [15].

Όσον αφορά στα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* έχουν ανιχνευθεί 2 τύποι γλυκανών και σύμπλοκα πρωτεογλυκανών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών. Επίσης οι γλυκάνες που βρίσκονται στα τοιχώματά τους είναι β-1,3-1,6-γλυκάνες οι οποίες είναι διακλαδισμένες και παραλαμβάνονται στην υδατική φάση του εκχυλίσματος και η α-1,3-γλυκάνη η οποία είναι γραμμική και παραλαμβάνεται στην αλκαλική φάση όπως φάνηκε στην μελέτη των Synytsya et al. (2008) [15].

2.7. Βασιδιομύκητες του γένους *Pleurotus*

Το γένος *Pleurotus* περιλαμβάνει περίπου 40 είδη τα οποία είναι όλα βρώσιμα [26]. Η καλλιέργειά τους είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή τους πραγματοποιείται σε χώρες της Ανατολικής Ασίας, κυρίως στην Κίνα [15, 24, 26, 27, 30, 31]. Ως υπόστρωμα για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιείται πούλπα καφέ, φλοιός σπόρων βαμβακιού, μπανάνα, γρασίδι, πριονίδι ξύλου, φυτικές ίνες φοινικέλαιου [24], καθώς και απόβλητα ελαιοτριβείας [20, 32, 33] μαλτόζη, εκχύλισμα ζύμης [33]. Τα υποστρώματα που απαιτούν τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* για την καλλιέργειά τους, δεν χρειάζεται να είναι αποστειρωμένα παρά μόνο παστεριωμένα κάτι το οποίο μειώνει σημαντικά το κόστος. Επιπλέον, ένα μεγάλο ποσοστό του υποστρώματος χρησιμοποιείται για την παραγωγή του σώματος των μανιταριών γεγονός που αυξάνει την οικονομική απόδοσή του. Έτσι τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* θεωρούνται ως εξαιρετική επιλογή για καλλιέργεια [24].

Η σύσταση των μανιταριών του γένους *Pleurotus* περιλαμβάνει, όπως όλα τα μανιτάρια, μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη συγκριτικά με άλλα τρόφιμα της ομάδας των λαχανικών. Το κύριο συστατικό τους όμως είναι οι υδατάνθρακες στους οποίους περιλαμβάνονται οι β-γλυκάνες οι οποίες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές τους ιδιότητες [15, 20, 26, 27, 34]. Οι στατίνες, οι στερόλες, τα λιπαρά οξέα: λινολειακό οξύ, ολειακό οξύ, στεαρικό οξύ, παλμιτικό οξύ και οι φαινολικές ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ και το χλωρογενικό οξύ είναι μερικές από τις ενώσεις οι οποίες περιέχονται στα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* και ενισχύουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Η αναλογία των

μακροθρεπτικών συστατικών στο στέλεχος *Pleurotus ostreatus* παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.2 [26]

Πίνακας 1.2

Περιεκτικότητα μακροθρεπτικών συστατικών και τέφρας στα μανιτάρια του γένους <i>Pleurotus</i> [26]	
Πρωτεΐνη(%)	7
Λίπος (%)	1,4
Υδατάνθρακες (%)	85,9
Τέφρα (%)	5,7
Ενέργεια (kcal/Kg)	416

Οι β-γλυκάνες ονοματίζονται ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους. Έτσι, οι β-γλυκάνες που περιέχονται στα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* ονομάζονται πλευράνες (pleurans). Το μοριακό βάρος των πλευρανών κυμαίνεται από 600000 – 700000 Da [17] και η περιεκτικότητά τους από 2,2 – 5,3mg/g ξηρής μάζας [16]. Η κύρια δομή των πλευρανών που συναντώνται είναι η β-(1,3)-D-γλυκάνες ή β-(1,6)-D-γλυκάνες [15, 27].

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, οι β-γλυκάνες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για πολλά ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του οργανισμού. Ένα από αυτά είναι η πιθανή πρεβιοτική δράση. Οι πλευράνες δίνουν τη δυνατότητα στα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* να κατέχουν μία θέση υποψήφιων πρεβιοτικών τροφίμων. Οι διάφορες ευεργετικές ιδιότητες που φαίνεται να έχουν τα μανιτάρια και ειδικότερα αυτά που ανήκουν στο γένος *Pleurotus* μαζί με τις πλευράνες, διεγείρουν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών για ανίχνευση πιθανής πρεβιοτικής δράσης [16, 17, 27].

2.8. Βασιδιομύκητες του γένους *Ganoderma*

Τα μανιτάρια του γένους *Ganoderma* είναι ευρέως διαδεδομένα σε χώρες της Άπω Ανατολής, κυρίως στην Κίνα και στην Ιαπωνία. Συγκεκριμένα το *Ganoderma lucidum*, χρησιμοποιείται ως φάρμακο στην Παραδοσιακή Κινέζικη Ιατρική για πάνω από 2000 χρόνια. Η κοινή του ονομασία στην Κίνα είναι Ling-Zhi ενώ στην Ιαπωνία αναφέρεται ως

Reishi [35]. Λόγω των ευεργετικών του ιδιοτήτων στην υγεία, χαρακτηρίζεται ως το «το μανιτάρι της αθανασίας».

Στην αρχαία εποχή, του είχαν αποδοθεί θεραπευτικές ιδιότητες για την ηπατίτιδα, τη νεφρίτιδα, τη βρογχίτιδα, το άσθμα, την αθηροσκλήρωση, την υπέρταση, τον καρκίνο και το γαστρικό έλκος κ.α. [35]. Δικαίωμα στην κατανάλωσή τους είχαν μόνο οι πλούσιοι της εποχής ενώ στις μέρες μας η κατανάλωσή τους είναι προσιτή σε όλα τα οικονομικά στρώματα. Σήμερα τα μανιτάρια *Ganoderma lucidum*, θεωρούνται θεραπευτικά για την πρόληψη της παχυσαρκίας [36], τη μείωση της αρτηριακής πίεσης, τη ρύθμιση της υγείας του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, θεωρείται ότι παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες [37], αντιδιαβητική [36], αντιφλεγμονώδη, ανοσορυθμιστική [38, 39], αναλγητική, αντιαλλεργική, αντιοξειδωτική δράση ενώ φαίνεται ότι μπορεί να ενισχύσουν και τη θεραπεία ασθενών με HIV [25, 35, 40, 41].

Τα μανιτάρια *Ganoderma lucidum* καλλιεργούνται σε ξύλο, πριονίδι ή άχυρο [40]. Φαίνεται ότι η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε γλυκόζη, πεπτόνη και το pH επηρεάζουν τη συγκέντρωση πολυσακχαριτών και πρωτεΐνης στο μανιτάρι [42]. Επίσης, η σύσταση και η χημική δομή των συστατικών τους επηρεάζεται από τη σύσταση του εδάφους στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές [41]. Τα μανιτάρια του γένους *Ganoderma* λόγω της ξυλώδους μορφής τους, δεν καταναλώνονται αυτούσια αλλά η χρήση τους γίνεται συνήθως σε μορφή σούπας, τσαγιού ή άλλων αφεψημάτων. Έτσι, λόγω της μεγάλης του περιεκτικότητας σε ίνες (5,9%) υπάρχει η αντιπαράθεση αν μπορεί να θεωρηθεί το *Ganoderma lucidum* ως τρόφιμο. Η σύστασή του, αποτελείται κυρίως από νερό (90%), υδατάνθρακες (2,8%), λίπος (0,5%) και πρωτεΐνη (0,8%) επομένως όπως όλα τα υπόλοιπα τρόφιμα, αποτελείται από μακροσυστατικά [35]. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, τα μανιτάρια περιέχουν άπεπτους πολυσακχαρίτες όπως οι β-γλυκάνες οι οποίοι φαίνεται να ευθύνονται για τις ευεργετικές δράσεις που παρουσιάζουν. Στην περίπτωση όμως του μανιταριού *Ganoderma lucidum*, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο δεν παίζουν μόνο οι πολυσακχαρίτες αλλά και τα τριτερπένια τα οποία περιέχουν [35, 42, 43]. Το μεγαλύτερο βάρος, πέφτει στο γανοδερικό οξύ το οποίο πιθανόν να ευθύνεται για την αντιοξειδωτική, αντικαρκινική- κυτταροτοξική, αντιμεταστατική, νευροπροστατευτική δράση όπως και στη μείωση των παθολογικών συμπτωμάτων του ουροποιητικού συστήματος στους άντρες και στη δράση έναντι στον ιό HIV [35].

Όπως φαίνεται, το μανιτάρι του γένους *Ganoderma lucidum* και οι ιδιότητές του στην υγεία του ανθρώπου, πολλές από τις οποίες προσδιορίστηκαν από αρχαιοτάτων χρόνων, αποτελεί πεδίο έρευνας για πολλούς μελετητές.

3. Κυτταροτοξικότητα:

3.1. Εισαγωγικά

Η υπόθεση και η απόδειξη ότι κάποιο τρόφιμο έχει πρεβιοτική δράση, δεν είναι αρκετά ώστε η βιομηχανία τροφίμων και η φαρμακοβιομηχανία να μπορέσουν να προχωρήσουν σε εξαγωγή κάποιου σχετικού σκευάσματος. Πρέπει να αποδειχθεί ότι το προς εξέταση τρόφιμο – συστατικό δεν εμφανίζει τοξική δράση στα κύτταρα του οργανισμού [17, 44].

Κατά την κατανάλωση ενός τροφίμου (ή σκευάσματος), ακολουθείται μια σειρά αλληλεπιδράσεων στη γαστρεντερική οδό με τα συστατικά του τροφίμου, τους μικροοργανισμούς που περιέχει, τα πεπτικά ένζυμα και τις λοιπές εκκρίσεις του γαστρεντερικού αυλού και τέλος με τον εντερικό μικροβιόκοσμο [44, 45]. Τα προϊόντα αυτών των αλληλεπιδράσεων πιθανώς να εμφανίζουν κάποια κυτταροτοξική δράση. Δηλαδή να επιφέρουν απόπτωση των κυττάρων. Επομένως στην περίπτωση που αναφερόμαστε στην ανίχνευση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης ενός τροφίμου, είναι απαραίτητο να εξετάσουμε αν τα προϊόντα των αλληλεπιδράσεων αυτών, βλάπτουν εν τέλει τα ανθρώπινα κύτταρα. Υπό μία τέτοια συνθήκη, το προς μελέτη συστατικό – τρόφιμο δεν θα πληροί τις προϋποθέσεις για τεκμηρίωσή του ως πρεβιοτικό αφού όχι μόνο δεν θα επάγει την υγεία του ξενιστή του, αλλά αντιθέτως θα έχει τοξική δράση στα κύτταρά του.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, τα άπεπτα συστατικά της τροφής υφίστανται ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αυτά τα συστατικά είναι άπεπτοι υδατάνθρακες, άπεπτες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες που προέκυψαν μέσω της απόπτωσης στον γαστρεντερικό σωλήνα του ξενιστή.

Τα προϊόντα των ζυμώσεων στον εντερικό αυλό φαίνεται να είναι τα SCFA, τα χολικά οξέα και η αμμωνία [45]. Τα προϊόντα αυτά αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του εντερικού αυλού προάγοντας τελικά την υγεία του ξενιστή ή παρουσιάζοντας τοξική δράση για τα κύτταρα [44]. Η μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση φαίνεται να προκύπτει από τα χολικά οξέα ενώ η κυτταροτοξική επίδραση των άλλων προϊόντων δεν έχει ακόμα διερευνηθεί [45].

Επιπλέον η ομάδα των Stein et al. [45] σχετικά με την αναλογία των παραγόμενων SCFA, έδειξαν ότι υπάρχει μια μετατόπιση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος σε βουτυρικό οξύ ή σε βουτυρικό οξύ και προπιονικό οξύ αναλόγως της συγκέντρωσης της χολής.

Μικρότερη συγκέντρωση οδήγησε σε παραγωγή βουτυρικού μόνο. Θεωρείται σημαντικό, γιατί φαίνεται σημαντικές επιδράσεις των SCFA να σχετίζονται κυρίως με το βουτυρικό οξύ.

3.2. Επιλογή κυττάρων για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράση

Τα κύτταρα του εντερικού αυλού βρίσκονται σε στοιβάδες και αλληλεπιδρούν με το περιεχόμενό του. Η κύρια επικρατούσα στοιβάδα είναι η στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων, η οποία καλύπτει τις λάχνες του εντέρου και τις κρύπτες. Στα επιθηλιακά κύτταρα προσκολλώνται πολυσακχαρίτες με αποτέλεσμα τη δημιουργία του γλυκοκάλυκα. Τα κύτταρα που συνθέτουν τον γλυκοκάλυκα παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και συγγένεια σε λεκτίνες, ιούς, βακτηριακές τοξίνες, βακτήρια και ανοσοκύτταρα [44].

Για τη μελέτη των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στο έντερο έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως μικροβιακά ελεύθερα ποντίκια και χοίροι. Το έντερο των χοίρων μάλιστα, μοιάζει αρκετά με αυτό των ανθρώπων. Έτσι τα αποτελέσματα των μελετών είχαν υψηλή εφαρμοσιμότητα στους ανθρώπους. Για ηθικούς λόγους όμως, η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν ευνοεί τα πειράματα σε ζώα [44]. Η ανάγκη για εναλλακτικούς τρόπους μελέτης των δραστηριοτήτων του εντερικού επιθηλίου είναι επιτακτική. Για αυτό σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως κυτταρικές σειρές όπως είναι τα Caco-2, HT-29, Intestine 407 και CaSki.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται συχνότερα για *in vitro* πειράματα είναι τα Caco-2. Τα Caco-2 κύτταρα, είναι καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου τα οποία κατά την καλλιέργειά τους σχηματίζουν μονοστοιβάδα ενώ όταν φτάσουν σε πληρότητα, διαφοροποιούνται και συμπεριφέρονται όπως τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου [44]. Τα εν λόγω κύτταρα απομονώθηκαν από έναν Καυκάσιο άνδρα 72 ετών και πλέον χρησιμοποιούνται από αρκετούς ερευνητές [43, 46].

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης των υποψηφίων πρεβιοτικών μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών



Πειραματικό Μέρος

4. Μεθοδολογία

Το πειραματικό μέρος αποτελεί τμήμα ενός ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος που στόχο έχει τη διερεύνηση πιθανής πρεβιοτικής δράσης των βασιδιοκαρπίων (μανιταριών) και των μυκηλίων των βασιδιομυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*. Το πρόγραμμα περιλαμβάνει:

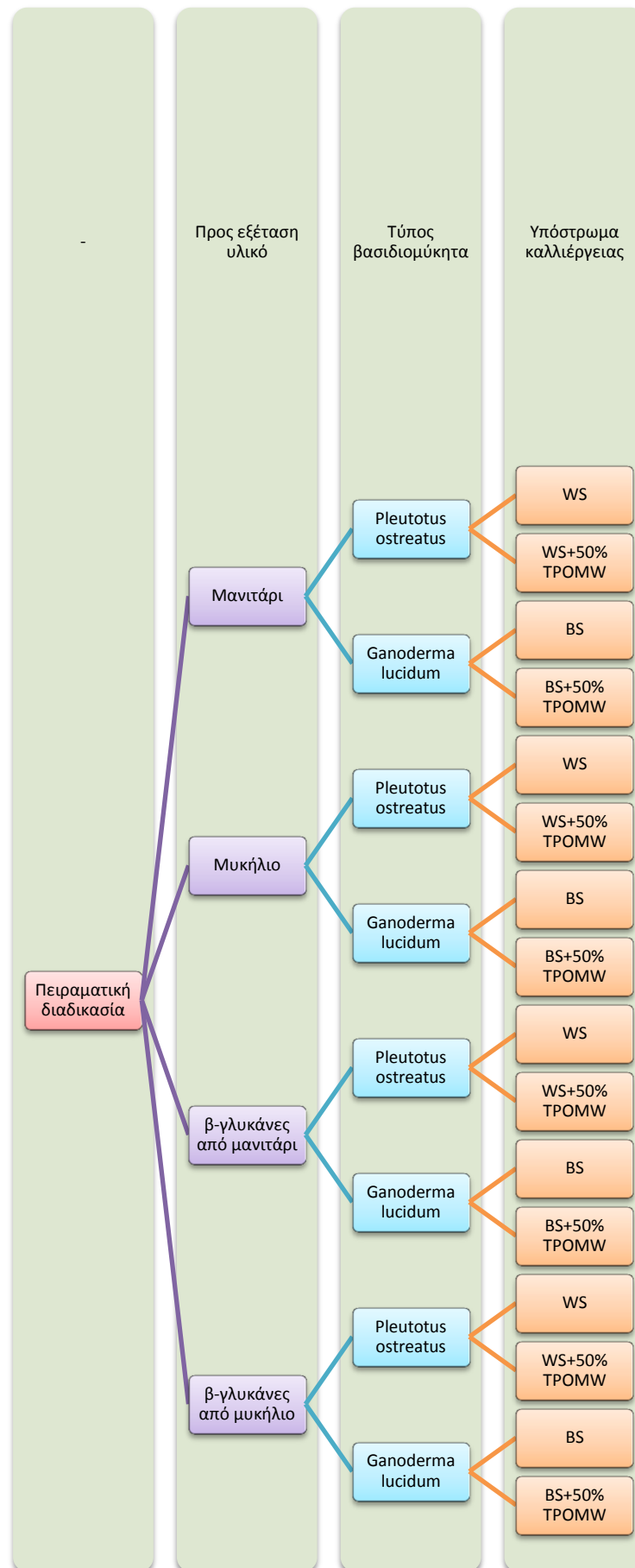
1) Μελέτη της επίδρασης των μανιταριών και των μυκηλίων των δύο βασιδιομυκήτων στους εντερικούς μικροβιακούς πληθυσμούς *in vitro*, μετά από ζύμωση τους από το εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών

2) Μελέτη των μικροβιακών μεταβολιτών και ιδιαίτερα των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA), που παράγονται κατά τη ζύμωση των μυκηλιακών υποστρωμάτων

3) Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των υπερκείμενων των ζυμώσεων του εντερικού μικροβιόκοσμου υγιών εθελοντών, σε επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου

Τα δύο στελέχη βασιδιομυκήτων έχουν καλλιεργηθεί σε δύο διαφορετικά υποστρώματα για να μελετηθεί επιπλέον η επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας στη βιοδραστικότητα των μυκήτων. Το *Pleurotus ostreatus* καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου (WS) και άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (WS+50% TPOMW) ενώ το *Ganoderma lucidum* καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς (BS) και σε πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (BS+50% TPOMW).

Το πλήρες πειραματικό σχέδιο παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, εξετάστηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των καρποφοριών των μυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* σε επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου της σειράς Caco-2 (ATCC: HTB-37).



Διάγραμμα 1

4.1. Προετοιμασία του υλικού

4.1.1. Καλλιέργεια μανιταριών - λυοφιλίωση καρποφοριών

Τα στελέχη των βασιδιομυκήτων ανήκουν στην συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου, όπου έγινε και η καλλιέργειά τους. Ως υπόστρωμα για το *Pleurotus ostreatus*, επιλέχθηκε τελικά το άχυρο σίτου (WS) και το άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (WS+50% TPOMW) ενώ για το *Ganoderma lucidum* το πριονίδι οξιάς (BS) και το πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (BS+50% TPOMW).

Μετά την καλλιέργειά τους, τα μανιτάρια καταψύχθηκαν στους -20°C, λυοφιλιώθηκαν (Telstat Cryodos) και κονιορτοποιήθηκαν. Αναλυτικά η παραπάνω διαδικασία περιγράφεται στην διπλωματική εργασία της κας. Πατσού Μαριάννας με θέμα «Έλεγχος της πρεβιοτικής δράσης εδώδιμων μανιταριών που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας» [47].

4.2. Κυτταροτοξικότητα

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα (αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου) από το εντερικό επιθήλιο ανθρώπου της κυτταρικής σειράς Caco-2 (ATCC: HTB-37). Αυτά, επωάστηκαν για 24 ώρες με θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε και το προϊόν της ζύμωσης των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε συγκέντρωση 10% [48]. Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε με την μέτρηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων.

4.2.1. In vitro δοκιμασία ζύμωσης μανιταριών

Για την πειραματική διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, εξετάστηκαν τα τέσσερα προϊόντα λυοφιλίωσης των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* (WS, WS+50, BS, BS+50), και ένα βιβλιογραφικά τεκμηριωμένο πρεβιοτικό η ινουλίνη (Inulin granulated, Orafiti) ως θετικός μάρτυρας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας (απουσία μανιταριών και ινουλίνης ως υπόστρωμα για τον εντερικό μικροβιόκοσμο) για τον έλεγχο της πειραματικής διαδικασίας.

Τα πειράματα *in vitro* δοκιμασίας ζύμωσης μανιταριών πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε υπόστρωμα χρησιμοποιώντας εμβόλιο κοπράνων από τρεις (3) διαφορετικούς υγιείς εθελοντές ηλικίας 27-43 ετών.

Η διαδικασία *in vitro* ζύμωσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Olano-Martin *et al.* [49] και Rycroft *et al.* [50] με ελαφρές τροποποιήσεις.

Δείγματα από τις καλλιέργειες *in vitro* ελήφθησαν σε δύο χρονικές στιγμές ($t=0$, 24) και φυγοκεντρήθηκαν ($3220\times g$ / 30 min / 4°C), με στόχο τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού, το οποίο στη συνέχεια μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά του. Για τον σκοπό αυτό τα δείγματα υπέστησαν λυοφιλίωση πριν από την επίδρασή τους στα εντερικά κύτταρα.

4.2.1.1. Λυοφιλίωση υπερκειμένων της *in vitro* ζύμωσης

- Τα υπερκείμενα που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C ξεπαγώνουν και φυγοκεντρούνται για μία ακόμα φορά στα $3220\times g$, για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούν:
- Αναρρόφηση υγρού υπερκειμένου με τη χρήση σύριγγας
- Διήθηση του υγρού μέσω βακτηριολογικού ηθμού (Cornign 431229 Syringe Filter διαμέτρου 28mm με διάμετρο πόρων 0,2 micron) σε αποστειρωμένα falcon των 15 mL
- Μετάγγιση 2,1 mL από το διήθημα σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια λυοφιλίωσης και κλείσιμο του φιαλιδίου με ειδικό ελαστικό πώμα με αντιδιαμετρικές οπές και ασημόχαρτο χαλαρά
- Μετάγγιση του υπόλοιπου διηθήματος σε αποστειρωμένα φιαλίδια erpendorf των 2 mL και κλείσιμό τους με πώμα που περιέχει οπή και ελαφρώς με ασημόχαρτο
- Κατάψυξη στους -80°C κατά τη διάρκεια της νύχτας
- Μεταφορά φιαλιδίων και erpendorf σε δίσκους και εναπόθεσή τους στον λυοφιλιωτή
- Ο λυοφιλιωτής (Heto LyoLab 3000) τίθεται σε λειτουργία (διάρκεια λυοφιλίωσης 24 ώρες)

Η περιεχόμενη υγρασία των υπερκειμένων απομακρύνεται λόγω μείωσης της θερμοκρασίας και της πίεσης. Το νερό που έχει εξαχνωθεί φεύγει μέσω των οπών των φιαλιδίων και των οπών των erpendorfs. Μετά το τέλος της λυοφιλίωσης, τα αποξηραμένα προϊόντα κλείνονται αεροστεγώς και αποθηκεύονται στους 4⁰C.



4.2.2. Κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Caco-2 (ATCC: HTB – 37) η οποία προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και αποτελεί πρότυπο για την *in vitro* μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς των ανθρώπινων εντεροκυττάρων. Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα έχουν την τάση να προσκολλώνται στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας και να σχηματίζουν μονή στοιβάδα. Αφού καλύψουν το 100% της επιφάνειας του δοχείου καλλιέργειας και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται και εμφανίζουν κατά την καλλιέργειά τους βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά ανθρώπινων εντεροκυττάρων [51].

4.2.3. Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Το DMEM είναι το υγρό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιούμε στην καλλιέργεια των κυττάρων. Αποτελείται από αμινοξέα βιταμίνες, διάφορα άλατα, πυροσταφυλικό νάτριο και γλυκόζη. Συντηρείται στο ψυγείο στους 5 °C ενώ πριν τη χρήση του πρέπει να αναθερμανθεί στους 37 °C.

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM της εταιρίας BioSera, DMEM High Glucose w/o L-Glutamine, w/ Sodium Pyruvate, Filter Sterile (LM-D1112/500).

Fetal Bovine Serum (FBS)

Το FBS, δηλαδή ο βόειος εμβρυικός ορός, χρησιμοποιείται ως μία πηγή αμινοξέων, πρωτεϊνών, λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K), υδατανθράκων, λιπών, ορμονών, αυξητικών παραγόντων, μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Επιπλέον, δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας στο μέσο της καλλιέργειας και απενεργοποιεί πρωτεολυτικά ένζυμα.

Χρησιμοποιήθηκε ο βόειος εμβρυικός ορός της εταιρίας GIBCO, REF 10270-106.

Προσθήκη γλουταμίνης:

Η L-γλουταμίνη είναι μη απαραίτητο αμινοξύ για τα θηλαστικά. Είναι απαραίτητη η χρήση του κατά την καλλιέργεια των κυττάρων. Είναι ασταθής στα υγρά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων, για αυτό συχνά παραλείπεται από το υγρό μέσο και προστίθεται κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού.

Χρησιμοποιήθηκε η L-γλουταμίνη της εταιρίας BioSera, 100×, Cat. n°: 25030-81.

Προσθήκη αντιβιοτικών Πενικιλίνης / Στρεπτομυκίνης:

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ως προφυλακτικό μέσο για την αποφυγή βακτηριακής επιμόλυνσης. Συντηρούνται στην κατάψυξη στους -20 °C. Η τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας είναι 100U/mL πενικιλίνης και 100μg/mL στρεπτομυκίνης (GIBCO).

Χρήση Θρυψίνης - EDTA:

Η θρυψίνη αποτελεί ένζυμο πρωτεόλυσης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Η χρήση της πέρα της χρονικής

διάρκειας που προβλέπεται (5-9 min) μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των κυττάρων. Η ενζυματική της δράση σταματάει με την επίδραση του ορού (πχ. προσθέτοντας πλήρες θρεπτικό υλικό σε όγκο τουλάχιστον διπλάσιο από αυτόν της θρυψίνης).

Το ένζυμο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 φορές πυκνότερη) από την απαιτούμενη. Για αυτόν τον λόγο πραγματοποιήσαμε αραίωσή της σε διάλυμα PBS 1:10 (1 mL θρυψίνη, 9 mL PBS).

Διάλυμα PBS:

Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για ξέπλυμα ή αναδιάλυση των κυττάρων με τρόπο που να αποφεύγεται το ωσμωτικό σοκ.

Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα της εταιρίας GIBCO, REF 18912-014 (1 ταμπλέτα σε 500 mL αποιονισμένο νερό).

Προετοιμασία πλήρους θρεπτικού υλικού καλλιέργειας 100 mL:

10mL Fetal Bovine Serum (FBS)

1mL μη απαραίτητα αμινοξέα (BIOCHROM)

1mL L-γλουταμίνη

1mL Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη

87mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

4.2.4. Ανάπτυξη κυττάρων σε δοχεία καλλιέργειας (φλάσκες)

Αναζωογόνηση κυττάρων Caco-2 από το υγρό άζωτο:

- Προετοιμασία πλήρους θρεπτικού υλικού
- Από το δοχείο υγρού αζώτου, παραλαμβάνεται το φιαλίδιο που περιείχε τα καρκινικά κύτταρα Caco-2 σε υγρό άζωτο και ξεπαγώνεται σε υδατόλουτρο στους 37 °C
- Μεταφορά των κυττάρων σε falcon με θρεπτικό υλικό σε αναλογία 1:10
- Φυγοκέντρωση για 10min / 125×g σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί το DMSO (κρυοπροστατευτικός παράγοντας που είναι όμως τοξικός για τα κύτταρα)
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου μέσω αναρρόφησης με αντλία ενώ τα κύτταρα παραμένουν στον κάτω μέρος του falcon ως ίζημα
- Προσθήκη 1-2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και ήπια ανάδευση ώστε να επαναδιαλυθεί το ίζημα των κυττάρων

- Μεταφορά του εναιωρήματος των κυττάρων στο δοχείο καλλιέργειας (φλάσκα των 75cm² (Greiner bio-one, Cellstar® Tissue Culture Flasks, Cat n°: 658-180) που περιέχει 10 mL πλήρες θρεπτικό υλικό και ανάμιξη με απαλές αναδεύσεις του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα
- Μεταφορά του δοχείου καλλιέργειας σε θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C και συγκέντρωσης CO₂ 5% για επώση (MMM Group, Model No. 170-200/219MP, Serial No. 16863)

Πολλαπλασιασμός των κυττάρων και διαίρεση της καλλιέργειας κυττάρων:

Κατά την επώση, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται. Κάθε κύτταρο αναπτύσσεται περιφερειακά. Αναμένεται η εξάπλωσή τους και η δημιουργία μονής στοιβάδας στη βάση της φλάσκας. Καθημερινά γινόταν παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων, σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (Leica interphase) και αλλαγή του θρεπτικού υλικού με νέο, μέρα παρά μέρα.

Όταν η πληρότητα (confluency) των κυττάρων κάλυπτε το 70% - 90% της επιφάνειας της φλάσκας τότε, η καλλιέργεια διαιρούνταν σε νέες φλάσκες.

Διαδικασία:

- Προετοιμασία εκ νέου πλήρους θρεπτικού υλικού
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού που βρίσκεται μέσα στη φλάσκα με αναρρόφηση
- Ξέπλυμα των κυττάρων που είναι προσκολλημένα στη φλάσκα με διάλυμα PBS (δισ)
- Προσθήκη στη φλάσκα των 75 cm² 2-3 mL διαλύματος θρυψίνης
- Επώση για 5-10 min στους 37 °C σε συγκέντρωση CO₂ 5% και παρατήρηση για αποκόλληση των κυττάρων
- Προσθήκη 6-8 mL πλήρους θρεπτικού υλικού ώστε παρουσία του ορού να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε falcon
- Φυγοκέντρηση για 10 min / 125×g / σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου με αναρρόφηση
- Προσθήκη 2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με ήπια ανάδευση. Καταμέτρηση των κυττάρων στο αιματοκυττόμετρο και

δημιουργία κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε μετά τον εμβολιασμό σε νέες φλάσκες τα κύτταρα να έχουν μία συγκέντρωση της τάξης του 1×10^4 κύτταρα / cm^2 και αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με μια διαίρεση της φλάσκας σε αναλογία 1:4 - 1:6

- Μεταφορά σε θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και συγκέντρωσης CO_2 5% για επώαση

4.3. Μελέτη Κυτταροτοξικότητας

4.3.1. Καλλιέργεια των κυττάρων σε βοθρία

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων στα προϊόντα των ζυμώσεων των λυοφιλοποιημένων μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο κρίθηκε απαραίτητη η μεταφορά των κυττάρων από τη φλάσκα σε μικρότερα βοθρία καλλιέργειας (6 βοθρία σε κάθε πλακίδιο - $9,15\text{cm}^2$).

Σε κάθε βοθρίο μεταφέρθηκαν 2 mL εναιωρήματος κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό, των οποίων η συγκέντρωση ρυθμίστηκε κατάλληλα ώστε να είναι της τάξης του 1×10^4 κύτταρα / cm^2 . Τα κύτταρα επώαστηκαν σε θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και συγκέντρωσης CO_2 5%. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 100% συνεχίστηκε η καλλιέργειά τους για επιπλέον δύο εβδομάδες, χρόνος που θεωρείται αρκετός για την διαφοροποίησή τους πριν χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας.

4.3.2. Επίδραση υπερκειμένων στις κυτταροκαλλιέργειες, και καταμέτρηση κυττάρων

Τα λυοφιλωμένα προϊόντα της ζύμωσης των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους 4°C , ανασυστάθηκαν ως προς την υγρασία τους ως εξής:

- Σε κάθε φιαλίδιο στο οποίο λυοφιλώθηκαν 2,1 mL από το υπερκείμενο της ζύμωσης, προστέθηκαν 1,848 mL DMEM (σκέτου- όχι πλήρους).
- Ακολούθησε απαλή ανάδευση μέχρις ότου συλλεχθεί όλη η σκόνη από τα τοιχώματα και διαλυθεί πλήρως στο DMEM.

Στη συνέχεια απομακρύνθηκε με αναρρόφηση το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από τις πλήρως διαφοροποιημένες καλλιέργειες των Caco-2 στα βοθρία. Σε κάθε βοθρίο προστέθηκε:

- 0.176 mL από τα ανασυσταθέντα προϊόντα της ζύμωσης των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο
- 0,02 mL FBS
- 0,002 mL πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη
- 0,002 mL αμινοξέα
- 1,8 mL πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM

Έτσι καταφέρνουμε να έχουμε μία αραίωση 10% των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών από την εντερική μικροχλωρίδα σε πλήρες θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των κυττάρων.

Ακολουθεί μεταφορά σε θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 37 °C και συγκέντρωσης CO₂ 5% για επώαση για 24 ώρες.

4.3.3. Προσδιορισμός Κυτταροτοξικότητας:

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων από τα βοθρία σε falcon και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν τα νεκρά και ζωντανά κύτταρα ως εξής:

- Απομάκρυνση με αναρρόφηση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού από τα βοθρία
- Προσθήκη σε κάθε βοθρίο 2 mL PBS για ξέπλυμα (δισ)
- Μετάγγιση του PBS που χρησιμοποιήθηκε για ξέπλυμα σε falcon
- Προσθήκη 1 ml διαλύματος θρυψίνης στο βοθρίο
- Επώαση για 7 min στους 37 °C σε συγκέντρωση CO₂ 5%
- Προσθήκη τουλάχιστον 2 mL πλήρους θρεπτικού υλικού
- Καλή ανάδευση με χρήση πιπέτας στο βοθρίο και μετάγγιση του θρεπτικού υλικού με τα αποκολλημένα κύτταρα στο αντίστοιχο falcon
- Ξέπλυμα του βοθρίου με 1 mL PBS και μετάγγισή του υγρού ξεπλύματος στο αντίστοιχο falcon
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 1500 rpm σε θερμοκρασία 25 °C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου με αναρρόφηση

- Αναδιάλυση ιζήματος (κυττάρων) σε 2 mL πλήρες θρεπτικό υλικό
- Μεταφορά 80 μ L από το ομοιογενές διάλυμα κυττάρων σε σωληνάριο τύπου eppendorf του 1,5 mL
- Προσθήκη 80 μ L από τη χρωστική μπλε τρυπάνης και καλή ανάδευση
- Μεταφορά ποσότητας από το μίγμα σε αιματοκυττόμετρο Καταμέτρηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων με τη χρήση μικροσκοπίου σε φακό 40x

4.4 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για τη μελέτη των αποτελεσμάτων της επίδρασης των προϊόντων των ζυμώσεων των λυοφυλιωμένων μανιταριών από βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα του Υπολογιστικού Φύλλου Microsoft Excel 2010 και το στατιστικό πρόγραμμα SIGMA STAT V3.5.

Όλες οι συγκρίσεις των μέσων τιμών έγιναν με την ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, πραγματοποιήθηκαν όλες οι ανά δύο συγκρίσεις με το Tukey test. Στις περιπτώσεις που είχαμε σύγκριση μόνο δύο μέσων τιμών, αυτές έγιναν με το t-test (με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις) σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0,05$.

5. Αποτελέσματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η βιωσιμότητα επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου μετά από την επώασή τους με το υπερκείμενο από την *in vitro* ζύμωση μανιταριών βασιδιομυκήτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών. Χρησιμοποιήθηκαν βασιδιοκάρπια (μανιτάρια) από δύο στελέχη βασιδιομυκήτων, από τα είδη *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*. Τα μανιτάρια προέρχονταν από καλλιέργεια του κάθε βασιδιομύκητα σε δυο διαφορετικά υποστρώματα: το *Pleurotus ostreatus* είχε καλλιεργηθεί σε άχυρο σίτου και σε άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου ενώ το *Ganoderma lucidum* είχε καλλιεργηθεί σε πριονίδι οξιάς και σε πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείας. Οι τελικές καρποφορίες λυοφιλιώθηκαν.

Στον Πίνακα 5.1 παρατίθενται οι κωδικοί που χρησιμοποιήθηκαν για τα μανιτάρια από κάθε υπόστρωμα καλλιέργειας, των μαρτύρων και οι χρόνοι στους οποίους τα μανιτάρια υπέστησαν ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε ένας επιπλέον μάρτυρας ο οποίος δεν περιείχε υπερκείμενο ζύμωσης οποιουδήποτε υλικού από τον εντερικό μικροβιόκοσμο αλλά περιελάμβανε μόνο θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των κυττάρων του εντέρου. Σκοπός της χρήσης του τρίτου μάρτυρα ήταν να ελεγχθεί, η διαδικασία ως ανεξάρτητος παράγοντας στην επίδραση της κυτταροτοξικότητας που μπορεί να επιφέρουν στα δείγματα οι χειρισμοί.

Η επίδραση των ζυμωμένων προϊόντων των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, εκφράστηκε ως το ποσοστό βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων. Δηλαδή το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων όπως καταμετρήθηκαν στο αιματοκυττόμετρο μετά από τη χρήση της χρωστικής μπλε τρυπάνης επί του συνόλου τους (ζωντανά και νεκρά κύτταρα).

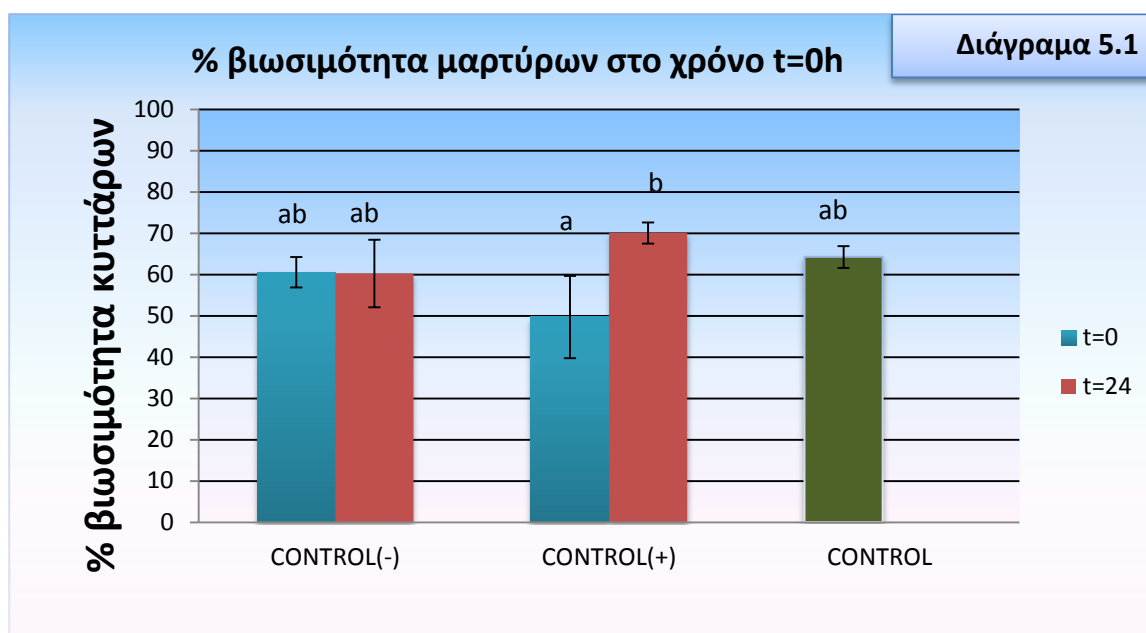
Πίνακας 5.1

Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2)

Κωδικός	Υπόστρωμα	Υπόστρωμα καλλιέργειας	Διάρκεια ζύμωσης από τον εντερικό μικροβίοκοσμο
Control	-		-
Control (-) t=0	-	-	0h
Control (+) t=0	Ινουλίνη	-	0h
P.o. WS t=0	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Άχυρο σίτου	0h
P.o. WS +50 t=0	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	0h
G.l. BS t=0	<i>Ganoderma lucidum</i>	Πριονίδι οξιάς	0h
G.l. BS +50 t=0	<i>Ganoderma lucidum</i>	Πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	0h
Control (-) t=24	-	-	24h
Control (+) t=24	Ινουλίνη	-	24h
P.o. WS t=24	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Άχυρο σίτου	24h
P.o. WS +50 t=24	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	24h
G.l. BS t=24	<i>Ganoderma lucidum</i>	Πριονίδι οξιάς	24h
G.l. BS +50 t=24	<i>Ganoderma lucidum</i>	Πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου	24h

5.1. Επίδραση του υπερκείμενου από τη ζύμωση του πρεβιοτικού (ινουλίνη) στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2

Στο Διάγραμμα 5.1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων μετά από επώασή τους με το υπερκείμενο από τη ζύμωση της ινουλίνης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Control +), με το υπερκείμενο από τον εντερικό μικροβιόκοσμο χωρίς υπόστρωμα (Control -) και του ελέγχου των χειρισμών κατά την καλλιέργεια των κυττάρων Caco-2 (Control) στους χρόνους t=0 και t=24.



Διάγραμμα 5.1. % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων στις δοκιμασίες ελέγχου στους χρόνους t=0 και t=24 και στη δοκιμασία ελέγχου των χειρισμών

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών (n=3).

Για τη μέση τιμή του Control (n=4)

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$)

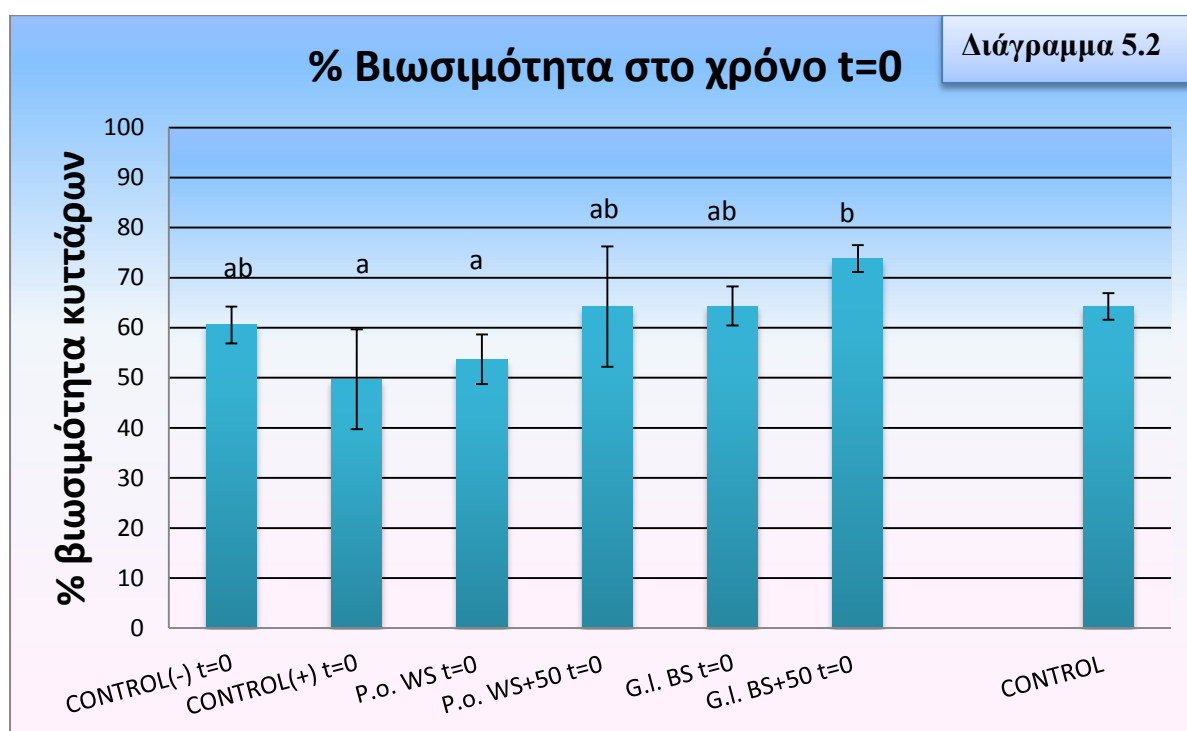
Στο διάγραμμα αυτό παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη βιωσιμότητα μεταξύ των κυττάρων που δέχθηκαν τα υπερκείμενα κοπράνων με ινουλίνη, ή χωρίς ινουλίνη για τους χρόνους 0 και 24, με τον μάρτυρα ο οποίος δεν δέχθηκε καθόλου υπερκείμενο κοπράνων.

Επίσης δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο κοπράνων χωρίς ινουλίνη σε χρόνο 0 και 24 ώρες.

Σημαντικά στατιστική διαφορά παρατηρείται όμως στη βιωσιμότητα μεταξύ των κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο κοπράνων με ινουλίνη στους χρόνους 0 και 24 ώρες ($p=0,011$). Δηλαδή εμφανίζεται μεγαλύτερη βιωσιμότητα στα Caco-2 κύτταρα όταν επωάζονται με τα προϊόντα της ζύμωσης της ινουλίνης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, σε σχέση με την επώαση από την ινουλίνη πριν από τη ζύμωσή της.

5.2. Επίδραση του υπερκείμενου από τη ζύμωση των βασιδιοκαρπίων των βασιδιομυκήτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2

Στο Διάγραμμα 5.2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων μετά από επώαση με το υπερκείμενο από τα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* προερχόμενου από καλλιέργειες σε δύο υποστρώματα (WS και WS+50), το υπερκείμενο *Ganoderma lucidum* προερχόμενου από καλλιέργειες σε δύο υποστρώματα (BS και BS+50) καθώς και των μαρτύρων του πειράματος, στο χρόνο $t=0$ δηλ. κατά την έναρξη της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβίοκοσμο.



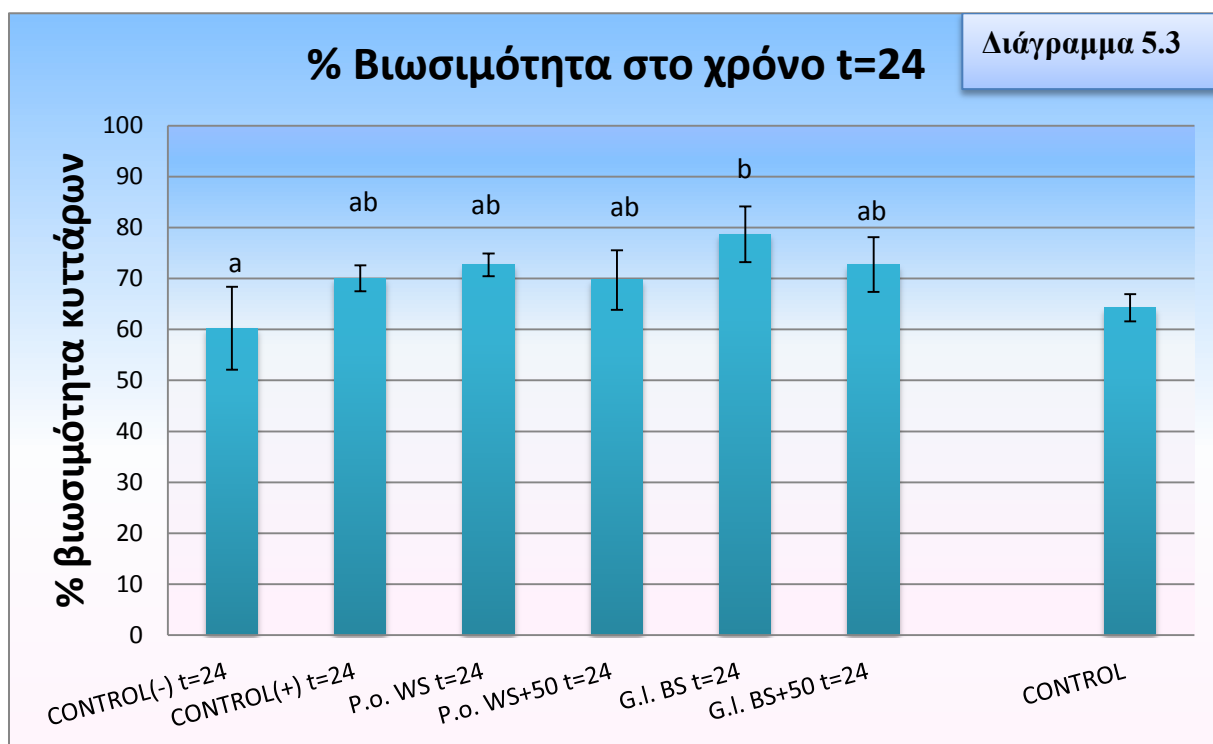
Διάγραμμα 5.2 % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβίοκοσμου με τα υποστρώματα Control (-), Control (+), Control, P.o. WS, P.o. WS+50, G.l. BS και G.l. BS+50 σε χρόνο $t=0$

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών ($n=3$). Για τη μέση τιμή του Control ($n=4$) Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p<0.05$)

Στο διάγραμμα αυτό παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.05$) μεταξύ των δύο μαρτύρων σε σχέση με τους χειρισμούς με P.o. WS t=0, P.o. WS+50 t=0 και G.I. BS t=0. Δηλαδή η επώαση των εντερικών κυττάρων με την υδατική υπερκείμενη φάση των κοπράνων χωρίς υπόστρωμα, ή με παρουσία ινουλίνης, ή μανιταριών από το *Pleurotus ostreatus* και από τα δύο υποστρώματα, ή μανιταριών από το *Ganoderma lucidum* καλλιεργημένων σε πριονίδι οξιάς, δεν παρουσίασε διαφορές ως προς τη βιωσιμότητά τους.

Αντίθετα, σημαντικά στατιστική διαφορά παρατηρούμε μόνο μεταξύ του χειρισμού G.I. BS+50 t=0 ο οποίος διαφέρει σημαντικά από τον θετικό μάρτυρα Control (+) ($p=0,013$) καθώς και από τον χειρισμό P.o.WS t=0 ($p=0,043$). Δηλαδή η επώαση των Caco-2 με την υδατική φάση των κοπράνων με παρουσία μανιταριών από το *Ganoderma lucidum* καλλιεργημένου σε πριονίδι οξιάς και αποβλήτου διφασικού ελαιοτριβείου ευνοεί περισσότερο τη βιωσιμότητά τους από την ινουλίνη και από τα μανιτάρια του *P.ostreatus* σε πριονίδι.

Στο Διάγραμμα 5.3 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων με το υπερκείμενο *Pleurotus ostreatus* προερχόμενου από καλλιέργειες σε δύο υποστρώματα (WS και WS+50), το υπερκείμενο *Ganoderma lucidum* προερχόμενου από καλλιέργειες σε δύο υποστρώματα (BS και BS+50) καθώς και των μαρτύρων του πειράματος, μετά το πέρας 24 ωρών ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.



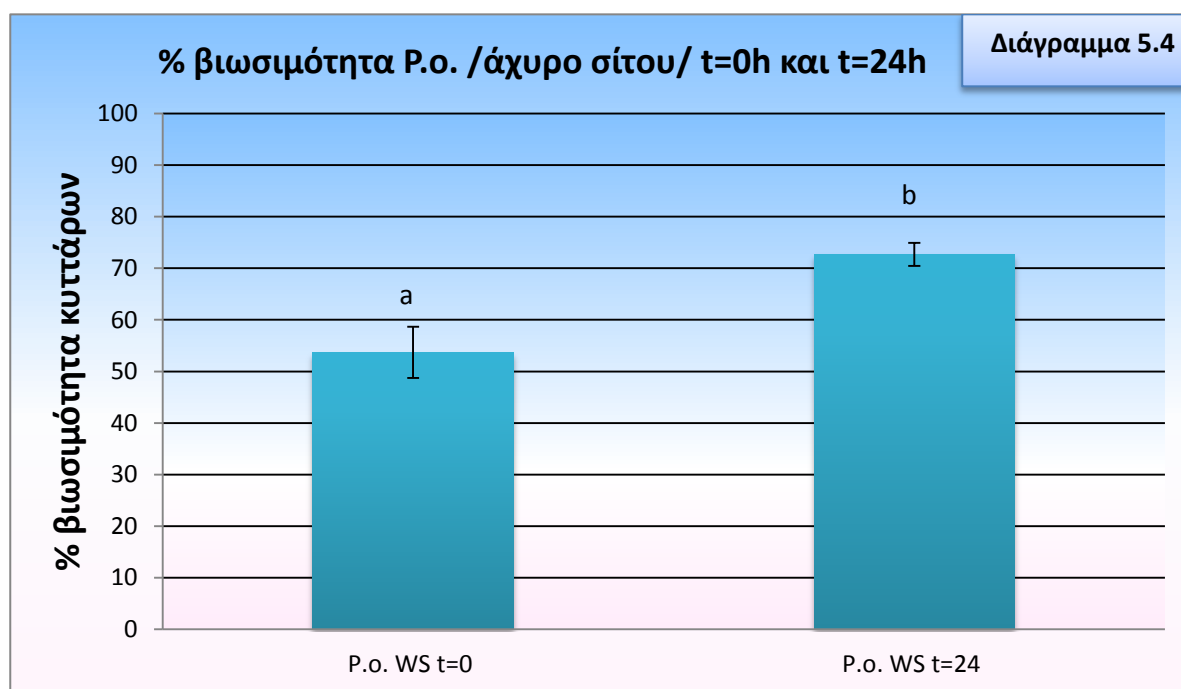
Διάγραμμα 5.3: % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβιόκοσμου με τα υποστρώματα Control (-), Control (+), P.o. WS, P.o. WS+50, G.l. BS και G.l. BS+50 σε χρόνο t=24.

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών (n=3). Για τη μέση τιμή του Control (n=4).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$)

Στο διάγραμμα αυτό παρατηρούμε ότι η επώαση των εντερικών κυττάρων με τα προϊόντα από τη ζύμωση τόσο του πρεβιοτικού (ινουλίνη), όσο και των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, εμφανίζει υψηλότερη βιωσιμότητα σε σχέση με το υπερκείμενο που δεν υπάρχουν προϊόντα ζύμωσης (control-). Η βιωσιμότητα όμως των κυττάρων γίνεται και σημαντικά υψηλότερη ($p=0,011$) μετά την επώαση των προϊόντων της ζύμωσης των μανιταριών *G.lucidum* καλλιεργημένων σε πριονίδια οξιάς (G.l. BS t=24).

Στο Διάγραμμα 5.4 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο της ζύμωσης του *Pleurotus ostreatus* προερχόμενου από καλλιέργεια σε υπόστρωμα άχυρου σίτου (P.o. WS) από εντερικό μικροβιόκοσμο στους δύο χρόνους t=0 και t=24.



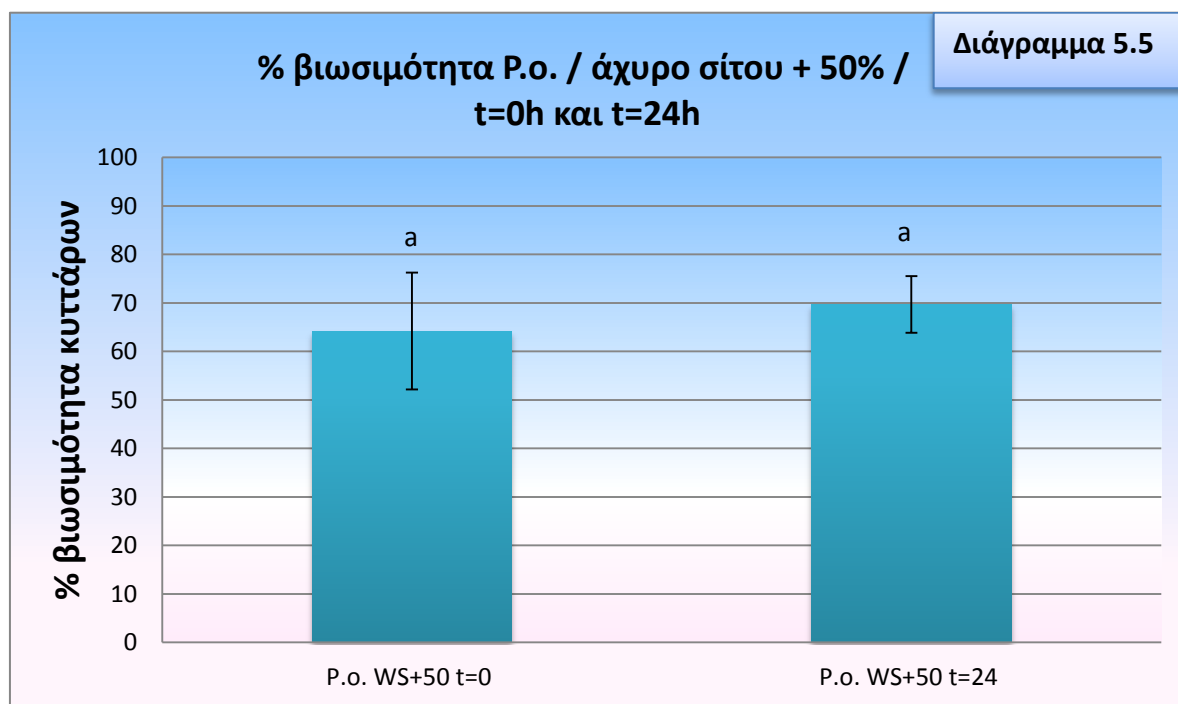
Διάγραμμα 5.4 % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβιόκοσμου με το υπόστρωμα P.o. WS στους χρόνους t=0 και t=24

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων (n=3).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χειρισμών ($p=0,003$). Δηλαδή παρατηρείται αύξηση της βιωσιμότητας των εντεροκυττάρων μετά από επώαση με τα προϊόντα της ζύμωσης των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο (P.o.WS t=24), σε σχέση με την επώαση που έγινε με τα μανιτάρια πριν τη ζύμωσή τους.

Στο Διάγραμμα 5.5 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο της ζύμωσης του *Pleurotus ostreatus* προερχόμενου από καλλιέργεια σε υπόστρωμα άχυρου σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (P.o. WS+50) από εντερικό μικροβιόκοσμο στους δύο χρόνους t=0 και t=24.



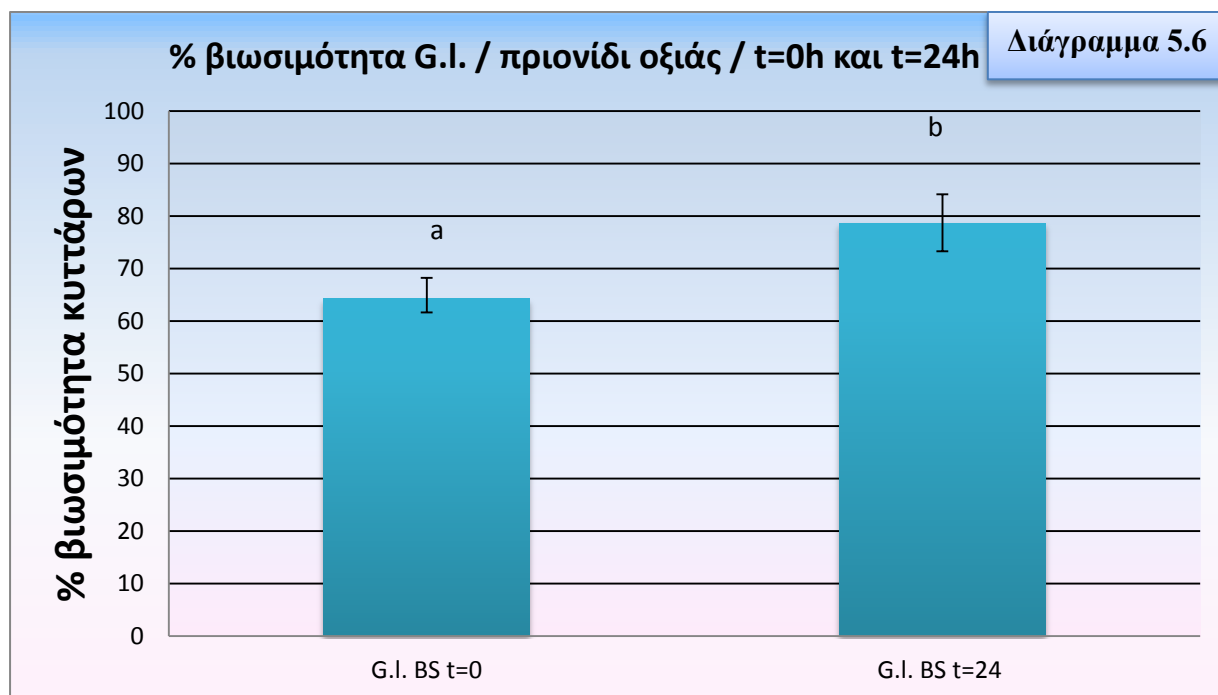
Διάγραμμα 5.5 % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβιόκοσμου με τα υποστρώματα P.o.WS+50 t=0 και P.o.WS+50 t=24 στους χρόνους t=0 και t=24 αντίστοιχα.

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων (n=3).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$)

Στο παραπάνω διάγραμμα δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Δηλαδή δεν μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά η βιωσιμότητα των εντεροκυττάρων μετά από την επώασή τους από τα προϊόντα της ζύμωσης των μανιταριών από καλλιέργεια σε πριονίδι εμπλουτισμένο με απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου (P.o WS+50 t=24) σε σχέση με την επώαση με τα μανιτάρια πριν ζυμωθούν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο .

Στο Διάγραμμα 5.6 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* προερχόμενου από καλλιέργεια σε υποστρώμα πριονίδι οξιάς (G.I. BS) από εντερικό μικροβίοκοσμο στους δύο χρόνους $t=0$ και $t=24$.



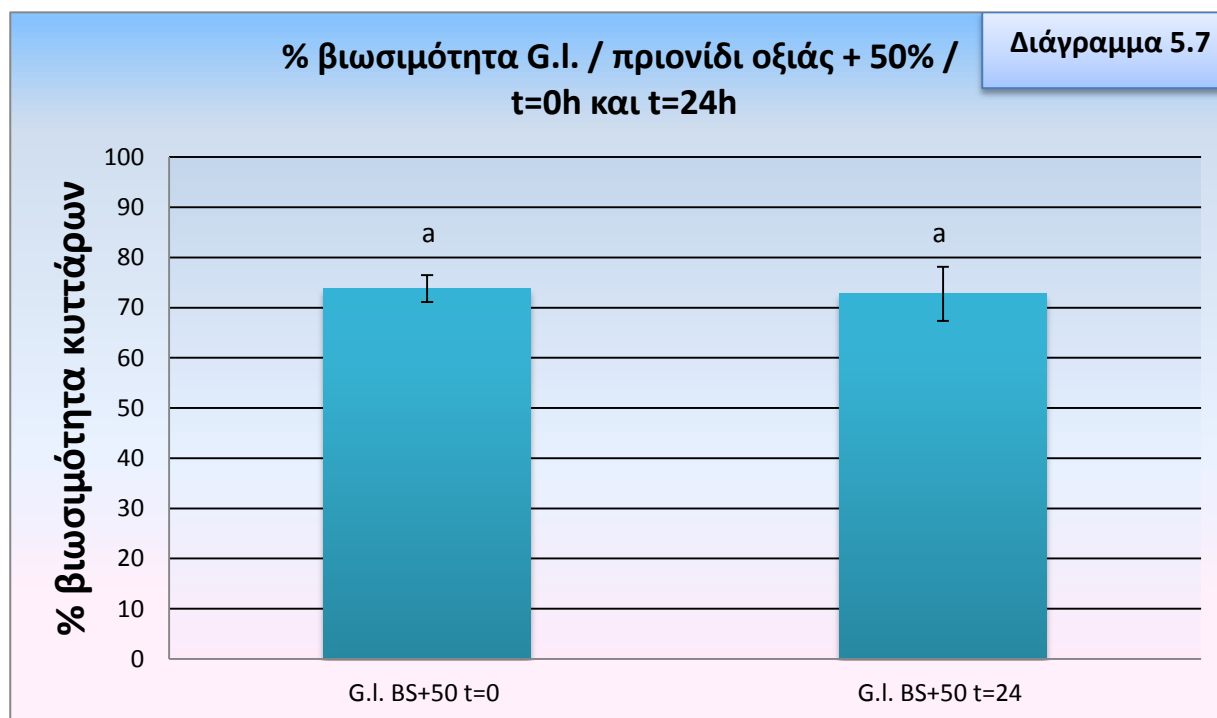
Διάγραμμα 5.6 % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβίοκοσμου με τα υποστρώματα G.I. BS $t=0$ και G.I. BS $t=24$ στους χρόνους $t=0$ και $t=24$ αντίστοιχα.

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων ($n=3$).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές ($p<0.05$)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χειρισμών ($p=0,02$). Δηλαδή παρατηρείται αύξηση της βιωσιμότητας των εντεροκυττάρων όταν επωάζονται με το υπερκείμενο που περιέχει τα προϊόντα της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* το οποίο είχε καλλιεργηθεί σε πριονίδι οξιάς από τον εντερικό μικροβίοκοσμο μετά το πέρας 24 ωρών σε σχέση με το χρόνο $t=0$, δηλαδή με τα ίδια μανιτάρια πριν τη ζύμωσή τους από τους μικροοργανισμούς του εντέρου των υγιών εθελοντών.

Στο Διάγραμμα 5.7 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της βιωσιμότητας (%) των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν το υπερκείμενο της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* προερχόμενου από καλλιέργεια σε υπόστρωμα πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (G.I. BS+50) από εντερικό μικροβιόκοσμο στους δύο χρόνους t=0 και t=24.



Διάγραμμα 5.7 % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχθηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβιόκοσμου με τα υποστρώματα G.I. BS+50 t=0 και G.I. BS+50 t=24 στους χρόνους t=0 και t=24 αντίστοιχα.

Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων (n=3).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές (p<0.05)

Στο παραπάνω διάγραμμα δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Δηλαδή, δεν μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά η βιωσιμότητα των εντεροκυττάρων μετά από την επώασή τους με τα προϊόντα της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* το οποίο είχε καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου από εντερικό μικροβιόκοσμο, σε σχέση με τη βιωσιμότητα των ίδιων κυττάρων όταν επώαστηκαν με το ίδιο μανιτάρι πριν από τη ζύμωσή του.

Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια εκφράζεται όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τις ευεργετικές επιδράσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου και πώς αυτός μπορεί να επηρεάσει την υγεία του ξενιστή. Η σύστασή του μπορεί να μεταβληθεί μέσω της δίαιτας, της αντιβιοτικής αγωγής και της περιβαλλοντικής έκθεσης σε μικροοργανισμούς. Έτσι, η ανίχνευση νέων μεθόδων που μπορούν να μεταβάλουν τη σύστασή του αποτελεί στοίχημα για τους ερευνητές [2].

Τα πρεβιοτικά ως άπεπτα συστατικά, φτάνουν ανέπαφα στο έντερο. Εκεί υφίστανται ζύμωση από προβιοτικά βακτήρια και προάγουν την αύξηση και την ανάπτυξή τους με ευεργετικές συνέπειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Μέχρι σήμερα έχουν τεκμηριωθεί δύο πρεβιοτικά, τα ITF και τα GOS [14, 15]. Υπάρχει όμως μεγάλο ενδιαφέρον και για τις β-γλυκάνες οι οποίες φαίνεται ότι πληρούν τα κριτήρια για να κατοχυρωθούν στο μέλλον ως πρεβιοτικά [17, 21].

Εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζεται και για τους βασιδιομύκητες. Το πλήθος των ευεργετικών τους ιδιοτήτων που κατεγράφησαν από τα αρχαία ακόμα χρόνια [23-28] η μεγάλη περιεκτικότητά τους σε β-γλυκάνες [16, 20, 25] αλλά και άλλους πολυσακχαρίτες (π.χ. ξυλάνες, χιτίνη) και η σημαντική διατροφική τους αξία κέντρισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών [26, 27].

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των βασιδιοκαρπίων δύο βασιδιομυκήτων, των *Pleurotus ostreatus* (καλλιεργημένο σε άχυρο σίτου και σε άχυρο σίτου + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου) και *Ganoderma lucidum* (καλλιεργημένο σε πριονίδι οξιάς και σε πριονίδι οξιάς + 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου), ως μέρος του ελέγχου της πρεβιοτικής δράσης τους. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η επίδραση των βασιδιομυκήτων στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, μετά από τη ζύμωσή τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.

Παρατηρήθηκε ότι το υπερκείμενο των *in vitro* καλλιεργειών, χωρίς κάποιο υπόστρωμα ζύμωσης (μανιτάρια, ινουλίνη), που προσομοιάζει με την υδατική φάση των κοπράνων (faecal water), όταν επωάζεται με τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου στη συγκεκριμένη συγκέντρωση (10%) δεν μειώνει τη βιωσιμότητά τους, σε σχέση με τον μάρτυρα που δεν περιέχει καθόλου υλικό από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αντιστοίχως, οι Erba et al. (2013) [48] διαπίστωσαν ότι η υδατική φάση των κοπράνων δεν παρουσιάζει

τοξική δράση σε διαφοροποιημένα Caco-2 κύτταρα ενώ από άλλους ερευνητές αναφέρεται ότι προκαλεί κυτταροτοξικότητα σε ίδια εντερικά κύτταρα (Wu et al., 2011) [52].

Από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας δεν φαίνεται να παρουσιάζεται κάποια τοξική δράση στα διαφοροποιημένα Caco-2 κύτταρα εξαιτίας των υπερκειμένων των ζυμώσεων των μανιταριών του είδους *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* από εντερικό μικροβίοκοσμο, ανεξάρτητα από το υπόστρωμα στο οποίο είχαν καλλιεργηθεί. Αντιθέτως, η βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων ήταν στα ίδια επίπεδα με την ινουλίνη η οποία έχει τεκμηριωθεί ως πρεβιοτικό.

Η επίδραση των υποστρωμάτων καλλιέργειας των μυκήτων στη βιοδραστικότητα των βασιδιοκαρπίων έχει μελετηθεί και από άλλους ερευνητές. Σχετικά με την καλλιέργεια που έγινε σε υπόστρωμα το οποίο περιελάμβανε 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου οι Reverberi et al. (2004), σε μελέτη όπου εξέτασαν βασιδιομύκητες συμπεριλαμβανομένου και του *Pleurotus ostreatus*, παρατήρησαν ότι η παρουσία απόβλητου ελαιοτριβείου προωθεί την σύνθεση β-γλυκανών. Αυτό όπως αναφέρουν, πιθανώς να συμβαίνει ως απάντηση στο στρες που δημιουργείται στο κυτταρικό τοίχωμα από την ύπαρξη τοξικών ουσιών. Οι Ćilerdžić et al. (2014) [40] μελέτησαν τα βασιδιοκάρπια στελεχών του βασιδιομύκητα *Ganoderma lucidum* που είχε καλλιεργηθεί σε άχυρο σίτου και σε πριονίδι οξιάς. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι τα μανιτάρια που προέρχονταν από καλλιέργεια σε άχυρο σίτου παρουσίασαν καλύτερη αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa και A549.

Φαίνεται λοιπόν, ότι υπάρχει ενδιαφέρον από τους ερευνητές ως προς τις διαφορές που προκύπτουν στη βιοσύνθεση και στη δράση των βασιδιομυκήτων από τα διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας. Οι πλείστες έρευνες όμως που μελετούν την επίδραση των διαφόρων υποστρωμάτων στα κύτταρα, είναι στραμμένες προς την κατεύθυνση της καρκινοστατικής / καρκινοπροστατευτικής δράσης και παραμερίζεται η κυτταροπροστατευτική δράση στα υγιή κύτταρα δημιουργώντας ένα κενό στη βιβλιογραφία.

Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται μια σταθερή υπεροχή στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση με το υπερκείμενο της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* από εντερικό μικροβίοκοσμο. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία αναφέρονται πολύ λίγες μελέτες οι οποίες εξέτασαν την κυτταροτοξική δράση ενός βρώσιμου συστατικού ακολουθώντας μεθόδους που να προσομοιάζουν τις λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος [45]. Αντιθέτως στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα που περιείχαν τα εξεταζόμενα συστατικά χωρίς την συμβολή της αλληλεπίδρασής τους με το γαστρεντερικό σύστημα. Στην περίπτωση της μελέτης της πιθανής πρεβιοτικής δράσης ενός

επί μέρους συστατικού ή τροφίμου, τα άπεπτα συστατικά που εξετάζονται υφίστανται ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Για αυτόν τον λόγο κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της δράσης του, αφού πρώτα ακολουθηθεί μεθοδολογία για προσομοίωση των ζυμώσεων που λαμβάνουν χώρα στον εντερικό μικροβιόκοσμο.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα πτυχιακή μελέτη αποδεικνύεται ότι η κατανάλωση των εδώδιμων μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* είναι ασφαλής ως προς την τοξική δράση που μπορεί να έχουν τα προϊόντα της ζύμωσής τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Με βάση τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, τα μανιτάρια των δύο αυτών γενών πιθανά να εμφανίζουν πρεβιοτική δράση. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητη η συνέχιση της έρευνας τόσο για ενίσχυση της τεκμηρίωσης αυτής της υπόθεσης όσο και για εμβάθυνση της γνώσεις στο πεδίο της καλής λειτουργίας του εντέρου.

Συμπεράσματα

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής μελέτης προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Οι βασιδιομύκητες που ανήκουν στα δύο είδη *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* δεν εμφανίζουν τοξική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μετά από ζύμωση 24 ωρών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο
2. Οι βασιδιομύκητες *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* προωθούν τη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου σε ίσο ή μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με την ινουλίνη (τεκμηριωμένο πρεβιοτικό) τόσο κατά την αρχική παρουσία τους στο έντερο (χρόνος 0) όσο και μετά από ζύμωση από εντερικό μικροβιόκοσμο (χρόνος 24)

Βιβλιογραφία

1. Vander A, S.J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ., ed. *Φυσιολογία του Ανθρώπου II*. 8th ed. 2011. 735-782.
2. Α.-Φ.Α.Μεντής, *Ανθρώπινο Μικροβίωμα του εντέρου - Ο ρόλος στην υγεία και στη νόσο Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 2013: p. 30(3):272-288.
3. Ferreira, C.M., et al., *The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases*. J Immunol Res, 2014. 2014: p. 689492.
4. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. Physiol Rev, 2010. 90(3): p. 859-904.
5. Robles Alonso, V. and F. Guarner, *Linking the gut microbiota to human health*. Br J Nutr, 2013. 109 Suppl 2: p. S21-6.
6. Aagaard, K., et al., *The placenta harbors a unique microbiome*. Sci Transl Med, 2014. 6(237): p. 237ra65.
7. Dutton, R.J. and P.J. Turnbaugh, *Taking a metagenomic view of human nutrition*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. 15(5): p. 448-54.
8. Scott, K.P., et al., *Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro*. FEMS Microbiol Ecol, 2014. 87(1): p. 30-40.
9. Slavin, J., *Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits*. Nutrients, 2013. 5(4): p. 1417-35.
10. Noack, J., et al., *Fermentation profiles of wheat dextrin, inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in vitro digestion pretreatment and in vitro batch fermentation system model*. Nutrients, 2013. 5(5): p. 1500-10.
11. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. 489(7415): p. 242-9.
12. Gueimonde, M. and M.C. Collado, *Metagenomics and probiotics*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18 Suppl 4: p. 32-4.
13. Jones, J.M., *CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the 'fiber gap'*. Nutr J, 2014. 13: p. 34.
14. Roberfroid, M., et al., *Prebiotic effects: metabolic and health benefits*. Br J Nutr, 2010. 104 Suppl 2: p. S1-63.
15. Andriy Synytsyaa, K.M., Alla Synytsyab, Ivan Jablonskýa, Jiří Spěváčekc, Vladimír Erband, Eliška Kovářikovád, Jana Čopíkováa, *Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity*. Carbohydrate Polymers, 2009. 76(4): p. 548-556.
16. F.M.N.A. Aidaa, M.S., *Mushroom as a potential source of prebiotics: a review*. Trends in Food Science & Technology, 2009. 20(11-12): p. 567-575.
17. Ka-Lung Lam, P.C.-K.C., *Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013. 2(1): p. 45-64.
18. Salazar, N., et al., *Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women*. Clin Nutr, 2015. 34(3): p. 501-7.
19. Petry, N., et al., *Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but does not influence iron absorption in women with low iron status*. Am J Clin Nutr, 2012. 96(2): p. 325-31.
20. Rop, O., J. Mlcek, and T. Jurikova, *Beta-glucans in higher fungi and their health effects*. Nutr Rev, 2009. 67(11): p. 624-31.

21. Rakha A, A.P., Andersson R., *How does the preparation of rye porridge affect molecular weight distribution of extractable dietary fibers?* Int J Mol Sci., 2011.
22. Δημήτρης Μ. Δήμου, Γ., Μυκητολόγος, ΜΥΚΗΤΕΣ-MANITAPIA. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ.
23. Mizuno, M. and Y. Nishitani, *Immunomodulating compounds in Basidiomycetes*. J Clin Biochem Nutr, 2013. 52(3): p. 202-7.
24. Sanchez, C., *Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. 85(5): p. 1321-37.
25. El Enshasy, H., et al., *Mushrooms and truffles: historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the middle East*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. 2013: p. 620451.
26. Valverde, M.E., T. Hernandez-Perez, and O. Paredes-Lopez, *Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life*. Int J Microbiol, 2015. 2015: p. 376387.
27. Barbara Stachowiak, J.R., *Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review*. European Food Research and Technology, 2012. 234(3): p. 369-380.
28. Pathirage Kamal Perera, Y.L., *Mushrooms as a functional food mediator in Preventing and ameliorating diabetes*. Functional Foods in Health and Disease, 2011(4): p. 161-171.
29. Ozbey, N., et al., *Serum lipid and leptin concentrations in hypopituitary patients with growth hormone deficiency*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24(5): p. 619-26.
30. Papaspyridi, L.M., et al., *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, 2012. 17(3): p. 2714-24.
31. Hearst, R., et al., *An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (Lentinula edodes) and oyster (Pleurotus ostreatus) mushrooms*. Complement Ther Clin Pract, 2009. 15(1): p. 5-7.
32. Siles, J.A., et al., *Microbial diversity of a Mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e103035.
33. L. Papaspyridi, E.S., P. Christakopoulos, *Effect of carbon and nitrogen sources on the production of dietary fibres and glucans by submerged cultures of two greek mushroom species, Ganoderma australe and Pleurotus ostreatus*. Acta Alimentaria, 2012. 41(2).
34. Nosal'ova, V., et al., *Effects of pleuran (beta-glucan isolated from Pleurotus ostreatus) on experimental colitis in rats*. Physiol Res, 2001. 50(6): p. 575-81.
35. Bishop K, K.C., Xu Y, Glucina MP, Paterson RR, Ferguson LR, *From 2000years of Ganoderma lucidum to recent developments in nutraceuticals*. Phytochemistry, 2015.
36. Thyagarajan-Sahu, A., B. Lane, and D. Sliva, *ReishiMax, mushroom based dietary supplement, inhibits adipocyte differentiation, stimulates glucose uptake and activates AMPK*. BMC Complement Altern Med, 2011. 11: p. 74.
37. Chen, S.N., et al., *The Effect of Mushroom Beta-Glucans from Solid Culture of Ganoderma lucidum on Inhibition of the Primary Tumor Metastasis*. Evid Based Complement Alternat Med, 2014. 2014: p. 252171.
38. Han, X.Q., et al., *Structure elucidation and immunomodulatory activity of a beta glucan from the fruiting bodies of Ganoderma sinense*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e100380.
39. Volman, J.J., et al., *Effects of mushroom-derived beta-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-kappaB transactivation in Caco-2 reporter cells: can effects be explained by structure?* Mol Nutr Food Res, 2010. 54(2): p. 268-76.
40. Cilerdzic, J., et al., *Biological activity of Ganoderma lucidum basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate*. J Ethnopharmacol, 2014. 155(1): p. 312-9.
41. Pawlik, A., et al., *Genetic and metabolic intraspecific biodiversity of Ganoderma lucidum*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 726149.

42. Fraga, I., et al., *Influence of culture medium growth variables on Ganoderma lucidum exopolysaccharides structural features*. Carbohydr Polym, 2014. 111: p. 936-46.
43. Ruan, W., et al., *Extraction optimisation and isolation of triterpenoids from Ganoderma lucidum and their effect on human carcinoma cell growth*. Nat Prod Res, 2014. 28(24): p. 2264-72.
44. Cencic, A. and T. Langerholc, *Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review*. Int J Food Microbiol, 2010. 141 Suppl 1: p. S4-14.
45. Stein, K., et al., *Modification of an in vitro model simulating the whole digestive process to investigate cellular endpoints of chemoprevention*. Br J Nutr, 2011. 105(5): p. 678-87.
46. Maccaferri, S., et al., *Potential probiotic Kluyveromyces marxianus B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system*. Appl Environ Microbiol, 2012. 78(4): p. 956-64.
47. Μ.Πατσού, Έλεγχος της πρεβιοτικής δράσης εδώδιμων μανιταριών που αναπτύσσονται σε υποστρώματα με βάση τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας. 2012, ΠΜΣ Βιώσιμη Ανάπτυξη, Τμήμα Οικιακής Οικονομίας & Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο: Αθήνα. p. 70.
48. Daniela, E., et al., *Fecal water genotoxicity in healthy free-living young Italian people*. Food Chem Toxicol, 2014. 64: p. 104-9.
49. Olano-Martin, E., et al., *In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria*. Br J Nutr, 2000. 83(3): p. 247-55.
50. Rycroft, C.E., et al., *A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides*. J Appl Microbiol, 2001. 91(5): p. 878-87.
51. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2005. 21(1): p. 1-26.
52. Wu, W.T., H.C. Cheng, and H.L. Chen, *Ameliorative effects of konjac glucomannan on human faecal beta-glucuronidase activity, secondary bile acid levels and faecal water toxicity towards Caco-2 cells*. Br J Nutr, 2011. 105(4): p. 593-600.