

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

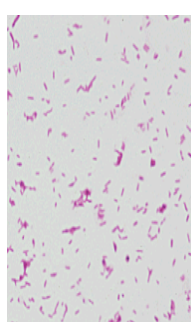
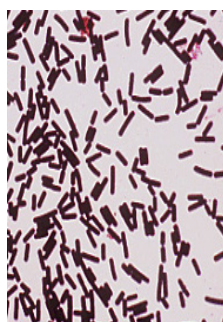
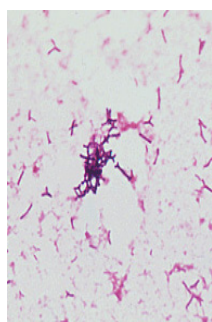
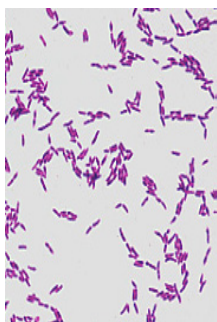
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή μελέτη

Αξιολόγηση των πρεβιοτικών ιδιοτήτων επιλεγμένων ολιγοσακχαριτών και διαιτητικών ινών

Παπουτσή Ιουλία

A.M.: 20226



Εξεταστική επιτροπή

Κυριακού Αδαμαντίνη, Λέκτορας

Νομικός Τζώρτζης, Λέκτορας

Γιαννακούλια Μαρία, Λέκτορας

Καλλιθέα, Οκτώβριος 2007

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτριά μου την κυρία Κυριακού Μαντώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και την Εύη Μήτσου για την πολύτιμη βοήθεια και τη καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στη Γαρυφαλλιά, τον Κώστα και την Ζήνα για τη βοήθεια και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1.	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση.....	5
1.1	Εντερική Μικροχλωρίδα	5
1.1.1	Η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου του ανθρώπου.....	8
1.1.2	Παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική μικροχλωρίδα	10
1.1.3	Μικροοργανισμοί.....	10
1.2	Λειτουργικά τρόφιμα.....	29
1.3	Υδατάνθρακες ως πρεβιοτικές ίνες – λειτουργικά τρόφιμα	30
1.3.1	Β-γλουκάνη	33
1.3.2	Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS).....	40
1.3.3	Ινουλίνη	43
1.4	Πρεβιοτικά και δράσεις τους.....	46
1.4.1	Δράσεις πρεβιοτικών ινών στην εντερική μικροχλωρίδα	52
1.5	Προβιοτικά.....	57
1.6	Συμβιωτικά	64
Κεφάλαιο 2.	Σκοπός της μελέτης.....	67
Κεφάλαιο 3.	Ερευνητική Μελέτη	68
3.1	Εθελοντές - Εμβόλιο.....	68
3.1.1	Καλλιέργεια κλειστού τύπου (batch) με αποκλειστική πηγή C τους υδατάνθρακες: ινουλίνη, β-γλουκάνη από κριθάρι και από βρώμη και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες.....	68
3.1.2	Διαδοχικές αραιώσεις- Επεξεργασία δείγματος υπό αναερόβιες συνθήκες.....	70
3.2	Μικροβιολογική επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων	72
3.2.1	Θρεπτικά υποστρώματα για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας	72
3.2.2	Περιγραφή αποικιών - Χρώση Gram - Δοκιμασία καταλάσης – Καταμετρήσεις πληθυσμών.....	76
3.2.3	Χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που θα μελετηθούν	78
3.3	Στατιστική επεξεργασία	79
Κεφάλαιο 4.	Αποτελέσματα	80
4.1.1	Αποκλειστική πηγή C: Ινουλίνη.....	80
4.1.2	Αποκλειστική πηγή C: β-γλουκάνη από κριθάρι	83
4.1.3	Αποκλειστική πηγή C: β-γλουκάνη από βρώμη.....	86
4.1.4	Αποκλειστική πηγή C: Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS).....	89
Κεφάλαιο 5.	Συζήτηση	96
Κεφάλαιο 6.	Βιβλιογραφία.....	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια για τις πιθανές πρεβιοτικές δράσεις ορισμένων άπεπτων ολιγοσακχαριτών. Το ενδιαφέρον έγκειται στο ότι αυτοί οι ολιγοσακχαρίτες ζυμώνονται εκλεκτικά από συγκεκριμένα βακτήρια της ανθρώπινης εντερικής μικροχλωρίδας, επηρεάζοντας τους μικροβιακούς πληθυσμούς της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάποιες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή. Γενικά οι υδατάνθρακες αυτοί, περιέχονται σε διάφορα τρόφιμα, όπως σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά, καθώς και σε διατροφικά συμπληρώματα. Μερικές από τις ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία, αφορούν τη δυσκοιλιότητα, τη μείωση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων ορού, την ανάπτυξη και ρύθμιση του ανοσοποιητικού, την προστασία από καρκίνο και την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας, με προώθηση των ευεργετικών βακτηρίων (π.χ. μπιφιδοβακτήρια) και παρεμπόδιση πιθανών παθογόνων (π.χ. κλοστρίδια).

Στην παρούσα έρευνα αξιολογήθηκαν οι πιθανές πρεβιοτικές ιδιότητες επιλεγμένων ολιγοσακχαριτών, και πιο συγκεκριμένα της ινουλίνης και των φρουκτοολιγοσακχαριτών (FOS), καθώς και ορισμένων διαιτητικών ινών, και συγκεκριμένα της β-γλουκάνης από κριθάρι και της β-γλουκάνης από βρώμη. Δηλαδή, εξετάστηκε η επίδραση των ουσιών αυτών σε μικροοργανισμούς της εντερικής μικροχλωρίδας. Για το σκοπό αυτό έγιναν καλλιέργειες κλειστού τύπου (batch) με μοναδική πηγή άνθρακα τον πιθανό πρεβιοτικό παράγοντα κάθε φορά και μελετήθηκε η πορεία των πληθυσμών συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων της εντερικής μικροχλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν η ολική αερόβια και αναερόβια μικροχλωρίδα, τα ολικά κολίμορφα βακτήρια, το *E. coli*, οι εντερόκοκκοι, το *Bacteroides* spp., τα κλοστρίδια, οι λακτοβάκιλλοι και τα μπιφιδοβακτήρια.

Από τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε ότι πιο έντονη πρεβιοτική δραστηριότητα παρουσίασε η ινουλίνη, και οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, η β-γλουκάνη από κριθάρι παρουσίασε ενδιάμεση πιθανή πρεβιοτική δραστηριότητα, ενώ η β-γλουκάνη από βρώμη δεν φαίνεται να παρουσιάζει πρεβιοτική δραστηριότητα στις συνθήκες που εξετάστηκαν.

ABSTRACT

Several studies have been carried out the last years about the possible prebiotic effects of non digestive oligosacharides. These oligosacharides are fermented selectively by specific bacteria of human microflora and as a result they affect the colonic microbiota. This leads to some beneficial effects to the host's health. Some of these effects are related to constipation, reduction of serum cholesterol and triglyceride, development and modulation of immune system, antitumor effect and balance of colonic microbiota by promoting its beneficial microflora (*bifidobacterium* for example) and preventing the possible pathogenic (*clostridium* for example). Generally these carbohydrates are contained in several foods, such as fruits, vegetables and cereals, as well as in dietary supplements.

The present study estimated the possible prebiotic effects of some selected oligosacharides - specifically inulin and fructooligosacharides (FOS) - and some fiber - specifically β -glucan from barley and β -glucan from oat. In particular, was examined the effect of these substances to human microbiota. For this reason it was used batch cultures with the possible prebiotic factor as the only carbon source each time and was examined its effect on the population of specific microbial groups of intestine microflora. In particular was examined the total aerobic and anaerobic microflora, *total coliforms bacteria*, *E.coli*, *Enterococci*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Lactobacilus spp.* and *Bifidobacterium spp.*

This study concluded that inulin and fructooligosacharides (FOS) have more intent prebiotic effect, β -glucan from barley has intermediate possible prebiotic effect and β -glucan from oat has not prebiotic effect under the examined conditions.

Κεφάλαιο 1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.1 Εντερική Μικροχλωρίδα

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει γίνει φανερό, ότι το παχύ έντερο είναι ένα υψηλά εξειδικευμένο πεπτικό όργανο, το οποίο σε όλη την έκταση των δραστηριοτήτων της κυρίαρχης μικροχλωρίδας του, ανταγωνίζεται το ήπαρ στην μεταβολική ικανότητα, καθώς και στην ποικιλία των βιοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν σε αυτό. Περίπου το 90% των 10^{14} κυττάρων που σχετίζονται με το ανθρώπινο σώμα είναι μικροοργανισμοί, και η τεράστια πλειοψηφία αυτών ανήκουν στο παχύ έντερο (MacFarlane&McBain, 1999). Από διάφορες έρευνες έχει προκύψει ότι ο αριθμός των βακτηριακών γενών στο παχύ έντερο είναι μεγαλύτερος από 400, αν και η μικροβιακή ποικιλία ξεπερνάει τον αριθμό αυτό (Olano-Martin et al., 2000). Τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας είναι φυσιολογικά πολύ διαφορετικά από αυτά που σχετίζονται με άλλα μέρη του ξενιστή, με πιθανή εξαίρεση τα βακτήρια που αναπτύσσονται στη στοματική κοιλότητα.. Μερικές εκατοντάδες βακτηριακών γενών και ειδών υπάρχουν φυσιολογικά στο παχύ έντερο, με τυπική βιώσιμη απαρίθμηση περίπου 10^{12} – 10^{14} ανά γραμμάριο εντερικής ύλης. Αν και ιστοί του ξενιστή, καθώς και άλλα υποστρώματα με ενδογενή προέλευση (αποβαλλόμενα επιθηλιακά κύτταρα, βλέννες, παγκρεατικές και άλλες εκκρίσεις), συνεχώς διασπώνται και ανακυκλώνονται από τα εντερικά βακτήρια, ο συνδυασμός των ειδών και οι μεταβολικές δραστηριότητες της εντερικής μικροχλωρίδας καθορίζονται κυρίως από τη διατροφή. Επομένως, κυρίως οι άπεπτοι υδαάνθρακες και πρωτεΐνες, επηρεάζουν οικολογικά, φυσιολογικά και μεταβολικά γεγονότα στο παχύ έντερο, στο οποίο εισέρχονται και εκεί μεταβολίζονται από τη μικροβιακή χλωρίδα. Γενικά, η εντερική ζύμωση χαρακτηρίζεται από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων στο εγγύς κόλον με επακόλουθη αύξηση της πρωτεόλυσης στον εντερικό σωλήνα. Τα τελικά επιθυμητά προϊόντα της μεταβολικής αυτής πορείας είναι τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου (SCFA), κυρίως βουτυρικό οξύ, και οι

βιταμίνες. Από την άλλη πλευρά, προκύπτουν και ανεπιθύμητα τελικά προϊόντα, όπως διάφορα καρκινογενή, ουσίες που ευνοούν το σχηματισμό όγκων και βακτηριακές τοξίνες. Το βουτυρικό οξύ αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα στο κόλον και έχειδειχθεί, σε *in vitro* μελέτες, ότι διεγείρει την κυτταρική απόπτωση στο κόλον, ειδικότερα των καρκινικών κυττάρων και αποτελεί καλύτερο διεγέρτη από το προπιονικό και το άλας του οξικού οξέος (MacFarlane&McBain, 1999; Olano-Martin et al., 2000).

Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων, καθώς και της απορρόφησης και του μεταβολισμού των μικρής αλύσου λιπαρών οξέων (SCFA), η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της πέψης του ξενιστή, εξοικονομώντας ενέργεια από τον καταβολισμό άπεπτων συστατικών, είτε πρόκειται για συστατικά της δίαιτας του ξενιστή ή για κυτταρικές εκκρίσεις (MacFarlane & McBain, 1999).

Υπάρχουν επίσης αρκετές ενδείξεις, που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η διαταραχή του εντερικού φραγμού σε ανθρώπους, μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική φλεγμονή και σηπτικές επιπλοκές, μία διαδικασία με την οποία τα βακτήρια του αυλού διαπερνούν την εντερική βλεννώδη μεμβράνη προκειμένου να φτάσουν στα τοπικά λεμφικά κομβία (λεμφαδένες). Τόσο το βακτηριακό εκτόπισμα, όσο και η δημιουργία αποικιών στο γαστρικό σωλήνα από πιθανά παθογόνα βακτήρια, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα μετεγχειρητικής σήψης (Anderson A. D. G et al., 2004).

Επομένως, οι εντερικοί μικροοργανισμοί παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην υγεία και στις ασθένειες, και επηρεάζουν την ανθρώπινη φυσιολογία με διάφορους τρόπους:

- Μέσω των αναγκών του ξενιστή για προϊόντα ζύμωσης από βακτήρια,
- Μέσω της παρεμπόδισης της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών ,
- Μέσω της προστασίας από τη δραστηριότητα ή την καταστροφή από γενοτοξίνες και μεταλλαξιγόνα και
- Μέσω της ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Για παράδειγμα, η εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζει το δίκτυο των κυτοκινών, το οποίο ρυθμίζει το «απαντούμενο όπλο» της απόκρισης του ανοσοποιητικού. Το

γεγονός αυτό αποδεικνύεται με την αναστολή της ελάττωσης της παραγωγής των INF- γ και INF- α σε ποντίκια από προβιοτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος. Στα ανθρώπινα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος, αυτοί οι οργανισμοί έδειξαν να επηρεάζουν το σχηματισμό των IL-1 β , TNF- α και INF- γ , ενώ δεν επηρέασαν καθόλου τα INF- α ή IL-2 (MacFarlane & McBain, 1999; Menne et al., 2000).

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι ευεργετικές δραστηριότητες της μικροχλωρίδας του εντέρου (MacFarlane & McBain, 1999).

Πίνακας 1 Μερικές σχετικές με την υγεία δραστηριότητες που σχετίζονται με την ανάπτυξη βακτηρίων στο παχύ έντερο

Διαδικασίες	Παραδείγματα	Επιρροές στον ξενιστή
Ζύμωση υδατανθράκων	Πέψη αμύλου, μη αμυλούχων πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών που διαφεύγουν της πέψης στο λεπτό έντερο	SCFA ζύμωση ενισχύει την ανάπτυξη επιθηλιακών κυττάρων, ενεργειακή ανάκτηση και άλλες λειτουργίες του παχέος εντέρου. Αύξηση βακτηριακής ανάπτυξης και αποβολής κοπράνων. Ελάττωση απορρόφησης των τοξικών παραγώγων από τη ζύμωση των πρωτεϊνών. Παραγωγή αερίων
Πρωτεόλυση και ζύμωση αμινοξέων	Ανακύκλωση C και N των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων από τα διατροφικά υπολείμματα και τις παγκρεατικές εκκρίσεις. Παραγωγή αμμωνίας, αμινών, HS ⁻ , θειολών, φαινολών και ινδολών.	Τοξικοί μεταβολίτες σχετίζονται με ηπατικό κώμα, άλλα νευρολογικά συμπτώματα, κυτοτοξικότητα και καρκίνο του κόλον. Παραγωγή αερίων.
Υδρογονική διαθεσιμότητα	Παραγωγή μεθανίου, ακετογένεση, σχηματισμός HS ⁻	Μείωση της έντασης των αερίων του κόλον, HS ⁻ κυτοτοξικότητα και ελκώδης κολίτιδα?
Μεταβολισμός χολικών οξέων	Αποσύζευξη και αφυδροξυλίωση των χολικών οξέων, αποθείωση των θειικών των χολικών οξέων.	Απορρόφηση των δευτερευόντων χολικών οξέων. Πιθανή προώθηση της δραστηριότητας σε περίπτωση καρκίνου του κόλον.
Παραγωγή μεταλλαξιγόνων	N-Νιτροζυλίωση των δευτερευόντων αμινών	Καρκίνος παχέος εντέρου
Μεταβολισμός ουδέτερων στεροειδών	Χημική τροποποίηση της χοληστερόλης, φυτικές στερόλες και στεροειδείς ορμόνες.	Επαναρρόφηση και ανακύκλωση των μειωμένων κορτικοστεροειδών, προγεστερόνης, οιστρογόνων, ρόλος

		στον καρκίνο του μαστού?
Μετατροπές ξενοβιοτικών ουσιών	Αποθείωση του cyclamate για παραγωγή κυκλοεξилаμίνης (cyclohexylamine) Αποθείωση και σύνδεση στο δέκατο C των εκκρίσεων των φαρμάκων στη χολή. Σχηματισμός β-γλυκουρονιδάση/ μεθυλαζοξυμεθανόλη από cycasin Μετατροπή του άζο χημικού δεσμού στη σουλφασαλαζίνη για την παραγωγή της δράσης του φαρμάκου 5-αμινοσαλικυλικό οξύ	Σχηματισμός έντονων τοξικών ουσιών, επιμήκυνση εντεροπαθητικής κυκλοφορίας των ξένων μιγμάτων
Μεταβολισμός των υποκαταστατών και των φυτοοιστρογόνων	Μετατροπή σε εντεροδιόλη, εντερολακτόνη και equol	Οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές επιδράσεις: σχετικά με τη γονιμότητα και τον καρκίνο του μαστού.
Ανάπτυξη και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος	Αποδείξεις από προβιοτικές μελέτες, έρευνες με αξενικά (gnotobiotic) ζώα	Αυξημένη αντίδραση στη μόλυνση
Αποικιακή αντοχή	Φραγμός της ώριμης μικροχλωρίδας εναντίον εισβαλλόμενων ειδών. Υποβάθμιση κατά τη διάρκεια ασθενείας ή από θεραπεία με αντιβιοτικά/ φάρμακα	Αντίσταση σε ασθένειες

1.1.1 Η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου του ανθρώπου

Οι κυριότερες περιοχές μόνιμων αποικιών του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, είναι ο τελικός ειλεός και το παχύ έντερο, και όχι το στομάχι και το λεπτό έντερο, εξαιτίας του γαστρικού οξέος και της επακόλουθης διαβρωτικής επίδρασής του στο πεπτικό περιεχόμενο. Το γεγονός αυτό είναι το αποτέλεσμα της επιβράδυνσης της κινητικότητας του πεπτικού υλικού στο κόλον, το οποίο

δίνει το χρόνο που απαιτείται για να αναπτυχθεί ένα πολύπλοκο και μόνιμο μικροβιολογικό οικοσύστημα (MacFarlane & McBain, 1999).

Στους ενήλικες το παχύ έντερο είναι περίπου 1,5 μ. μακρύ και έχει χωρητικότητα 500ml το μέγιστο. Καθημερινά δέχεται περίπου 1,5 kg υλικού από το λεπτό έντερο, κυρίως γρήγορα απορροφούμενο νερό. Το κόλον περιέχει περίπου 200g υλικού από τα οποία τα μισά είναι βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς, μικροοργανισμοί είναι το κυριότερο συστατικό των κοπράνων, τα οποία αποτελούνται από περίπου 55% στερεού σε άτομα που καταναλώνουν δυτικές τύπου δίαιτες. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η μέση αποβαλλόμενη ποσότητα κοπράνων είναι 100-200g (MacFarlane & McBain, 1999).

Αφού τα πεπτικά υλικά εισέλθουν στο τυφλό έντερο, διασπώνται ταχύτατα από γρήγορα ζυμογόνους μικροοργανισμούς που απαντώνται εκεί. Τα καθημερινά υπολείμματα σχηματίζουν μια λίμνη από τα προϊόντα της ζύμωσης στο εγγύς κόλον, και το μίγμα διαφοροποιείται από μέρα σε μέρα. Τμήματα αυτού του υλικού περιοδικά μεταφέρονται στο εγκάρσιο και στο κατώτερο τμήμα του κόλον, όπου επιπλέον απορρόφηση νερού αυξάνει το ιξώδες και ελαττώνει τη μίξη. Εξαιτίας της χρησιμοποίησης των πεπτικών υλικών από τα βακτήρια στο εγγύς κόλον, ειδικά των υδατανθράκων, υπάρχει μια προοδευτική μείωση στη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων προς το κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου, επηρεάζοντας ιδιαίτερα, παράγοντες όπως ο τύπος και ο αριθμός των προϊόντων ζύμωσης που σχηματίζονται και το pH του κόλον. Το γεγονός αυτό μπορεί να επιδράσει σε έναν αριθμό μεταβολικών διαδικασιών στο έντερο, συμπεριλαμβανομένων του σχηματισμού προϊόντων ζύμωσης και άλλων ενζυμικών δραστηριοτήτων, όπως της 7-α-αφυδρογονάσης του χολικού οξέος, πρωτεασών και πεπτιδασών. Έτσι, μερικοί βακτηριακοί πληθυσμοί και δραστηριότητες μπορεί να περιοριστούν, ή να επικρατήσουν στα ειδικά τμήματα του παχέος εντέρου (MacFarlane & McBain, 1999).

Η μεταφορά του πεπτικού περιεχομένου μέσα στο παχύ έντερο συμπεριλαμβάνει δύο χρονολογικές συνιστώσες. Ο χρόνος που δαπανάται στην περιοχή της μίξης (τυφλό έντερο και άνω κόλον) και ο χρόνος που δαπανάται κατά το πέρασμα και την αποθήκευση ορισμένων στερεών κοπράνων στον εντερικό σωλήνα. Ο

χρόνος που βρίσκεται το πεπτικό υλικό στο παχύ έντερο είναι καθοριστικός για τον μεταβολισμό των αποικιών των βακτηρίων. Μακριές αποικιακές μεταφορές επηρεάζουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών καθώς και άλλων ξένων υποστρωμάτων, και έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση καρκίνου παχέος εντέρου. Επιπλέον, υπάρχει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο πέρασμα του χρόνου και τη μάζα των βακτηρίων: Οι Stephen et al. (1986) χρησιμοποίησαν το φάρμακο senokot για να επιταχύνουν τον χρόνο της μεταφοράς στο έντερο από 64 σε 25 ώρες σε ανθρώπους εθελοντές. Το γεγονός αυτό αύξησε το μέσο βάρος των κοπράνων από 148 σε 285g/d, με αύξηση της βακτηριακής μάζας από 18,9 σε 20,3 g. Σε αντίθεση, θεραπεία με κωδεΐνη/λοπραμίδη επιβράδυνε τον χρόνο μεταφοράς από 47 σε 88 ώρες και μείωσε τη βακτηριακή μάζα από 18,9 σε 16,1 g (MacFarlane & McBain, 1999).

1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική μικροχλωρίδα

Η ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία, θεραπεία με φάρμακα, η διατροφή, η φυσιολογία του ξενιστή, η περίσταση, η τοπική ανοσία και ο *in situ* βακτηριακός μεταβολισμός. Ωστόσο, η διατροφή φαίνεται να παίζει κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό του τύπου της εντερικής χλωρίδας που αναπτύσσεται, αφού τα τρόφιμα αποτελούν την κύρια πηγή θρεπτικών συστατικών για τα βακτήρια του παχέος εντέρου. Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα πρεβιοτικά είναι υδατάνθρακες οι οποίοι υφίστανται εκλεκτική ζύμωση, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των μπιφιδοβακτηρίων και των λακτοβακίλλων στο κόλον. Οι τελευταίοι μικροοργανισμοί θεωρείται ότι έχουν θετική επίδραση στην υγεία και την ευεξία του ξενιστή (Olano-Martin et al., 2002).

1.1.3 Μικροοργανισμοί

Τα μπιφιδοβακτήρια και οι λακτοβάκιλλοι της εντερικής μικροχλωρίδας είναι δύο από τα είδη των μικροοργανισμών που αποτελούν στόχους των διατροφικών παρεμβάσεων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχει αναφερθεί ότι έχουν ευεργετικές

ιδιότητες για την υγεία, όπως η προστατευτική δράση σε οξείες και χρόνιες διαταραχές του εντέρου και η παρεμπόδιση της εξωγενούς παθογένειας, με αναστολή της δημιουργίας αποικιών από παθογόνα βακτήρια. Τέτοια παθογόνα βακτήρια είναι ορισμένα είδη κλοστρίδιων (*Clostridium difficile* and *C. perfringens*) και παθογόνα *Enterobacteriaceae*. Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής SCFA, της μείωσης του pH του παχέος εντέρου, της παραγωγής αντιμικροβιακών μιγμάτων και/ ή μέσω της ανταγωνιστικής δράσης τους στα υποστρώματα και στις θέσεις προσκόλλησης (Rycroft et al. 2001, Olano-Martin et al. 2000; Manderson et al., 2005).

Το *Bifidobacterium infantis* είναι πιο εξειδικευμένο στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παθογόνων *in vitro*, σε σχέση με τα άλλα είδη μπιφιδοβακτηρίων (Fuller et al. 1999).

Η ερευνητική ομάδα του Moore et al μελέτησε τις επιδράσεις των διάφορων μικροοργανισμών στην ανάπτυξη του καρκίνου στο παχύ έντερο. Πρόκειται για μία επιδημιολογική μελέτη σε πληθυσμούς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια θετική συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου αριθμού μπιφιδοβακτηρίων και του χαμηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. Τα βακτήρια των κοπράνων συγκρίθηκαν σε πληθυσμούς με πολύποδες (υψηλού κινδύνου ομάδα), Γιαπωνέζους-Χαβανέζους (υψηλού κινδύνου ομάδα), Καυκάσιους από Βόρεια Αμερική, γηγενείς Γιαπωνέζους αγρότες και γηγενείς Αφρικανούς αγρότες. Δεκαπέντε βακτηριακές ομάδες σχετίστηκαν σημαντικά με υψηλό κίνδυνο καρκίνου του κόλον (μεταξύ αυτών τα *Bacteroides* και τα μπιφιδοβακτήρια) και πέντε σχετίστηκαν σημαντικά με χαμηλό κίνδυνο εμφάνισης (συγκεκριμένα είδη λακτοβακίλλων και το *Eubacterium aerofaciens*) (Brady et al., 2000).

Ο *Lactobacillus plantarum* εμπεριέχεται σε πολλά τρόφιμα, αποικεί φυσιολογικά στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό (GIT) και χαρακτηρίζεται επίσης ως προβιοτικό. Ο *L. plantarum* WCFS1 απομονώθηκε αρχικά από το ανθρώπινο σάλιο. Ολόκληρο το γονιδίωμά του (3.3 Mb) έχει αναλυθεί λεπτομερώς και είναι το πιο γνωστό από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ένα από τα χαρακτηριστικά του είναι η ενζυμική του δράση σε μεγάλο φάσμα υδατανθράκων, όπως οι

μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη), οι δισακχαρίτες (σουκρόζη, λακτόζη, τρεχαλόζη) και οι ολιγοσακχαρίτες (ραφινόζη και μελεζιτόζη). Έχει βρεθεί επίσης, ότι επιβιώνει μέσα στο στομάχι και παραμένει ενεργό στον γαστρεντερικό σωλήνα περισσότερο από 6 ημέρες (Saulnier et al., 2007).

1.1.3.1 *Bifidobacterium* spp.

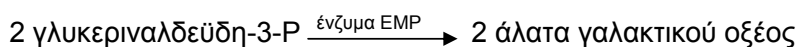
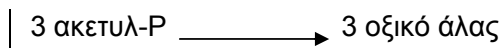
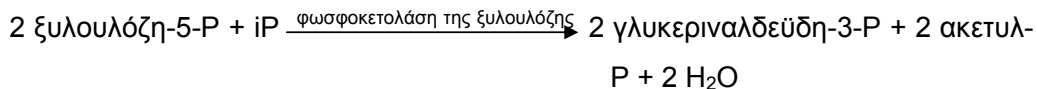
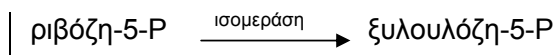
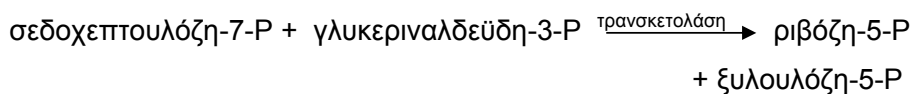
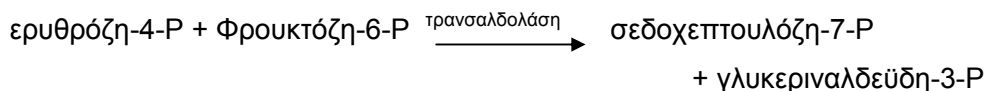
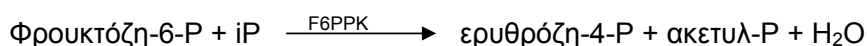
Τα μπιφιδοβακτήρια είναι βακτήρια σε σχήμα βακίλλου, των οποίων το σχήμα μπορεί να ποικίλει αρκετά. Για παράδειγμα μπορεί να είναι κοντά, κανονικά, λεπτά με έντονο τελείωμα (εξόγκωση), κοκκοειδή κανονικά, επιμήκη με μικρά μαστίγια ή προεξοχές ή με μια μεγάλη ποικιλία διακλαδώσεων. Επίσης μπορεί να είναι και σε σχήμα Υ (Scardovi, 1986 & Roupard et al., 1973). Οι αποικίες που σχηματίζουν είναι επίπεδες, κυρτές (convex), χρώματος μπλε προς λευκό, γυαλιστερές και με απαλή συνοχή. Επιπλέον, είναι Gram-θετικά, αρνητικά στη δοκιμή acid-fast, δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια και τα κύτταρα συχνά μεταβάλλουν ανώμαλα το χρώμα τους με το μπλε του μεθυλίου. Σε δοκιμασία καταλάσης εμφανίζονται αρνητικά, εκτός από το *B. indicum* και το *B. asteroides*, τα οποία είναι θετικά στην παραπάνω δοκιμασία όταν αναπτύσσονται παρουσία αέρα με ή χωρίς προσθήκη αιμίνης. Πρόκειται για αναερόβια βακτήρια, αν και μερικά είδη μπορούν να αντέχουν στο O₂ μόνο με ταυτόχρονη παρουσία CO₂. Η βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται είναι 37-41°C και το βέλτιστο pH για αρχική ανάπτυξη, είναι 6,5-7,0, ενώ δεν παρατηρείται ανάπτυξη σε 4,5-5 ή 8,0-8,5 (Scardovi, 1986).

Τα μπιφιδοβακτήρια αποτελούν μια ετερογενή ομάδα, όσον αφορά τις διατροφικές τους απαιτήσεις, και οι απαιτήσεις τους για βιταμίνες δε φαίνεται να σχετίζονται με την οικολογική διανομή των διαφόρων ειδών. Γενικά, μπορούν να χρησιμοποιούν άλατα αμμωνίου ως πηγή αζώτου, και φαίνεται ότι ορισμένα είδη, όπως τα *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum*, *B. cuniculi*, δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς οργανικό άζωτο. Τα είδη που δεν απαιτούν οργανικό άζωτο για την ανάπτυξή τους, εκκρίνουν αξιοσημείωτες ποσότητες διάφορων αμινοξέων στο μέσο που αναπτύσσονται. Τα αμινοξέα που παράγονται σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι η αλανίνη, η βαλίνη και το ασπαρτικό οξύ, αν και κάποια είδη

εκκρίνουν και θρεονίνη. Επιπλέον, μεταλλάξεις του *B. thermophilum*, φαίνεται ότι παράγουν αυξημένες ποσότητες ισολευκίνης και βαλίνης (Scardoni, 1986).

Κατά τον μεταβολισμό τους σχηματίζονται οξικό και γαλακτικό οξύ σε μοριακή αναλογία 3:2, μικρές ποσότητες φορμικού οξέος, αιθανόλης και ηλεκτρικού οξέος, ενώ δεν παράγεται CO₂ (εξαίρεση αποτελεί η χημική αποικοδόμηση του άλατος του γλυκονικού οξέος). Βουτυρικό και προπιονικό οξύ δεν παράγονται, ενώ η γλυκόζη αποικοδομείται εκλεκτικά και χαρακτηριστικά, μέσω της μετατροπής της φρουκτόζης-6-P σε ακετυλο-P και σε ερυθρόζη-4-P, με τη βοήθεια του ενζύμου φρουκτόζη-6-φωσφοκετολάση (F6PPK). Τα τελικά προϊόντα σχηματίζονται μέσω των διαδοχικών δράσεων της τρανσαλδολάσης, της τρανσκετολάσης, της ξυλουλόζης-6-φωσφατάσης φωσφοκετολάσης και από ένζυμα της βιοχημικής οδού Embden-Meyerhof (EMP) που δρουν πάνω στην γλυκεριναλδεΐδη-3-P. Επιπλέον, οξικό και φορμικό οξύ σχηματίζονται από τη διάσπαση του πυροσταφυλικού άλατος (Scardoni, 1986).

Ο μεταβολισμός, και πιο συγκεκριμένα, η ζύμωση της εξόζης πραγματοποιείται στο γένος *Bifidobacterium* μέσω της παρακάτω ακολουθίας αντιδράσεων:



2 εξόζη $\longrightarrow$ 3 οξικό άλας + 2 άλατα γαλακτικού οξέος

Αξίζει να αναφερθεί ότι η γλυκεριναλδεϋδη-3-P μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό άλας, το οποίο στη συνέχεια μπορεί είτε να μειωθεί προς παραγωγή γαλακτικού, είτε να διασπαστεί από μία φωσφορολυτική αντίδραση, σε οξικό και φορμικό. Έτσι, στην περίπτωση που το πυροσταφυλικό άλας διασπαστεί εξολοκλήρου, ο σχηματισμός του γαλακτικού είναι αδύνατος. Η μεταβολική αυτή οδός τελικά διαχώρισε τα μπιφιδοβακτήρια από τους λακτοβακίλλους, αφού στους τελευταίους δε συμβαίνει κάτι τέτοιο (Roupard et al., 1973).

Η παρουσία του H_2O_2 αναστέλλει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων που περιγράφηκε παραπάνω, καθιστώντας το ένζυμο F6PPK ανενεργό (Roupard et al., 1973). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ειδών των μπιφιδοβακτηρίων και θεωρείται χαρακτηριστικό ένζυμο του μπιφιδογενούς χαρακτήρα. Απομονώθηκε πρώτη φορά από τα υποχρεωτικά αερόβια *Acetobacter xylinum* και *Leuconostoc mesenteroides*. Όταν χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα η φρουκτόζη-6-P, το ένζυμο F6PPK δεν εμφανίζεται σε αναερόβια Gram-(+) βακτήρια που έχουν μορφολογία ψευδομπιφιδοβακτηρίων, π.χ. *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* και *Actinomyces* (Scardovi, 1986; Roupard et al., 1973).

Τα μπιφιδοβακτήρια εμφανίζουν αντοχή σε ορισμένα αντιβιοτικά όπως η καναμυκίνη, η νεϊμυκίνη, η στρεπτομυκίνη, η πολυμυξίνη, η γενταμυκίνη, το ναλιδιξικό οξύ και η μεντρονιδαζόλη. Κάποια άλλα αντιβιοτικά όμως, όπως η ολεανδομυκίνη, η λινκομυκίνη, η κλινδαμυκίνη, η βανκομυκίνη, η πενικιλίνη G, η αμπικιλίνη, η ερυθρομυκίνη, η μπασιτρασίνη, η χλωραμφενικόλη και η νιτροφουρανοΐνη, δρουν ανασταλτικά. Η ευαισθησία στην τετρακυκλίνη διαφοροποιείται μεταξύ των ειδών και μεταξύ του γένους. Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν κυρίως τα *B.bifidum*, *B.longum*, *B. adolescentis* (Scardovi, 1986).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων είναι λιγότερος σε κόπρανα βρεφών, τα οποία δεν έχουν θηλαστεί, σε σχέση με αυτά που έχουν. Ο

καθοριστικός παράγοντας στο ανθρώπινο γάλα, ο οποίος έλειπε από το αγελαδινό, ταυτοποιήθηκε ως N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (bifidus factor) που περιείχε σακχαρίτες. Αυτός ο παράγοντας έχει φανεί ότι χρησιμοποιείται από τα μπιφιδοβακτήρια ως υπόστρωμα για τη σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος (Roupard et al., 1973).

Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί της εντερικής μικροχλωρίδας εμπλέκονται σε πολλές από τις κύριες διαδικασίες του οργανισμού που σχετίζονται με την απορρόφηση, τον μεταβολισμό συγκεκριμένων υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών, και στην παραγωγή ορισμένων βιταμινών του συμπλέγματος Β. Έτσι, επηρεάζουν τη φυσιολογική απόκριση στη μόλυνση, εμπλέκονται στο μεταβολισμό του καρκίνου, των πρωτεϊνών του ορού, της χοληστερόλης, των ορμονών και των βιταμινών. Επιπλέον σε ασθενείς με ηπατική ασθένεια, χορήγηση μπιφιδοβακτηρίων, προκάλεσε μείωση της αμμωνίας του αίματος, των φαινολών του ορού, του ελεύθερου αμμωνιακού αζώτου, των ελεύθερων φαινολών και των ελεύθερων αμινοξέων της ουρίας (Roupard et al., 1973).

Τέλος, οι μικροοργανισμοί αυτοί βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο, σε διάφορα ζώα και σε μέλισσες που παράγουν μέλι, καθώς και σε βοθρολύματα και σε υλικά νοσοκομείου. Στην περίπτωση που τα μπιφιδοβακτήρια προέρχονται από πηγές εκτός της εντερικής οδού, ενδέχεται να έχουν πιθανή παθογόνα δράση (Scardovi, 1986; Roupard et al., 1973).

1.1.3.2 *Lactobacillus* spp.

Τα βακτήρια του γένους αυτού είναι βάκιλλοι είτε επιμήκεις και λεπτοί, καμιά φορά κυρτοί, είτε κοντοί, συχνά ακανόνιστοι κοκκοβάκιλλοι. Επίσης συχνά εμφανίζονται σε αλυσίδες και η δυνατότητα κίνησης είναι σπάνια, ενώ όταν υπάρχει, πραγματοποιείται από περίτριχα μαστίγια. Δεν εμφανίζουν σπόρια και είναι Gram(+). Μερικές αλυσίδες παρουσιάζουν διπολικά σώματα, εσωτερική κοκκοποίηση ή ραβδωτή εμφάνιση, μετά από αντίδραση Gram και χρώση από το μπλε του μεθυλίου. Οι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται καλύτερα σε ελαφρά όξινα υποστρώματα με αρχικό pH 6,4 - 4,5, ενώ η ανάπτυξη σταματάει σε pH 4,0 – 3,6, γεγονός που εξαρτάται από το είδος και το γένος. Τα περισσότερα είδη είναι

αρκετά αεροανθεκτικά, με την ιδανική ανάπτυξη να επιτυγχάνεται κάτω από μικροαερόφιλες ή αναερόβιες συνθήκες. Μια αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ (~5%) μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη. Βέβαια, οι περισσότεροι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονται καλύτερα σε μεσόφιλες θερμοκρασίες, με ανώτερο όριο τους 40°C, με μερικά είδη να αναπτύσσονται κάτω από τους 15 °C ή ακόμα και κάτω από 5°C. Οι λεγόμενοι θερμόφιλοι λακτοβάκιλλοι παρουσιάζουν ανώτερο όριο τους 55°C και κατώτερο τους 15°C (Kandler & Weiss 1986).

Οι αποικίες που εμφανίζουν σε άγαρ είναι συνήθως μικρές (2-5mm), κυρτές (convex), απαλές, γυαλιστερές και αδιαφανείς, χωρίς χρώμα. Σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζονται κιτρινωπές ή κοκκινωπές. Μερικά είδη εμφανίζουν σκληρές αποικίες, ενώ γλοιώδεις αποικίες σχηματίζονται μόνο από τον *L. confusus*. Οι ξεκάθαρες ζώνες που προκαλούνται από εξοζύμα, συνήθως δεν παρατηρούνται όταν αναπτύσσονται σε άγαρ που περιέχει πρωτεΐνες ή λίπη. Ωστόσο, πολλά είδη παρουσιάζουν μικρή πρωτεολυτική δραστηριότητα, εξαιτίας των πρωτεασών και πεπτιδασών που διαθέτουν, καθώς και μία ασθενή λιπολυτική δραστηριότητα, εξαιτίας των κυρίαρχων ενδοκυτταρικών λιπασών. Η ευδιάκριτη αποικοδόμηση του αμύλου, που οδηγεί σε σχηματισμό διαυγών ζωνών σε τρυβλία αμύλου, παρατηρείται μόνο σε μερικά είδη όπως *L. amylophilus*, *L. amylovorans*. Η ανάπτυξη σε υγρό μέσο πραγματοποιείται σε όλη την έκταση αυτού, αλλά τα κύτταρα καθιζάνουν μετά την παύση της ανάπτυξης. Το ίζημα είναι απαλό και ομοιογενποιημένο, σπάνια κοκκώδες ή γλοιώδες. Τέλος, δε σχηματίζεται ποτέ υμένας στην επιφάνεια (Kandler & Weiss 1986).

Όσον αφορά τον ενζυμικό μεταβολισμό τους, είναι υποχρεωτικά σακχαρολυτικά. Τουλάχιστον μισό από το τελικό προϊόν είναι το γαλακτικό, το οποίο συνήθως δεν υφίσταται ζύμωση. Επιπρόσθετα προϊόντα μπορεί να είναι το οξικό άλας, η αιθανόλη, CO₂, το άλας φορμικού ή ηλεκτρικού οξέος. Δεν παράγονται πτητικά οξέα με περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα. Είναι μικροαερόφιλα μιας και η ανάπτυξη στην επιφάνεια στερεών μέσων γενικότερα ενισχύεται σε συνθήκες μειωμένης πίεσης οξυγόνου και 5-10% CO₂, ενώ κάποια είναι υποχρεωτικά αναερόβια. Στη δοκιμασία καταλάσης και κυτοχρωμάτων είναι αρνητικά, ωστόσο

κάποια διασπούν το υπεροξειδίο του υδρογόνου με αποτέλεσμα να δίνουν εσφαλμένη θετική αντίδραση καταλάσης. Οι θρεπτικές απαιτήσεις τους συμπεριλαμβάνουν αμινοξέα, πεπτίδια, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, βιταμίνες, άλατα, λιπαρά οξέα, εστέρες λιπαρών οξέων, ζυμώσιμους υδατάνθρακες. Οι διατροφικές αυτές απαιτήσεις είναι χαρακτηριστικές για τα διάφορα είδη, ακόμα και μόνο για συγκεκριμένα στελέχη (Kandler & Weiss 1986).

Οι λακτοβάκιλλοι δεν αναπτύσσονται χαρακτηριστικό άρωμα όταν αναπτύσσονται σε συνηθισμένα μέσα. Ωστόσο, συνεισφέρουν στο άρωμα των ζυμώσιμων τροφίμων, παράγοντας διαφορετικά πτητικά μείγματα, όπως διακετύλιο και παράγωγά του, ακόμη και H_2S και αμίνες στο τυρί. Επιπλέον είναι οργανισμοί που έχουν πολύ σύνθετες διατροφικές ανάγκες, προσαρμοσμένες στα σύνθετα οργανικά υποστρώματα. Δεν απαιτούν μόνο υδατάνθρακες ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, αλλά όπως αναφέρεται και πιο πάνω, νουκλεοτίδια, αμινοξέα και βιταμίνες. Ενώ το παντοθενικό και το νικοτινικό οξύ απαιτούνται, με κάποιες εξαιρέσεις, από όλα τα είδη, η θειαμίνη απαιτείται μόνο για την ανάπτυξη των ετεροζυμωτικών λακτοβακίλλων. Η ανάγκη για φολικό οξύ, ριβοφλαβίνη, άλας φωσφορικής πυριδοξάλης και για *p*-αμινοβενζοϊκό οξύ, διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη, με τη ριβοφλαβίνη να είναι το πιο συχνό απαιτούμενο συστατικό. Η βιοτίνη και η βιταμίνη B_{12} είναι απαραίτητες για μερικά μόνο είδη. Τα βιταμινοεξαρτώμενα είδη χρησιμοποιούνται στην τεχνική του βιολογικού προσδιορισμού της δραστηριότητας των βιταμινών. Επίσης ο τύπος των αμινοξέων που απαιτούνται, διαφέρει ανάμεσα στα είδη και γένη. Μέσω διαδοχικών μεταλλάξεων οι Morishita et al., κατάφεραν να πετύχουν πενταπλασιασμό μεταλλαγμένων στελεχών του *L. casei*, τα οποία έχασαν τις απαιτήσεις τους για 5 αμινοξέα. Από όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι οι περισσότερες, αν όχι όλες, διατροφικές απαιτήσεις των λακτοβακίλλων, είναι το αποτέλεσμα ενός αριθμού μικρών ελλείψεων μέσα στο γονιδίωμα, με τις περισσότερες πληροφορίες που κωδικοποιούν διάφορα βιοσυνθετικά μονοπάτια, να εξακολουθούν να είναι παρούσες στο χρωμόσωμα. Τέλος, οι λακτοβάκιλλοι που αναπτύσσονται σε συγκεκριμένα υποστρώματα, μπορεί να απαιτούν ειδικούς αυξητικούς παράγοντες, όπως το D-μεβαλονικό οξύ που χρησιμοποιείται

στη ζύμωση του σακέ (γιαπωνέζικο ποτό) για την καταστροφή κάποιων μικροοργανισμών, ή ακόμα ένα μικρό πεπτίδιο που απομονώνεται από το εκχύλισμα ζύμης, βρέθηκε να απαιτείται για την εκλεκτική αύξηση του *L. Sanfrancisco* (Kandler & Weiss 1986).

Μεταβολικά, οι λακτοβάκιλλοι βρίσκονται στα όρια της αερόβιας και αναερόβιας ζωής. Έχουν αποτελεσματικά ενζυμικά μονοπάτια υδατανθράκων που συνδυάζονται με το επίπεδο φωσφορυλίωσης του υποστρώματος. Ένα δεύτερο επίπεδο φωσφορυλίωσης του υποστρώματος είναι η μετατροπή του άλατος του φωσφοκαρβαμλικού οξέος σε CO_2 και NH_3 , που αποτελεί το τελικό βήμα της ζύμωσης της αργινίνης, παρατηρείται στους περισσότερους ετεροζυμωτικούς λακτοβακίλλους. Ωστόσο, μόνο μερικά από τα είδη που σχηματίζουν NH_3 από αργινίνη, είναι ικανά να αναπτύσσονται με την αργινίνη ως μοναδική πηγή ενέργειας. Επιπρόσθετα, στο επίπεδο φωσφορυλίωσης υποστρώματος, η ενέργεια μπορεί να κερδηθεί από την πρωτοκινητήρια δύναμη, που δημιουργείται από την παραγωγή του άλατος του γαλακτικού οξέος. Οι λακτοβάκιλλοι, με μερικές εξαιρέσεις, δεν διαθέτουν ισοπρενοϊδείς κινόνες και κυτοχρωμικά μονοπάτια για να επιτελέσουν οξειδωτική φωσφορυλίωση. Όμως, έχουν οξειδάσες που περιέχουν φλαβόνες και υπεροξειδάσες, προκειμένου να φέρουν σε πέρας την οξείδωση του NADH_2 και του O_2 ως τελικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων. Επίσης διαθέτουν έναν μηχανισμό καθαρισμού του υπερυπεροξειδίου που καταλύεται από μαγγάνιο, αν και δε διαθέτουν δισμουτάση και καταλάση του υπερυπεροξειδίου (Kandler & Weiss 1986).

Τα κύρια ενζυμικά μονοπάτια των εξόζων είναι το μονοπάτι των Embden-Meyerhof που μετατρέπει 1mol εξόζης σε 2mol γαλακτικού οξέος (ομογαλακτική ζύμωση), και το μονοπάτι του άλατος του 6-φωσφογλυκονικού οξέος, όπου τα τελικά προϊόντα είναι 1mol CO_2 , 1mol αιθανόλης (οξικού οξέος) και 1mol γαλακτικού οξέος (ετερογαλακτική ζύμωση). Κάτω από αερόβιες συνθήκες, τα περισσότερα είδη είναι ικανά να επανοξειδώνουν NADH_2 με το οξυγόνο να λειτουργεί ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων, και έτσι το ακετυλοCoA ή να μην μετατρέπεται ή να μετατρέπεται μερικώς σε αιθανόλη. Συμπερασματικά, επιπρόσθετο ATP προστίθεται από το επίπεδο φωσφορυλίωσης του

υποστρώματος, και απαντώνται κυμαινόμενα ποσά οξικού οξέος και αιθανόλης, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (Kandler & Weiss 1986).

Το άλας του πυροσταφυλικού σχηματίζεται και από τις δύο παραπάνω μεταβολικές οδούς και μπορεί να υποστεί αρκετές εναλλακτικές μετατροπές, αποδίδοντας, είτε το γνωστό άρωμα που περιέχει διακετύλιο και τα παράγωγά του, ή οξικό οξύ (αιθανόλη). Με περιορισμό της εξόζης, το παραπάνω μονοπάτι μπορεί να επικρατήσει και η ομογαλακτική ζύμωση να μετατραπεί σε ετεροζυμωτική, με το οξικό οξύ, την αιθανόλη και τα φορμικά οξέα να αποτελούν τα κύρια προϊόντα. Στο γένος *L. brevis* που απομονώνεται από το κρασί, παρατηρείται μια παράξενη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία περιλαμβάνει τη μετατροπή της γλυκερόλης σε 1,3- προπανοδιόλη, με τη γλυκόζη να είναι ο δότης των ηλεκτρονίων (Kandler & Weiss 1986).

Οι λακτοβάκιλλοι, ενζυμικά, διαχωρίζονται σε ομο- και ετερο-ζυμωτικούς, σύμφωνα με την παρουσία ή απουσία της αλδολάσης ή της φωσφοκετολάσης. Οι υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί, με κάποιες εξαιρέσεις π.χ. τους στρεπτόκοκκους, δεν μπορούν να ζυμώσουν τις πεντόζες, γιατί δεν έχουν φωσφοκετολάσες, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τις εξόζες. Αντίθετα, οι ετεροζυμωτικοί, μέσω της φωσφοκετολάσης, έχουν αυτή τη δυνατότητα και αποδίδουν ίσο αριθμό moles γαλακτικού και οξικού οξέος (Kandler & Weiss 1986).

Όσον αφορά τους ολιγοσακχαρίτες, αυτοί διασπώνται κυρίως από τις γλυκοζιδάσες, οι οποίες προκύπτουν από την φωσφορυλίωση των μονοσακχαριτών. Ωστόσο, η λακτόζη και η γαλακτόζη απομονώνονται από μερικούς λακτοβακίλλους, μέσω του φωσφωενολοπυροσταφυλικού-εξαρτώμενου συστήματος της φωσφοτρανσφεράσης. Το άλας του φωσφογαλακτικού που σχηματίζεται, διασπάται σε γλυκόζη και σε άλας της D-6-P-γαλακτόζη. Το τελευταίο, μεταβολίζεται από τη βιοχημική οδό του άλατος του d-tagatose-6-P (Kandler & Weiss 1986).

Οι λακτοβάκιλλοι είναι ευαίσθητοι στα περισσότερα αντιβιοτικά, τα οποία δρουν εναντίον gram (+) βακτηρίων. Ο *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* συχνά χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει αντιβιοτικά που περιέχονται στο γάλα. Επίσης, θεωρούνται μη παθογόνα βακτήρια, εκτός από κάποια στελέχη που εμπλέκονται

στην οδοντική τερηδόνα. Ωστόσο, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ερευνών που υποστηρίζουν ότι οι λακτοβάκιλλοι εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες. Κυρίως ο *L. casei subsp. rhamnosus*, αλλά και οι *L. acidophilus*, *L. plantarum*, και λιγότερο συχνά ο *L. salivarius*, έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με μη οξεία βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, συστηματική σηψαιμία και αποστήματα σε ασθενείς που έχουν σοβαρά προβλήματα στη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος. Επιπλέον μερικά στελέχη έχουν απομονωθεί από χοριοαμνίτιδα και ουροσθήνη. Το εύρημα ότι μερικοί λακτοβάκιλλοι από το στομάχι μηρυκαστικών, δικαρβοξυλιώνουν το ινδολοξικό οξύ σε σκατόλιο (β-μεθυλινδόλιο), ένα συστατικό το οποίο ευθύνεται για οξύ πνευμονικό εμφύσημα στις αγελάδες, αποτελεί το πρώτο θετικό βήμα για την εξακρίβωση της παθογένειας των λακτοβακίλλων (Kandler & Weiss 1986).

Τέλος, οι λακτοβάκιλλοι απαντώνται στις επιφάνειες φυτών, στα φυτά που αποσυντίθενται (φρούτα), στη χαλασμένη μπύρα, στο γάλα και στα προϊόντα του, στο κρέας και στα προϊόντα του, στα ψάρια και στα μαριναρισμένα ψάρια, στα βοθρολύματα και στην κοπριά, καθώς και στον άνθρωπο και τα ζώα. Ο εντερικός σωλήνας των ζώων και του ανθρώπου φιλοξενεί πολλά είδη λακτοβακίλλων. Ο *L. salivarius* είναι το πιο τυπικό είδος της στοματικής μικροχλωρίδας, αν και βρίσκεται και στον εντερικό σωλήνα και ο *L. acidophilus* βρίσκεται στο έντερο και θεωρείται ότι παίζει έναν ευεργετικό ρόλο στους ανθρώπους (Kandler & Weiss 1986).

1.1.3.3 *Clostridium* spp

Τα κλοστρίδια είναι βάκιλλοι, με τα περισσότερα είδη να έχουν ευθεία ή ελαφρώς καμπυλοειδή μορφή και το μήκος και το πλάτος τους να ποικίλλει. Οι μορφές αυτές καταλήγουν σε στρογγυλεμένες άκρες. Τα κύτταρα μπορεί να είναι μεμονωμένα, σε ζευγάρια, σε κοντές ή μακριές αλυσίδες και σε μερικές περιπτώσεις σε σφιχτή σπειροειδή μορφή ή σε έλικα. Γενικά, εμφανίζονται Gram(+), τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους, και μπορεί να παρουσιάζουν, ή όχι, κινητικότητα. Στην περίπτωση που παρουσιάζουν

αυτόνομη κίνηση, τα κύτταρα είναι συνήθως περίτριχα. Επίσης σχηματίζουν οβάλ ή σφαιρικά ενδοσπόρια, τα οποία διογκώνουν το κύτταρο (Cato et al., 1986).

Συνήθως είναι χημειοοργανότροφα, αν και ορισμένα είδη είναι χημειοαυτότροφα ή χημειολιθότροφα. Παράγουν μίγματα οργανικών οξέων και αλκοολών από υδατάνθρακες ή πεπτόνες. Επίσης μπορεί να είναι σακχαρολυτικά, πρωτεολυτικά, τίποτα από τα δύο ή και τα δύο. Έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες, τις αλκοόλες, τα αμινοξέα, τις πουρίνες, τα στεροειδή και άλλα οργανικά συστατικά. Μερικά είδη τους συνθέτουν ατμοσφαιρικό άζωτο. Επιπλέον, δεν έχουν τη δυνατότητα να φέρουν σε πέρας μια καταβολική μείωση της σουλφατάσης και συνήθως είναι αρνητικά στη δοκιμασία της καταλάσης, αν και κάποια ίχνη καταλάσης μπορεί να ανιχνευθούν σε ορισμένα είδη. Το κυτταρικό τους τοίχωμα περιέχει μεσο-διαμινοπιμελικό οξύ (meso-DAP). Τα περισσότερα είδη είναι υποχρεωτικά αναερόβια, αν και η ανοχή στο O₂ ποικίλλει, αφού μερικά είδη αναπτύσσονται, χωρίς όμως τον σχηματισμό σπορίων, παρουσία αέρα σε ατμοσφαιρική πίεση. Η ανάπτυξή τους είναι ραγδαία σε pH 6,5-7 και σε θερμοκρασία 30-37 °C, αν και η βέλτιστη θερμοκρασία για ανάπτυξη ποικίλει από 15-69 °C, ανάλογα με το είδος (Cato et al., 1986).

Τα περισσότερα είδη είναι ικανά να ελαττώσουν το μέσο, μέσα στο οποίο αναπτύσσονται, με το να καθιστούν το ενδιάμεσο περιβάλλον κατάλληλο για συνεχή ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό φαίνεται από την ικανότητά τους να μειώνουν το ουδέτερο κόκκινο στο peptone-yeast extract-glucose (PYG) σε υγρές καλλιέργειες ή resazurin σε PYG σε deer άγαρ ή σε υγρές καλλιέργειες. Επίσης αρκετά είδη φαίνεται να καταστρέφονται από βακτηριοφάγους. Αξίζει να αναφερθεί ότι μερικά κλοστρίδια είναι παθογόνα και για τον άνθρωπο και για τα ζώα και απαιτείται η δοκιμασία της ουδετεροποίησης της τοξίνης τους για την ταυτοποίησή τους. Κλοστριδιακές τοξίνες είναι οι μη πρωτεολυτικές τοξίνες των τύπων E, B και F του *C. botulinum* και η E τοξίνη του *C. perfringens*. Οι παραπάνω παράγονται ως μη τοξικές πρόδρομες ενώσεις οι οποίες πρέπει να ενεργοποιηθούν από πρωτεολυτικά ένζυμα (Cato et al., 1986).

Τέλος τα κλοστρίδια είναι ευρέως διαδεδομένα, και βρίσκονται στο χώμα, στα βοθρολύματα, στα θαλάσσια ιζήματα, στην αποσυντιθέμενη βλάστηση, στα ζωικά

και φυτικά προϊόντα, στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα, στα σπονδυλωτά και στα έντομα, σε πληγές και σε μολύνσεις του μαλακού ιστού του ανθρώπου και των ζώων (Cato et al., 1986).

1.1.3.4 Total Coliforms

Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* στην οποία ανήκουν τα ολικά κολίμορφα, περιλαμβάνει Gram (-) βακτήρια σε σχήμα ευθείας ράβδου, μεγέθους 0,3-1,0 x 1,0-6,0 μm. Παρουσιάζουν αυτόνομη κίνηση με περίτριχα μαστίγια ή δεν παρουσιάζουν, δε σχηματίζουν ενδοσπόρια ή μικροκύστες και δεν είναι acid-fast. Αναπτύσσονται και παρουσία και απουσία οξυγόνου, σε πεπτόνη, σε εκχύλισμα κρέατος και συνήθως στο μέσο Mac- Conkey. Μερικά αναπτύσσονται σε D-γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, άλλα απαιτούν βιταμίνες και/ ή αμινοξέα. Είναι χημειοοργανότροφα, παρουσιάζουν και αναπνευστικό και ενζυμικό μεταβολισμό, και δεν είναι αλόφιλα. Επίσης, από τη ζύμωση της D-γλυκόζης, άλλων υδατανθράκων και πολυυδροξυλιωμένων αλκοολών, παράγονται οξέα και άλλα εμφανή αέρια. Τα περισσότερα είδη είναι θετικά στη δοκιμασία καταλάσης και αρνητικά στην οξειδάση και μετατρέπουν το άλας του νιτρικού σε νιτρώδες άλας. Ο καθορισμός τους περικλείει μια μεγάλη βιοχημικά και γενετικά συσχετισμένη ομάδα, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά την οικολογία της, την επέκτασή της στον ξενιστή και την δυνητική παθογένειά της στον άνθρωπο, στα ζώα, στα έντομα και στα φυτά (Cato et al., 1986).

Τα *Enterobacteriaceae* είναι παγκοσμίως διαδεδομένα. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα φρούτα, στα λαχανικά, στους κόκκους δημητριακών, στα λουλούδια και στα δέντρα, στα ζώα από τα έντομα μέχρι και τον άνθρωπο. Η ιατρική τους και η οικονομική τους σημασία, όπως επίσης, και η γρήγορη αναγέννησή τους, η ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε ορισμένα μέσα και η ευκολία στη γενετική τροποποίησή τους, τα καθιστούν αντικείμενα ενδιαφέροντος σε εργαστηριακές μελέτες. Όσον αφορά την οικονομική τους σημασία, το γένος *Erwinia* περιέχει φυτοπαθογόνα είδη τα οποία προκαλούν καταστροφή, μαρασμό και μαλακό σάπισμα στο καλαμπόκι, στον ανανά και σε άλλα είδη καλλιέργειας, συχνά καταστρέφοντας σημαντικές ποσότητες της ετήσιας σοδειάς.

Πολλά είδη από την οικογένεια αυτή προκαλούν ασθένειες σε ζώα και στον άνθρωπο, όπως είδη των γενών *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia* κ.α. (Cato et al., 1986).

Το *E. coli* αποτελεί το πιο σημαντικό παθογόνο αίτιο για τη διάρροια τόσο στα παιδιά, όσο και στους ενήλικες, σε όλες τις περιοχές του κόσμου. Τα διηθητικά και εντεροτοξιγονικά στελέχη της *Yersinia enterocolitica*, προφανώς περιορισμένα σε μερικούς ορότυπους, προκαλούν διάρροια και μεσεντερική λεμφανεδίτιδα. Επίσης, τα εντεροτοξιγονικά είδη της *Klebsiella pneumoniae* έχουν συχνά απομονωθεί από ασθενείς με τροπική χρόνια διάρροια. Βέβαια, και τα είδη των *Enterobacteriaceae* που δεν σχετίζονται με διάρροια, συχνά αναφέρονται ως μελλοντικά παθογόνα. Τα περισσότερα από αυτά μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία από μολύνσεις σε άτομα που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες όπως για παράδειγμα υποσιτισμένοι, διαβητικοί, ανοσοκατεσταλμένοι, καθετηριασμένοι, εγκαυματίες, καρκινοπαθείς, με αναπνευστικό πρόβλημα, ή ηλικιωμένους. Τα άτομα αυτά κινδυνεύουν περισσότερο από νοσοκομειακές μολύνσεις που προκαλούνται από μελλοντικά παθογόνα και κυρίως από τα *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* και *Serratia marcescens* (Cato et al., 1986).

1.1.3.5 *Escherichia coli*

Το γένος *Escherichia* περιλαμβάνει και αυτό βακτήρια σε σχήμα ευθείας ράβδου, μεγέθους 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm και βρίσκονται είτε μεμονωμένα, είτε σε ζευγάρια. Είναι Gram (-) και σε πολλά είδη διαθέτουν έλυτρο. Πολλά είδη, ιδιαίτερα αυτά που απομονώνονται από περιοχές εκτός του εντέρου έχουν πολυσακχαριτικό έλυτρο. Παρουσιάζουν κινητικότητα με περίτριχα μαστίγια ή δεν παρουσιάζουν. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά μαστίγια, τα περισσότερα είδη έχουν κροσσούς ή πρωτεϊνικά ινίδια, τα οποία συχνά εκτείνονται σε μεγάλο αριθμό από την βακτηριακή επιφάνεια και σε οποιαδήποτε κατεύθυνση του περιβάλλοντα χώρου (Orskov, 1986).

Επιπλέον, είναι δυνητικά αναερόβια, έχοντας και αναπνευστικό και ενζυμικό τύπο μεταβολισμού, με τις περισσότερες περιγραφές να έχουν εξαχθεί από τη μελέτη

του *E. coli*, αφού το *E. blattae* δεν έχει μελετηθεί αρκετά και υπάρχουν μόνο ελάχιστα στελέχη της. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 37°C και οι αποικίες σε θρεπτικό άγαρ εμφανίζονται απαλές, ελαφρά κυρτές (low convex), υγρές, χρώματος γκρι, με γυαλιστερή επιφάνεια και με ευκολία διασποράς σε αλατούχο διάλυμα, ή μπορεί να είναι δύσκολη η διασπορά στο διάλυμα αυτό. Βέβαια υπάρχουν και ενδιάμεσοι σχηματισμοί ανάμεσα σε αυτές τις δύο ακραίες καταστάσεις. Σύμφωνα με την κατάσταση των λιποπολυσακχαριτών του ελύτρου, τα είδη μπορεί να περιγραφούν ως λεία (S) ή σκληρά (R). Οι μορφές S, που συνήθως αναπτύσσονται σαν γυαλιστερές αποικίες σε συνήθη άγαρ και παρουσιάζονται θολές σε υγρό μέσο, έχουν αναπτύξει έλυτρο, ενώ οι R μορφές, που συνήθως εμφανίζουν ξηρές και ζαρωμένες αποικίες σε άγαρ και που συγκολλούνται αυθόρμητα σε υγρό μέσο, έχουν χάσει το έλυτρό τους λόγω μετάλλαξης (Orskov, 1986).

Επίσης παράγονται βλεννώδεις και γλοιώδεις σχηματισμοί, είναι χημειοοργανότροφα και αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης (Orskov, 1986).

Συνήθως χρησιμοποιείται οξικό άλας ως μοναδική πηγή άνθρακα, με το κιτρικό άλας να μη δύναται να χρησιμοποιηθεί. Η γλυκόζη και οι άλλοι υδατάνθρακες μπορούν να υποστούν ζύμωση με την παραγωγή πυροσταφυλικού άλατος, το οποίο μετατρέπεται περισσότερο σε γαλακτικό, οξικό και φορμικό οξύ. Μέρος του φορμικού οξέος διασπάται από ένα σύνθετο υδρογονολυτικό σύστημα σε ίσες ποσότητες CO₂ και H₂. Επίσης μερικά είδη είναι αναερόβια. Η λακτόζη υφίσταται ζύμωση από τα περισσότερα είδη, αν και η ζύμωση αυτή μπορεί να επιβραδυνθεί ή και να απουσιάζει. Τα βακτήρια του είδους αυτού βρίσκονται στο κατώτερο τμήμα του εντερικού σωλήνα θερμόαιμων ζώων και στην περίπτωση της *E. blattae*, στις κατσαρίδες (Orskov, 1986).

Μερικά στελέχη του *E. coli* παράγουν εντεροτοξίνες. Από αυτές, δύο έχουν μελετηθεί καλά. Η μία είναι η θερμοευαίσθητη τοξίνη (LT), η οποία σχετίζεται στενά με την τοξίνη της χολέρας και η άλλη είναι η θερμοανθεκτική τοξίνη (ST). Και οι δύο βρίσκονται είτε απομονωμένες, είτε μαζί, στα εντεροτοξικά στελέχη του *E. coli*, και συχνά σχετίζονται με έναν περιορισμένο αριθμό ορότυπων. Έτσι, το *E. coli* μπορεί να είναι δυνητικά παθογόνο, άλλα πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι

ένας σχετικά περιορισμένος αριθμός οροτύπων ή κλώνων, παίζει επίσης έναν σημαντικό και πιο ειδικό ρόλο σε εντερικές και εξω-εντερικές ασθένειες. Όσον αφορά τις τελευταίες, η νεογνική μηνιγγίτιδα συχνά σχετίζεται με αντιγονικούς τύπους, τα οποία έχουν το K1 αντιγόνο. Ένας περιορισμένος αριθμός των O:K:H αντιγονικών τύπων, συνήθως με μαστίγια τύπου I και συχνά αιμολυτικά, σχετίζεται με βακτηριακές μολύνσεις του ουροποιητικού σωλήνα. Άλλες τέτοιες ασθένειες, όπως η συμφόρηση του ουροποιητικού σωλήνα και η σηψαιμία, μπορεί να σχετίζονται με παρόμοια σετ οροτύπων. Σχετικά με τις εντερικές ασθένειες, τα εντεροπαθογόνα στελέχη του *E.coli*, καλύπτονται από ελάχιστους αντιγονικούς τύπους, οι οποίοι σχετίζονται με την παιδική διάρροια, που παρουσιάζεται σε παιδικά ιδρύματα. Επίσης, τα εντεροτοξικά στελέχη, προκαλούν διάρροια σε ανθρώπους και ζώα και πολλά από αυτά έχουν προσκολλημένα F αντιγόνα. Τα εντεροδιηθητικά στελέχη διαθέτουν αυτούς τους ορότυπους που μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια ανάλογη της δυσεντερίας. Τέλος, το *E. blattae* δεν έχει σχετιστεί με παθογένεια ούτε στον άνθρωπο, ούτε στις κατσαρίδες (Orskov, 1986).

1.1.3.6 *Bacteroides* spp.

Τα βακτήρια του γένους αυτού, είναι μη σπορογόνοι και Gram (-) βάκιλλοι, δεν παρουσιάζουν κινητικότητα ή αν παρουσιάζουν γίνεται μέσω περίτριχων μαστιγίων, είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι και χημειοοργανότροφοι. Πολλά είδη αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε συγκεντρώσεις 5-100% CO₂ (με βέλτιστο 10%) αρκεί να απουσιάζει το οξυγόνο. Σε πολλά είδη εμφανίζονται διογκώσεις στα άκρα ή στο κέντρο, καθώς και κενοτόπια και νημάτια. Οι βάκιλλοι μπορεί να εμφανίζουν πλειομορφία σε περίπτωση που οι συνθήκες καλλιέργειας είναι λιγότερο ιδανικές. Τα κύτταρα μερικών ειδών είναι μακρύτερα σε σταθερές καλλιέργειες από ότι σε υγρές. Επιπλέον, ανάμεσα στα είδη που έχουν ενζυμική δράση, τα κύτταρα είναι μακρύτερα με την παρουσία υδατανθράκων που μπορούν να υποστούν ζύμωση, σε σχέση με βασικό μέσο την πεπτόνη. Η θερμοκρασία που παρουσιάζεται πιο γρήγορη ανάπτυξη είναι 37°C και το

αντίστοιχο pH κοντά στο 7, ενώ σε μερικά είδη δεν παρουσιάζεται καλή ανάπτυξη σε pH χαμηλότερο του 7 (Holdeman et al., 1986).

Μεταβολίζουν υδατάνθρακες, πεπτόνες ή μεταβολικά ενδιάμεσα. Ενζυμικά προϊόντα σακχαρολυτικών ειδών, περιλαμβάνουν συνδυασμούς από άλατα ηλεκτρικού, οξικού, γαλακτικού, φορμικού ή προπιονικού οξέος και μερικές φορές μαζί με μικρής αλύσου αλκοόλη, με το άλας του βουτυρικού συνήθως, να μην αποτελεί το κύριο προϊόν. Επίσης, από την πεπτόνη μπορεί να παραχθούν ίχνη μέτριας ποσότητας από άλατα ισοβουτυρικού και ισοβαλερικού. Τα σακχαρολυτικά στελέχη μπορεί να παράγουν από την πεπτόνη είτε α) συνδυασμούς από ίχνη μέτριων ποσοτήτων από άλατα ηλεκτρικού, φορμικού, οξικού και γαλακτικού, είτε β) συνδυασμούς από ίχνη μέτριων έως μεγαλύτερων ποσοτήτων από άλατα οξικού, βουτυρικού, ηλεκτρικού, ισοβαλερικού, προπιονικού, ισοβουτυρικού οξέος και αλκοολών. Όταν παράγεται n-βουτυρικό άλας, τότε υπάρχουν επίσης και άλατα ισοβουτυρικού και ισοβαλερικού οξέος. Επιπλέον, το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται ή απαιτείται από πολλά σακχαρολυτικά στελέχη και είναι ενσωματωμένο στο ηλεκτρικό οξύ. Η αιμίνη ή η βιταμίνη K, απαιτούνται για την ανάπτυξη μερικών ειδών, ιδιαίτερα των σακχαρολυτικών που παράγουν άλας ηλεκτρικού οξέος. Συνήθως αιμίνη και βιταμίνη K προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας του γένους *Bacteroides*. Μερικά είδη απαιτούν επίσης και NaCl 0,5% (Holdeman et al., 1986).

Όλα τα 14 είδη του γένους *Bacteroides* που έχουν ενζυμική δραστηριότητα, είναι θετικά στη δοκιμασία φωσφατάσης (pH 6-7,2) και είναι ικανά να ζυμώνουν τη γλυκόζη-1-φωσφατάση, ενώ πέντε είδη που δεν έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν ήταν αρνητικά και στα δύο παραπάνω. Μερικά είδη όπως τα *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, ήταν ικανά να προκαλούν αποσύζευξη και να μετατρέπουν πολλά χολικά οξέα. Μπορούν επίσης να αφυδροξυλιώνουν, αφυδρογονώνουν και να διαχωρίζουν πλευρικές αλυσίδες από αυτά τα χολικά οξέα, π.χ. άλατα χολικών οξέων, άλατα χενοδεοξυχολικών οξέων και άλατα δεοξυχολικών οξέων. Αναγωγική καρβοξυλίωση του άλατος του ηλεκτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό πραγματοποιείται στα *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. multiaacidus*, *B. uniformis* (Holdeman et al., 1986).

Θετικές αντιδράσεις που οδηγούν σε παραγωγή οξέος από τη ζύμωση υδατανθράκων από *Bacteroides*, δείχνουν ένα pH<5,5 και μία μείωση στο pH τουλάχιστον 0,5 μονάδες κάτω από τον έλεγχο του υποστρώματος peptone-yeast basal στη καλλιέργεια (Holdeman et al., 1986).

Μέλη του γένους αυτού έχουν απομονωθεί στις κοιλότητες του ανθρώπου, άλλων ζώων, και σε έντομα, σε μολύνσεις μαλακών ιστών και σε βοθρολύματα. Μερικά είδη είναι παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα (Holdeman et al., 1986).

1.1.3.7 Enterococci

Η πρώτη περιγραφή του γένους *Enterococcus* είναι αρκετά πρόσφατη, από τους Schleifer & Kilpper-Balz (1984), οι οποίοι περιέγραψαν τα γένη *E. faecium* και *E. faecalis*. Το όνομά τους μετατράπηκε σε *Enterococcus* όταν τα είδη *Streptococcus faecalis* και *S. faecium*, μεταφέρθηκαν από τους στρεπτόκοκκους στους εντερόκοκκους. Πρόκειται για Gram (+) κόκκους, αρνητικούς στη δοκιμασία καταλάσης, μικροαερόφιλοι ή αναερόβιοι και δεν εμφανίζουν ενδοσπόρια (Klein, 2003). Πιο συγκεκριμένα το *E. faecalis* εμφανίζει ωοειδή και επιμηκυσμένα κύτταρα, μεγέθους 0,5-1μm, κυρίως σε ζευγάρια και σε κοντές αλυσίδες. Γενικά δεν εμφανίζουν αυτόνομη κίνηση και σπάνια χρωματίζονται, με μια πιθανή ψευδή χρώση λόγω καθίζησης των μεταλλικών ιόντων. Οι αποικίες σε στερεά μέσα είναι απαλές, κρεμ ή άσπρες και ολόκληρες. Όσον αφορά το *E. faecium*, τα κύτταρα είναι σφαιρικά ή ωοειδή, κυρίως σε ζευγάρια και κοντές αλυσίδες. Επίσης, μπορούν να σχηματιστούν επιμηκυσμένα κύτταρα. Δεν εμφανίζουν κινητικότητα, ενώ τα είδη που κινούνται διαφέρουν στην εστεράση και την πρωτεάση, στο πολυακρυλαμίδικό gel. Οι αποικίες σε ξηρό μέσο, είναι μαλακές, άσπρες και ολόκληρες (Mundt, 1986).

Η ικανότητα των εντερόκκων να αναπτύσσονται σε NaCl 6,5%, σε pH 9,6 και σε 10°C τους διαχωρίζει από τους άλλους στρεπτόκοκκους (Klein, 2003; Mundt, 1986). Επίσης, χρησιμοποιούν πολλούς υδατάνθρακες μέσω ενός ενζυμικού μονοπατιού, με το τελικό pH διαλύματος γλυκόζης, να είναι συνήθως 4,2-4,6, ενώ περιστασιακά εμφανίζονται χαμηλότερες τιμές. Οι εντερόκκοι συνήθως δε χρησιμοποιούν το άλας του νιτρικού και δεν πέπτουν τη κυτταρίνη ή την πηκτίνη

ή τα υδρολυμένα τριγλυκερίδια. Ωστόσο, ορισμένες λιπάσες έχουν εντοπιστεί σε μερικά είδη άλλων γενών. Μόνο το πρωτεολυτικό είδος *E. faecalis* πέπτει την καζεΐνη και τη ζελατίνη (Mundt, 1986).

Η ζύμωση της γλυκόζης κανονικά αποδίδει κυρίως γαλακτικό οξύ. Αυξημένες ποσότητες φορμικού και οξικού οξέος, καθώς και αιθανόλης, σχηματίζονται εφόσον η ουδετερότητα του μέσου παραμένει σταθερή. Η γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται και οξειδώνεται υπό αερόβιες συνθήκες σε άλας γαλακτικού οξέος. Με έντονο αερισμό, όχι απλά αερόβια επώαση, τα τελικά προϊόντα μετατρέπονται σε ένα μίγμα οξικού οξέος, ακετυλ-μεθυλ-καρβινόλη και CO₂. Τέλος, το άλας του μηλικού, παρουσία γλυκόζης, μεταβολίζεται χωρίς παραγωγή αερίου (Mundt, 1986).

Μερικά είδη ευθύνονται για τις μολύνσεις του ουροποιητικού σωλήνα και για μη οξεία ενδοκαρδίτιδα (Mundt, 1986).

Όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι των γλυκοπεπτιδίων, όπως η βανκομυκίνη και η τεϊκοπλανίνη. Τα γλυκοπεπτιδία χρησιμοποιούνται ως τελευταία επιλογή σε σοβαρές νοσοκομειακές μολύνσεις, στην περίπτωση που η πενικιλίνη αποδειχθεί αναποτελεσματική στην καταπολέμηση των εντερόκοκκων (Klein, 2003).

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι της μόνιμης μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων. Στο ανθρώπινο έντερο, τα πιο συχνά απαντούμενα είδη είναι τα *E. faecalis* και *E. faecium*. Σε παραγωγικά ζώα, όπως πουλερικά, γουρούνια και βόδια, επικρατεί το *E. faecium*, αλλά και το *E. faecalis* και το *E. cecorum*, και λιγότερο συχνά το *E. gallinarum*, το *E. durans/hirae* και το *E. avium*. Αντίθετα, τα *E. mundtii* και *E. casseliflavus* έχουν κυρίως φυτική προέλευση. Επίσης, βρίσκονται σε ζωικά προϊόντα, σε κόπρανα ανθρώπων και ζώων, και αποτελούν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα ορισμένων τροφίμων (Klein, 2003; Mundt, 1986).

1.2 Λειτουργικά τρόφιμα

Για να μπορεί ένα τρόφιμο να χαρακτηριστεί ως λειτουργικό θα πρέπει να εκπληρώνει τα παρακάτω κριτήρια. Το πρώτο είναι να περιέχει ένα τροφικό συστατικό (είτε είναι διατροφικό είτε όχι), το οποίο επιδρά σε έναν ή περιορισμένο αριθμό δράσεων στο σώμα με ένα συγκεκριμένο τρόπο, έτσι ώστε να έχουν θετικές επιδράσεις. Το δεύτερο είναι να έχει φυσιολογικές και ψυχολογικές επιδράσεις, εκτός της παραδοσιακής διατροφικής τους αξίας. Έτσι, συλλογικά, ένα λειτουργικό τρόφιμο πρέπει να έχει σχετικές επιδράσεις στην υγεία και ευεξία ή στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθένειας. Το συστατικό που καθιστά ένα τρόφιμο λειτουργικό, μπορεί να είναι είτε ένα απαραίτητο μακροσυστατικό εάν έχει ειδικές φυσιολογικές επιδράσεις, όπως το ανθεκτικό άμυλο, ή ένα απαραίτητο μικροσυστατικό εάν η πρόσληψή του είναι επιπρόσθετη από τις ημερήσιες απαιτήσεις. Επιπλέον, μπορεί να είναι ένα τροφικό συστατικό ακόμα και αν μερικές από τις διατροφικές του αξίες δεν συμπεριλαμβάνονται στα απαραίτητα (π.χ. μερικοί ολιγοσακχαρίτες), ή ακόμα και αν δεν είναι θρεπτικό (π.χ. ζωντανοί μικροοργανισμοί ή φυτικά χημικά). Ένα τρόφιμο μπορεί να γίνει λειτουργικό με τους ακόλουθους τρόπους (Roberfroid, 1999):

1. Αυξάνοντας την συγκέντρωση ενός φυσικού συστατικού, ώστε να φτάσει στη συγκέντρωση αυτή, που είναι πιο πιθανό να επηρεάσει τις αναμενόμενες επιδράσεις (π.χ. ενίσχυση με ένα μικροσυστατικό ώστε να επιτευχθεί μία ημερήσια πρόσληψη μεγαλύτερη από την απαιτούμενη, αλλά συμβατή με τον διαιτητικό οδηγό του Block για παρεμπόδιση εμφάνισης ασθένειας) ή αυξάνοντας τη συγκέντρωση ενός μη θρεπτικού συστατικού, του οποίου τα ευεργετικά αποτελέσματα έχουν αποδειχθεί.
2. Προσθέτοντας ένα συστατικό το οποίο δεν βρίσκεται υπό κανονικές συνθήκες στα περισσότερα τρόφιμα, αλλά του οποίου οι ευεργετικές επιδράσεις έχουν κατοχυρωθεί (π.χ. μη βιταμινούχα αντιοξειδωτικά ή πρεβιοτικές φρουκτάνες).
3. Αντικαθιστώντας ένα συστατικό, συνήθως μακροσυστατικό, του οποίου η πρόσληψη είναι συνήθως υπερβολική έχοντας έτσι δηλητηριώδεις δράσεις (π.χ. λίπος), με ένα άλλο συστατικό του οποίου οι ευεργετικές επιδράσεις έχουν αποδειχθεί (π.χ. η chicory ινουλίνη).

4. Βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των τροφικών συστατικών των οποίων έχουν καθοριστεί οι ευεργετικές επιδράσεις (Roberfroid, 1999).

1.3 Υδατάνθρακες ως πρεβιοτικές ίνες – λειτουργικά τρόφιμα

Πολλοί υδατάνθρακες θεωρούνται ότι έχουν πρεβιοτική δράση. Μερικοί από αυτούς είναι οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), γαλακτοολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη, τα οποία ευνοούν την αύξηση των μπιφοδοβακτηρίων, η ινουλίνη, οι πηκτίνες, οι β-γλουκάνες, οι ισομαλτο-ολιγοσακχαρίτες (IMO) (Gibson et al., 1999; Mandalari et al., 2007).

Ανάμεσα στις διάφορες λειτουργίες της ινουλίνης και της ολιγοφρουκτόζης, που θεωρούνται ως ενδεχόμενες λειτουργικές επιδράσεις, είναι οι γαστρεντερικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, αυτές που σχετίζονται με την ισορροπημένη μικροχλωρίδα στο παχύ έντερο, αυτές που μεσολαβούν στην ενδοκρινική δραστηριότητα αυτού του οργάνου, καθώς και αυτές που στηρίζονται στην ανοσολογική του δραστηριότητα, στον έλεγχο βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών (κυρίως των ιόντων) ή στον έλεγχο της παραγωγής κοπράνων, του χρόνου διέλευσης και της εντερικής κινητικότητας. Επίσης, μία άλλη λειτουργία τους είναι η ορμονική ρύθμιση, μέσω της ισορροπίας ινουλίνης/ γλυκαγόννης ή της παραγωγής γαστρεντερικών πεπτιδίων, ή μέσω του μεταβολισμού των μακροσυστατικών (ειδικά των υδρογονανθράκων και των λιπαρών οξέων), με αποτέλεσμα μειωμένο κίνδυνο για σύνδρομο Χ και για καρδιαγγειακές νόσους. Ένα παράδειγμα είναι η μείωση της ηπατικής λιπογένεσης που προκαλείται από τις φρουκτάνες τύπου chicory (Roberfroid, 1999).

Ήδη υπάρχουν λειτουργικές απαιτήσεις και θα οδηγήσουν στο μέλλον σε καινούργιες αρχές στη διατροφή. Παραδείγματα αυτών των αρχών είναι τα πρεβιοτικά και τα συμβιοτικά, τα τρόφιμα που επιδρούν στην εντερική μικροχλωρίδα και οι παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων (Roberfroid, 1999).

Οι πηκτίνες θεωρούνται ως διαλυτές διαιτητικές ίνες και ασκούν φυσιολογικές επιδράσεις στη γαστρεντερική οδό. Μερικές από τις δράσεις τους είναι η

καθυστέρηση της γαστρικής εκκένωσης, η μείωση του χρόνου διέλευσης και η μείωση της απορρόφησης της γλυκόζης. Οι επιδράσεις αυτές οφείλονται κυρίως στην ιδιότητά τους να μετασχηματίζονται σε gel και στην ικανότητά τους να συγκρατούν το νερό. Απομονωμένη πηκτίνη από κίτρο φαίνεται να έχει υποχοληστερολαιμική δράση σε ανθρώπους. Άλλες δράσεις της πηκτίνης είναι η αλληλεπίδρασή της με φάρμακα και με τον εντερικό μεταβολισμό των ιόντων (Olano-Martin et al., 2002).

Οι μη πεπτόμενοι ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν φρουκτόζη (ινουλίνη, ολιγοφρουκτόζη) ή γαλακτόζη (ολιγοσακχαρίτες από σόγια, γαλακτοολιγοσακχαρίτες) ζυμώνονται εκλεκτικά από τη μικροχλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου, οδηγώντας σε μια βακτηριακή σύνθεση, στην οποία επικρατούν τα μπιφιδοβακτήρια, που αποτελούν ένα γένος που προωθεί την υγεία. Άλλοι ολιγοσακχαρίτες που υπάρχουν στην Ιαπωνία, αλλά δεν επιτρέπεται η χρήση τους σε τρόφιμα στην Ευρώπη και στην Αμερική, είναι οι μαλτο-, ισομαλτο-, παλατινοζη-, ξυλο- και γεντιο-ολιγοσακχαρίτες. Όλα τα παραπάνω δεν έχουν παρουσιάσει αποδεδειγμένη πρεβιοτική ικανότητα, με τους ολιγοσακχαρίτες από φρουκτόζη και γαλακτόζη να αποτελούν αναγνωρισμένα πρεβιοτικά (Franck, 1999).

Οι β(1-2) φρουκτάνες, όπως η ινουλίνη και η ολιγοφρουκτόζη (ή φρουκτοολιγοσακχαρίτες) είναι μέχρι τώρα, τα καλύτερα μελετημένα πρεβιοτικά και αποτελούν συνηθισμένα συστατικά τροφίμων όπως, το πράσο, το κρεμμύδι, το σκόρδο, την αγκινάρα, το σπαράγγι, το σκουλί, τη μπανάνα και το σιτάρι. Η μέση κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο, σε μια συνηθισμένη δίαιτα, αξιολογείται σε μερικά γραμμάρια τη μέρα, και έχουν αναγνωριστεί ως διαιτητικές ίνες στις περισσότερες χώρες. Βιομηχανικά η ινουλίνη προέρχεται από εκχύλιση με καυτό νερό ριζών ραδικιού, που ακολουθείται από ραφινάρισμα και ξηρό ψέκασμα. Υψηλής περιεκτικότητας (>90%) ινουλίνη εμπορικά βρίσκεται με τη μορφή άσπρης σκόνης. Αντίστοιχα για την ολιγοφρουκτόζη, βιομηχανικά λαμβάνεται από μερική ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης χρησιμοποιώντας μια ειδική ενδοϊνουλάση. Επιπλέον, οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν και από τρανσφρουκτοζυλίωση της σουκρόζης. Τα εμπορικά

σκευάσματα ολιγοφρουκτόζης περιλαμβάνουν διάφορες περιεκτικότητες, με ανώτερη το 95%, και είναι σε μορφή άσπρης σκόνης και κολλώδων σιροπιών (Franck, 1999).

Όσον αφορά τους ολιγοσακχαρίτες από σόγια, αυτοί λαμβάνονται από απευθείας εκχύλιση και καθαρισμό από τον ορό γάλατος από σόγια, ένα παραπροϊόν της παραγωγής πρωτεϊνικής συμπύκνωσης της σόγιας. Η χημική τους δομή περιλαμβάνει 1 ή 2 μόρια γαλακτόζης (συνδεδεμένα μεταξύ τους με $\alpha(1-6)$ δεσμό) ενωμένα με ένα μόριο σουκρόζης (ραφινόζη και σταχυόζη). Στο εμπόριο κυκλοφορούν σε μορφή σιροπιού που περιέχει 6% ραφινόζη και 18% σταχυόζη, όπως επίσης και σουκρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη (52%) (Franck, 1999).

Μερικά συστατικά γαλακτοολιγοσακχαριτών έχει αναφερθεί ότι βρίσκονται φυσιολογικά στο ανθρώπινο γάλα σε ποσότητα περίπου 3mg/L. Βιομηχανικά τρανσγαλακτοζυλιωμένοι ολιγοσακχαρίτες παράγονται από τη σύνθεση της λακτόζης, χρησιμοποιώντας μία β -γαλακτοζιδάση. Έχουν γενική χημική δομή $G-Gal_n$ (με G =γλυκοζυλικό τμήμα, Gal =γαλακτοζυλικό τμήμα και n = ο αριθμός μορίων γαλακτόζης που συνδέονται μαζί). Ο βαθμός πολυμερισμού κυμαίνεται από 2 σε 8, με μέση τιμή το 3. Μερικές από τις αλυσίδες διακλαδίζονται και τα γαλακτοζυλικά τμήματα κυρίως συνδέονται μεταξύ τους μέσω $\beta(1-6)$ και/ή $\beta(1-4)$ δεσμούς (Franck, 1999).

Οι απαιτούμενες διατροφικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν κάποιον υδατάνθρακα ως πρεβιοτικό, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Franck, 1999).

Πίνακας 2 Απαιτούμενες διατροφικές ιδιότητες πρεβιοτικών

Πρεβιοτικές επιδράσεις: ρύθμιση της εντερικής μικροχλωρίδας, προώθηση των ευεργετικών βακτηρίων (π.χ. μπιφιδοβακτηρίων) και καταστολή των βλαβερών ομάδων (π.χ. κλοστρίδια)
Μη δυνατότητα πέψης και χαμηλή θερμιδική αξία (1-2 kcal/g)
Κατάλληλα για διαβητικούς
Διαλυτές διαιτητικές ίνες
Διογκωτική επίδραση στα κόπρανα: αύξηση του βάρους των κοπράνων και της συχνότητας αφόδευσης
Βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας του ασβεστίου
Μείωση των επιπέδων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στον ορό
Προστασία από καρκίνο του παχέος εντέρου

1.3.1 Β-γλουκάνη

Η β-γλουκάνη είναι ένα σύνθετο ομοπολυμερές της γλυκόζης, το οποίο βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών, των μυκήτων και δημητριακών φυτών, όπως η βρώμη, το κριθάρι και στα λεγόμενα φαρμακευτικά μανιτάρια, όπως το *Phellinus linteus* ή το *Sparassis crispa*. (Jung et al., 2007; Kim et al., 2006). Μερικές πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η β-γλουκάνη έχει αποκλίνουσες επιδράσεις, όπως η αναστολή της επέκτασης των όγκων, η παραγωγή νιτρικού οξέος, η αύξηση της αιματοποίησης και επαγωγή της απελευθέρωσης μακροφάγων από παράγοντες που ελευθερώνονται στο τραύμα για προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές επιδράσεις της β-γλουκάνης στο ανοσοποιητικό σύστημα και η έλλειψη παρενεργειών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για τη χρήση της. Πρόσφατα βρέθηκε ότι είναι ένας ισχυρός τροποποιητής της ανοσοποιητικής απόκρισης (Jung et al., 2007).

Η β-γλουκάνη είναι ο τύπος φυτικών ινών που χαρακτηρίζονται ως μη εύπεπτοι φυτικοί υδατάνθρακες και έχει εκτιμηθεί σύμφωνα με την ποικιλία των δράσεών της. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι διαμορφωτικές επιδράσεις στο ανοσοποιητικό, οι αντικαρκινικές της ιδιότητες, η ικανότητά της να μειώνει τα επίπεδα των λιπιδίων και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, καθώς και η μείωση ή διατήρηση του σωματικού βάρους. Για τη διατήρηση του σωματικού βάρους

ευθύνεται το αίσθημα πληρότητας που προκαλείται από τις διαιτητικές ίνες, μέσω της καθυστερημένης γαστρικής εκκένωσης του λεπτού εντέρου. Η καθυστερημένη γαστρική εκκένωση μπορεί επίσης να μειώσει τα επίπεδα της μεταγευματικής γλυκόζης, συμβάλλοντας έτσι σε μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία (Kim et al., 2006; Queenan et al., 2007).

Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση, μια ημερήσια πρόσληψη της τάξης των 2-10g από διαλυτές στο νερό φυτικές ίνες, όπως η βρώμη από πίτουρο, οι πηκτίνες, το psyllium και κόλλα από γκουάρ (guar gum), μειώνει τα επίπεδα της ολικής και της LDL χοληστερόλης κατά ένα μικρό, αλλά σημαντικό ποσό (μείωση κατά 2mg/dl για 1g κυτταρίνης), αλλά δεν επηρεάζει την HDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια (Kim et al., 2006).

Σε διάφορα κλινικά και in vitro πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ουσίες, όπως το sizofiran (SPG, *Schizophyllum commune* ένα απόσταγμα β-1, 3 γλουκάνης), το Lentinan (*Lentinus edodes*, απόσταγμα β-1, 3 γλουκάνης) και PGG-glucan (poly-[1,6]-β-D-glucopyranosyl-1,3-β-D-glucopyranose) και οι οποίες αποδείχθηκε ότι προωθούν την έκκριση κυτοκινών, όπως των TNF- α και IL-1-β. Οι κυτοκίνες δεσμεύονται από τους υποδοχείς της β-γλουκάνης των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων, τα οποία αποτελούν μέρος της μη ειδικής ανοσοποιητικής απόκρισης. Επιπλέον, οι παραπάνω ουσίες αναστέλλουν την έκκριση του ανιόντος του υπερ-υπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τέλος, αυξάνουν τη δραστηριότητα των φυσικών φονικών κυττάρων και των φονικών κυττάρων που ενεργοποιούνται από τις λεμφοκίνες (LAK), τα οποία συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές δράσεις των παρασκευασμάτων αυτών (Kim et al., 2006).

Η ποικιλομορφία των επιδράσεων μπορεί να είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών προσλήψεων της β-γλουκάνης. Για παράδειγμα η ελάχιστη αποτελεσματική δόση των 3g τη μέρα, μπορεί να μην είναι ικανή να αποφέρει σημαντικά αποτελέσματα. Έτσι, από μία έρευνα του Lovegrove et al. σε 62 ασθενείς με μέτρια υπερχοληστερολαιμία, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της χοληστερόλης με μια πρόσληψη 20g βρώμης από πίτουρο, που περιείχε 3g β-γλουκάνης, για 8 εβδομάδες. Αντίθετα, μια άλλη έρευνα του

Karmally et al. ανέφερε ότι τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης μειώθηκαν σημαντικά, όταν 152 Ισπανοί έλαβαν είτε δημητριακά από βρώμη (3g β-γλουκάνης) ή από καλαμπόκι για έξι εβδομάδες. Το γεγονός αυτό, αποδεικνύει ότι η πρόσληψη από μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει τον βαθμό στον οποίο η β-γλουκάνη είναι αποτελεσματική στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης (Kim et al., 2006).

Από έρευνες έχει αποδειχθεί ότι το μέσο με το οποίο λαμβάνεται η β-γλουκάνη επηρεάζει την ευεργετική της επίδραση στη μείωση της χοληστερόλης. Σε έρευνα των Kerckhoffs et al. που έγινε σε 48 μέτρια υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, η β-γλουκάνη δόθηκε με μορφή μπισκότων και ψωμιού που περιείχαν 5,9g β-γλουκάνης ή σταρένιο ψωμί και μπισκότα, τα οποία περιείχαν μόνο διαιτητικές ίνες. Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο διαφορετικών προσεγγίσεων, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης. Αντίθετα, όταν η ίδια ποσότητα β-γλουκάνης δόθηκε με μορφή χυμού, στο ίδιο δείγμα, τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης μειώθηκαν σημαντικά. Το αποτέλεσμα αυτό, αποδόθηκε στη διαφορετική σύσταση του φαγητού και στην διαδικασία παρασκευής. Παρόλα αυτά, άλλες έρευνες στις οποίες η β-γλουκάνη δόθηκε με μορφή ψωμιού έδειξαν την ευεργετική της επίδραση στα επίπεδα της χοληστερόλης (Kim et al., 2006).

Έχει επίσης αναφερθεί, ότι το μοριακό μέγεθος της β-γλουκάνης μπορεί να επηρεάζει τις δράσεις της. Εάν το μοριακό μέγεθός της είναι μικρό, το ιξώδες μειώνεται και συνεπώς μειώνεται η αποτελεσματικότητά της. Στην έρευνα των Braaten et al. χρησιμοποιήθηκε β-γλουκάνη με μοριακό βάρος 1.200.000 και ήταν αποτελεσματική στη μείωση της χοληστερόλης και έτσι προτάθηκε αυτό ως το ιδανικό μοριακό μέγεθός της. Ωστόσο, στην έρευνα των Kerckhoffs et al., η β-γλουκάνη είχε μοριακό βάρος λιγότερο από 100.00 και ήταν αποτελεσματική (Kim et al., 2006).

Αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σχετικά με την δόσοεξαρτώμενη επίδραση της β-γλουκάνης. Σε μία μετα-ανάλυση των Ripsin et al. αναφέρθηκε μία μη γραμμική δόσο-εξαρτώμενη σχέση σε όλες τις φυτικές ίνες, συμπεριλαμβανομένου της βρώμης. Έτσι, τα 10g και τα 8g διαιτητικών ινών,

ορίστηκαν ως η ελάχιστη ποσότητα που επιφέρει σημαντική μείωση στην ολική και στην LDL χοληστερόλη, αντίστοιχα (Kim et al., 2006).

Πολλές έρευνες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της κατανάλωσης διαιτητικών ινών και του διαβήτη. Σε περίπτωση που διαβητικοί ασθενείς αυξήσουν την πρόσληψή τους σε διαιτητικές ίνες, η απορρόφηση της γλυκόζης καθυστερεί και η συγκέντρωση της ινσουλίνης μειώνεται. Οι περισσότερες έρευνες που είχαν αυτό το σκοπό, έγιναν σε διαβητικούς ασθενείς, χρησιμοποίησαν β-γλουκάνη από κριθάρι και βρώμη και είχαν ευεργετικά αποτελέσματα. Οι Tapola et al. χορήγησαν βρώμη, αλεύρι από σιτάρι και γλυκόζη, σε 12 διαβητικούς ασθενείς και σύγκριναν τις καμπύλες γλυκόζης αυτών. Η ομάδα που έλαβε βρώμη είχε χαμηλότερη καμπύλη μεταγευματικής γλυκόζης. Επίσης, μια έρευνα που έδειξε βελτίωση στα επίπεδα του HbA1C, έγινε από τον Reyna et al. με τη χρήση μιας συνιστώμενης δίαιτας από τον American Diabetes Association για καλά ρυθμισμένους διαβητικούς τύπου 2. Η δίαιτα αυτή ήταν χαμηλή σε θερμίδες και περιείχε β-γλουκάνη. Η ομάδα που έλαβε τη β-γλουκάνη μείωσε τα επίπεδα του δείκτη που προαναφέρθηκε. Από όλα τα παραπάνω, έχει προταθεί ότι η β-γλουκάνη από βρώμη έχει θετικές επιδράσεις στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, στον HbA1C και στην ινσουλίνη και μιας τέτοια μορφής δίαιτα συνίσταται σε διαβητικούς ασθενείς (Kim et al., 2006).

Μια *in vitro* έρευνα που έγινε στην Κορέα χρησιμοποίησε 1,3-β-D-γλουκάνη με μοριακό βάρος 300.000, προκειμένου να ελέγξει την επίδρασή της στην παραγωγή του Παράγοντα Νέκρωσης Κυττάρων (TNF-α) στα BV2 μικρογλιακά κύτταρα. Η β-γλουκάνη απομονώθηκε από στέλεχος του βακτηρίου *Agrobacterium* sp. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και BV2 μικρογλιακά κύτταρα συμπληρωμένα με 10% εμβρυϊκό αγελαδινό ορό, 2mM L-γλουταμίνη, στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη. Τα BV2 μικρογλιακά κύτταρα επεξεργάστηκαν με β-γλουκάνη σε συγκεντρώσεις 1,5,10 και 50μg/ml, αφού προηγουμένως τα κύτταρα αυτά είχαν προεπεξεργαστεί με 5 ή 50μg/ml β-γλουκάνης. Με την ενζυματική μέθοδο ELISA ερευνήθηκε η παραγωγή του TNF-α. Η ανασταλτική επίδραση της β-γλουκάνης στην παραγωγή του TNF-α ήταν

δοσοεξαρτώμενη, αν και ήταν μεγαλύτερη σε συγκέντρωση β-γλουκάνης 50μg/ml. Οι LPS επηρέασαν την πρωτεϊνική έκφραση του TNF-α εξαιτίας της προετοιμασίας του με β-γλουκάνη, γεγονός που οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του TNF-α και στα 5 και 50μg/ml. Έχει αναφερθεί ότι η δράση της β-γλουκάνης πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης των δενδρίτων, των ενδοθηλιακών, των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων. Επίσης η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των Κυττάρων φονιάδων (NK) παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση της. Επιπλέον, η β-γλουκάνη εμπλουτίζει τη δράση των μακροφάγων, αυξάνοντας τους υποδοχείς της σε αυτά. Πρόσφατα έχει βρεθεί μια αντιοξειδωτική δράση της απέναντι στις ρίζες ενεργού οξυγόνου και στην παρεμπόδιση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Ωστόσο, λίγα είναι κατανοητά για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της. Τέλος, ο Nokagawa et al. ανέφερε ότι η β-γλουκάνη από *Candida albicans* παρεμποδίζει την παραγωγή κυτοκινών IL-2 και IFN-γ σε ανθρώπινα μονοκύτταρα (Jung et al., 2007).

Οι β-γλουκάνες βρίσκονται σε κόκκους δημητριακών, εντοπισμένες κυρίως στα ενδοσπερματικά κυτταρικά τοιχώματα και στο κριθάρι και στη βρώμη, και εμπλέκονται δραστικά στο μεταβολισμό των προϊόντων της βρώμης. Μακροπρόθεσμες διατροφικές μελέτες που ενσωμάτωσαν β-γλουκάνη, έδειξαν ελάττωση της χοληστερόλης πλάσματος σε υπερχοληστερολαιμικούς άνδρες. Μια δίαιτα χαμηλή σε κορεσμένο λίπος και υψηλή σε πολυσακχαρίτες με υψηλό ιξώδες, συμπεριλαμβανομένου της β-γλουκάνης, είχε ως αποτέλεσμα μια μείωση της τάξης του 7,5% της χοληστερόλης ορού σε υπερλιπιδαιμικούς άνδρες. Πρόσφατα αποτελέσματα από παρεμβατική μελέτη που εξέταζε διάφορους παράγοντες κινδύνου (Multiple Risk Factor Intervention Trial), έδειξαν ότι η αύξηση πρόσληψης διαιτητικών ινών σε μια μετρίου λίπους δίαιτα, εξασφαλίζει τη μείωση στο αίμα και της ολικής και της LDL χοληστερόλης. Μεταγευματικές μελέτες που μέτρησαν την τριακυλογλυκερόλη του πλάσματος, μετά από γεύμα, ανέφεραν ότι η αύξηση φυτικών ινών είτε αύξησε την τριακυλογλυκερόλη, είτε την μείωσε, είτε δεν είχε καμία επίδραση. Η μεταγευματική χοληστερόλη φαίνεται να παραμένει αμετάβλητη ή να μειώνεται ελάχιστα μετά από γεύμα υψηλό σε φυτικές ίνες. Πηγές πολυσακχαριτών με υψηλό ιξώδες καθυστέρησαν την πέψη

και την απορρόφηση του λίπους, με αποτέλεσμα την αλλαγή της συγκέντρωσης λιοπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια (TRLs), είτε μεταβάλλοντας το βαθμό και το μέγεθος της εμφάνισης τους στο πλάσμα, είτε μεταβάλλοντας τη σύνθεσή τους μετά από γεύμα. Οι προαναφερθείσες επιδράσεις μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αναίρεση της μεταφοράς της χοληστερόλης, η οποία διεγείρεται κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής περιόδου και μπορεί να συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερόλης πλάσματος που προκαλούν αυτοί οι πολυσακχαρίτες (Bourdon et al., 1999)

1.3.1.1 Β- Γλουκάνη από κριθάρι

Τα τελευταία χρόνια, η Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων Αμερικής (US Food and Drug Administration) υποστήριξε τη συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης πρόσληψης διαλυτών ινών και της μείωσης της ολικής χοληστερόλης ορού, επικυρώνοντας τους ισχυρισμούς ότι οι ίνες από βρώμη βοηθούν την υγεία. Το ενεργό συστατικό στη βρώμη έχει αποδειχθεί ως μία γραμμική mixed-link (1→3)(1→4)-β-D-γλουκάνη, η οποία μειώνει την ολική χοληστερόλη ορού κατά 5-10% και βρίσκεται σε περιεκτικότητα περίπου 4% κατά βάρος. Β-γλουκάνη με (1→3) και (1→4) δεσμούς έχει και το κριθάρι σε ποσοστό 5-10% οπότε αναμένεται να έχει παρόμοιες δράσεις μείωσης της χοληστερόλης (Queenan et al., 2007; Keogh et al., 2003).

Επιπλέον, επιδημιολογικές καθώς και μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους και ζώα, έδειξαν ότι διατροφή πλούσια σε διαλυτές φυτικές ίνες βελτιώνει επίσης και τον έλεγχο της γλυκόζης και της ινσουλίνης, και απομακρύνει τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 (Keogh et al., 2003).

Το υψηλό ιξώδες της β-γλουκάνης μπορεί να έχει μια ιδιαίτερη επίδραση στη μείωση της μεταγευματικής γλυκαιμίας και μάλιστα αρκετές μελέτες έδειξαν ότι προϊόντα από κριθάρι και βρώμη σημείωσαν σημαντική μείωση στην γλυκαιμική απάντηση (Keogh et al., 2003).

Έχει αναφερθεί γενικότερα ότι το απόσταγμα από κριθάρι έχει θετικές επιδράσεις στα επίπεδα των λιπιδίων, μειώνοντας την ολική χοληστερόλη. Έτσι, σε έρευνα

των McIntosh et al. που έγινε σε 21 ασθενείς με ελαφριάς μορφής υπερχοληστερολαιμία, δόθηκαν 8g β-γλουκάνης, μέσω δίαιτας με κριθάρι, για τέσσερις εβδομάδες. Παρατηρήθηκε μείωση στην ολική και στην LDL χοληστερόλη, της τάξης των 6% και 7%, αντίστοιχα, συγκριτικά με αυτούς που έλαβαν την ίδια ποσότητα σιταριού. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η έρευνα των Keogh et al. χώρισε 18 ασθενείς με μέτρια υπερλιπιδαιμία σε 2 ομάδες. Στη μία ομάδα χορηγήθηκε εκχύλισμα β-γλουκάνης (8.1-11.9 g τη μέρα) από κριθάρι και στην άλλη γλυκόζη (6.5-9.2 g), ισάξια σε θερμίδες, για τέσσερις εβδομάδες. Δε σημειώθηκε καμία σημαντική διαφορά στα επίπεδα της χοληστερόλης (Kim et al., 2006).

1.3.1.2 Β-γλουκάνη από βρώμη

Φυτικές ίνες δημητριακών που είναι υψηλά διαλυτές στο νερό, όπως η β-γλουκάνη μπορεί να βελτιώνουν καρδιαγγειακές ασθένειες (CVD), μέσω βελτιώσεων στις τιμές χοληστερόλης ορού και σε άλλους σχετικούς παράγοντες κινδύνου. Η βρώμη έχει υψηλά διαλυτές φυτικές ίνες και φαίνεται να μειώνει αυτούς τους CVD παράγοντες, όταν καταναλώνεται σαν μέρος μίας μετρίου λίπους, ισορροπημένης διατροφής. Το δραστικό συστατικό της βρώμης που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της χοληστερόλης, είναι η β-γλουκάνη. Η τελευταία, όπως άλλωστε και οι υπόλοιπες διαιτητικές ίνες με μεγάλο ιξώδες, εμπλέκονται στην απορρόφηση του διαιτητικού λίπους και χοληστερόλης, ενώ παράλληλα παρεμβαίνουν και στην εντεροηπατική κυκλοφορία της χοληστερόλης και των χολικών οξέων. Έτσι η μείωση της ολικής χοληστερόλης προκύπτει από την μειωμένη απορρόφηση των λιπιδίων από τα χολικά οξέα. Το γεγονός αυτό προκαλεί απομάκρυνση των στεροειδών από το σώμα, μέσω των κοπράνων και έτσι παρατηρείται αύξηση του καταβολισμού της χοληστερόλης, αύξηση της έκκρισης των χολικών οξέων, μείωση της έκκρισης των λιποπρωτεϊνών και τελικά μείωση της αποθηκευμένης χοληστερόλης στο σώμα (Queenan et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί μείωσης της χοληστερόλης από διαιτητικές ίνες, όπως η δέσμευσή τους από τη χολή, η επίδρασή τους στο ιξώδες

του λεπτού εντέρου, η αναστολή της απορρόφησης της γλυκόζης και η αύξηση της παραγωγής των μικρής αλύσου λιπαρών οξέων (SCFA) (Kim et al., 2006). Η β-γλουκάνη από βρώμη είναι ένα φυσικό πολυμερές το οποίο αποτελείται από ξεχωριστά μόρια γλυκόζης, συνδεδεμένα μεταξύ τους με μια σειρά από β-(1–3) και β-(1–4) δεσμούς. Η β-γλουκάνη ταυτοποιήθηκε ως το κύριο ζυμώσιμο συστατικό και σε μαγειρεμένη και σε ωμή βρώμη, αφού το μαγείρεμα δεν την επηρεάζει. Ρολά βρώμης (Rolled oats) και απομονωμένη β-γλουκάνη (γνωστή ως oat gum) συμβάλλουν στην αύξηση στο κολλώδες στο έντερο σε αρσενικά Wistar ποντίκια (Queenan et al., 2007).

1.3.2 Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS)

Οι Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) είναι ολιγομερή του μορίου της φρουκτόζης, με γενική δομή α-D-Glu-(1-2)-[β-D-Fru-1-2-]_n όπου η κυμαίνεται από 2 έως 4. Δεν πέπτονται από τον ξενιστή και έτσι φτάνουν στο κόλον ανέπαφοι, όπου και δρουν ως πρεβιοτικά, αφού μεταβολίζονται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς όπως τα μπιφιδοβακτήρια και οι λακτοβάκιλλοι (Palframan et al., 2002).

Σε μια *in vitro* έρευνα που έγινε στην Αγγλία, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κοπράνων από τρεις εθελοντές (ένας άντρας και δύο γυναίκες), μέσης ηλικίας 32,7 ετών, ως εμβόλια εντερικής μικροχλωρίδας για την μελέτη της ζύμωσης των φρουκτοολιγοσακχαριτών. Οι εθελοντές ήταν υγιείς, δεν έλαβαν αντιβιοτικό τους προηγούμενους τρεις μήνες από την δειγματοληψία και δεν είχαν ιστορικό γαστρεντερικών διαταραχών. Στην παραπάνω έρευνα το βασικό υπόστρωμα αναμίχθηκε είτε με το Novasoy™, είτε με 10g γλυκόζης, είτε με φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS). Έγινε καταμέτρηση 8 διαφορετικών μικροβιακών πληθυσμών από την εντερική μικροχλωρίδα σε χρόνους 0h, 6h, και 24h μετά τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων και συγχρόνως έγινε στα ίδια δείγματα HPLC ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των ολικών αναερόβιων βακτηρίων αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά, όπως επίσης και ο αριθμός των *Bifidobacterium* spp. και *Lactobacillus* spp. που ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος με την παρουσία των φρουκτοολιγοσακχαριτών και σε

σταθερές συνθήκες. Παρόλα αυτά ο αριθμός των *Bacteroides* spp. και των *Clostridium* spp. παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλα τα υποστρώματα συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις (Steer et al., 2003).

Σε μια επιπρόσθετη *in vitro* μελέτη, στην Αγγλία, φάνηκε ο γνωστός χαρακτήρας των φρουκτοολιγοσακχαριτών να προκαλούν αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων, κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 ωρών της καλλιέργειας, και της παράλληλης μείωσης των λιγότερων επιθυμητών βακτηρίων, όπως των *bacteroides* και των κλοστρίδιων. Ο λόγος που καθιστά τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες ως το προτιμητέο υπόστρωμα για τα περισσότερα είδη μπιφιδοβακτηρίων, συγκριτικά με τη γλυκόζη, την ινουλίνη και τους διακλαδισμένους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, είναι η επίδραση του βαθμού του πολυμερισμού στο β -2 $\rightarrow$ 1 της φρουκτάνης, πάνω στις δραστηριότητες της ινουλινάσης (Olano-Martin et al., 2000).

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι μια οικογένεια oligομερών φρουκτόζης που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο σε τρόφιμα ή σε συμπληρώματα διατροφής και είτε συνθέτονται από σουκρόζη, μέσω φρουκτοσυλτρανσφερασών απομονωμένες από τον *Aspergillus niger* (μικρής αλύσου φρουκτοολιγοσακχαρίτες, scFOS), είτε παραλαμβάνονται με εκχύλιση των ριζών του ραδικιού (*Cichoricum intybus*), μετά από μερική ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης (φρουκτοολιγοσακχαρίτες, FOS). Το μήκος τους ποικίλλει και μπορεί να είναι είτε παράγωγα απλής φρουκτόζης πολυμερισμένα, ή τμήματα φρουκτόζης συνδεδεμένα με ένα μόριο σουκρόζης (Saulnier et al., 2007 & Barrangou et al., 2003). Η μέση ημερήσια πρόσληψη αυτών των συστατικών προέρχεται κυρίως από το σιτάρι, το κρεμμύδι, το βερίκοκο, τη μπανάνα και το σπαράγγι. Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες δεν υφίστανται πέψη στον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά πέπτονται από μια ποικιλία βακτηρίων γαλακτικού οξέος, που αποικούν στον κατώτερο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Barrangou et al., 2003).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί με *in vivo* μελέτες η ευεργετική ρύθμιση στην σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας και συγκεκριμένα, η αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων και των λακτοβακίλλων. Μια ποικιλία ειδών από *Lactobacillus acidophilus* έχει δειχθεί ότι χρησιμοποιούν ορισμένους πολυσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες

όπως την αραβινογαλακτάνη, την αραβινοξυλάνη και τους φρουκτοολιγосακχαρίτες. Παρόλο που υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την χρησιμοποίηση των φρουκτοολιγосακχαριτών, λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τα μεταβολικά μονοπάτια και για τα ένζυμα που μεταφέρουν και καταβολίζουν αυτούς τους σύνθετους υδατάνθρακες στους λακτοβάκιλλους (Barrangou et al., 2003).

Όμως, μια πρόσφατη έρευνα ανέφερε την παρουσία μιας φρουκτοφουρανοσιδάσης που είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των φρουκτοολιγосακχαριτών στον *L.acidophilus* και κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο. Το οπερόνιο αυτό περιέχει ένα γονίδιο φρουκτοφουρανοσιδάσης που σχετίζεται με τα γονίδια του συστήματος μεταφοράς ATPbinding cassette (ABC). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ο *L.acidophilus* είναι ικανός να χρησιμοποιήσει και τους μικρής αλύσου φρουκτοολιγосακχαρίτες και τους φρουκτοολιγосακχαρίτες. Παρομοίως ένα σύστημα μεταφοράς εξαρτώμενο από ATP εμπλέκεται στη χρήση των φρουκτοολιγосακχαριτών από τον *L. paracasei* (Saulnier et al., 2007).

Στην έρευνα των Bouhnik et al. 20 υγιείς εθελοντές έλαβαν 12,5g/ μέρα φρουκτοολιγосακχαρίτες. Σε πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη που αναφέρεται σε αυτή την ομάδα, έδειξε ότι απαιτούνται πάνω από 5g φρουκτοολιγосακχαρίτες για να αυξηθεί ο αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων στους ανθρώπους. Η σακχαρόζη χρησιμοποιήθηκε ως placebo στην ομάδα ελέγχου. Η κατανάλωση λοιπόν, των φρουκτοολιγосακχαριτών οδήγησε στην αύξηση του αριθμού των μπιφιδοβακτηρίων στα κόπρανα μέσα σε 12 ημέρες κατανάλωσης. Παρόλα αυτά, η δίαιτα δεν επηρέασε σημαντικά τους παράγοντες που καθορίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, όπως τα ολικά αναερόβια βακτήρια, το pH, τη δραστηριότητα της νιτρορεδοукτάσης, της αζορεδοукτάσης, της β-γλυκουρονιδάσης, των χολικών οξέων και των ουδέτερων στερολών (Brady et al., 2000).

1.3.3 Ινουλίνη

Η ινουλίνη είναι πολυμερές του μορίου της φρουκτόζης, με γενική δομή α -D-Glu-(1-2)-[β -D-Fru-1-2-] $_n$ όπου ο βαθμός πολυμερισμού (n) κυμαίνεται από 2 έως 60. Η ινουλίνη όμοια με τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες δεν πέπτει από τον ξενιστή και έτσι φτάνει στο κόλον ανέπαφη, όπου και δρα ως πρεβιοτικό. Μεταβολίζεται εκλεκτικά από μικροοργανισμούς όπως τα μπιφιδοβακτήρια και οι λακτοβάκιλλοι (Palframan et al., 2002). Οι γραμμικές αλυσίδες της ινουλίνης είναι είτε α -D-γλυκοπυρανοσίλη-[β -D-φρουκτοφουρανοσίλη] $_{n-1}$ - β -D-φρουκτοφουρανοσίδη ($G_{py}F_n$) ή μία β -D-φρουκτοπυρανοσίλη-[β -D-φρουκτοφουρανοσίλη] $_{n-1}$ - β -D-φρουκτοφουρανοσίδη ($F_{py}F_n$) (Roberfroid, 2007 & Barrangou et al., 2003). Η ινουλίνη τύπου Chicory (ραδίκι) συντίθεται από ένα μίγμα όλιγο- και πολύ-μερών στα οποία ο βαθμός του πολυμερισμού (DP) ποικίλλει από 2 έως 60 μονάδες ($DP_{av}=12$) και κατά 99% αποτελείται από τον $G_{py}F_n$ τύπο. Η μερική ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης, η οποία πραγματοποιείται από μία ενδονουκλεάση (EC 3.2.1.7), παράγει ολιγοφρουκτόζη. Η ολιγοφρουκτόζη είναι ένα μίγμα των $G_{py}F_n$ και $F_{py}F_n$ και μπορεί να προσληφθεί με ενζυμική σύνθεση (trans-φρουκτοσιλίδωση- transfructosylation), κάνοντας χρήση του ενζύμου β -φρουκτοσιδάση από τον *Aspergillus niger*. Η υδρολυμένη αυτή μορφή της ινουλίνης βρίσκεται σε φυτά όπως, η μπανάνα, το σκόρδο, το κρεμμύδι, τα σπαράγγια, το σιτάρι, το ραδίκι, το πράσο, το σκουλί κ.α. (Menne et al., 2000; Roberfroid, 2007). Εφαρμόζοντας ειδικές διαχωριστικές μεθόδους, η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να παράγει μακράς αλυσίδας ινουλίνη, γνώστή ως ινουλίνη HP. Τέλος, με την ανάμιξη ολιγοφρουκτόζης και ινουλίνης HP προκύπτουν ειδικά προϊόντα γνωστά ως συνεργιστική ολιγοφρουκτόζη (Roberfroid, 2007).

Μια διατροφική παρέμβαση με σκοπό τη βελτίωση της μικροχλωρίδας των κοπράνων, τροφοδοτώντας την με υποστρώματα που επιτρέπουν τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό αυτών των βακτηρίων της μόνιμης μικροχλωρίδας, δηλαδή μια πρεβιοτική προσέγγιση, προτείνεται και επικυρώνεται από διάφορες μελέτες σε ανθρώπους, οι οποίες χρησιμοποιούν διάφορους μη εύπεπτους ολιγοσακχαρίτες. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι κατανάλωση ινουλίνης τύπου chicory ή του προϊόντος της από μερική υδρόλυση (ολιγοφρουκτόζη), ένα μίγμα

από $\beta(2\rightarrow1)$ δεσμούς τύπου $G_{py}F_n$ [of $b(2\rightarrow1)$ bound GFn-type (glucosyl-[fructosyl]-n-1-fructose)] και από $\beta(2\rightarrow1)$ δεσμούς τύπου $F_{py}F_n$, διαμορφώνει σημαντικά την σύνθεση της μικροχλωρίδας των κοπράνων του ανθρώπου, με τέτοιο τρόπο ώστε τα μπιφιδοβακτήρια να κυριαρχήσουν αριθμητικά (Menne et al., 2000).

Ως συστατικό τροφίμων, μπορεί να υπάρχει ως έμφυτη ινουλίνη, ως υψηλού μοριακού βάρους ινουλίνη, ως προϊόν ζύμωσης υδρολυμένη ινουλίνη ή ως ολιγοφρουκτόζη και συναντάται σε διάφορα φυτά όπως το σκόρδο, το κρεμμύδι, το σπαράγγι, το ραδίκι, η αγκινάρα, η μπανάνα, αλλιώς μπορεί να παραχθεί ενζυματικά από σουκρόζη (Gibson et al., 1999).

Σε μια *in vitro* έρευνα που έγινε στην Αγγλία, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κοπράνων από τρεις ενήλικες εθελοντές (μία γυναίκα, δύο άντρες), ηλικίας μεταξύ 20 και 45 ετών. Οι εθελοντές δεν είχαν ιστορικό γαστρεντερικών διαταραχών και είχαν αποφύγει την πρόσληψη πρεβιοτικών, προβιοτικών και αντιβιοτικών για τρεις μήνες πριν τη μελέτη. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε πιθανά πρεβιοτικά μεταξύ των οποίων η ινουλίνη και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες. Η παραλαβή του δείγματος έγινε αμέσως μετά τον εμβολιασμό και έγινε προετοιμασία του, για την απαρίθμηση των κυρίαρχων βακτηριακών γενών με τη μέθοδο FISH. Τέλος, τα δείγματα ελέγχθηκαν μετά από 8 και 24 ώρες (Palframan et al., 2002).

Στην παραπάνω έρευνα, παρατηρήθηκε μια γενικότερη αύξηση του αριθμού των ολικών βακτηρίων, ιδιαίτερα στα μπιφιδοβακτήρια και στα κλοστρίδια (*perfringens/histolyticum sub. grp.*) σε όλους τους υδατάνθρακες και σε όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα με τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες σημειώθηκε μεγαλύτερη αύξηση του πληθυσμού των μπιφιδοβακτηρίων σε pH 6,8 και σε δόση υποστρώματος 1%(w/v) ενώ ο αριθμός των *bacteroides* μειώθηκε, γεγονός που το αναδεικνύει ως το καλύτερο πρεβιοτικό. Παρομοίως η ινουλίνη εμφάνισε μέγιστη πρεβιοτική δράση σε pH 6,8 και σε δόση 1%(w/v). Αν και υπό αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, υπήρξε μείωση των *bacteroides* και των

κλωστριδίων (*perfringens/histolyticum sub. grp.*), γεγονός που τις καθιστά και αυτές ευνοϊκές (Palframan et al., 2002).

Η ινουλίνη και η ολιγοφρουκτόζη εξισορροπούν τις μεταβολικές δραστηριότητες (π.χ. ομοιόσταση λιπιδίων), δυναμώνουν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος (διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος), αποκαθιστούν και σταθεροποιούν την μικροχλωρίδα στο κόλον (π.χ. εκλεκτική αύξηση μπιφιδοβακτηρίων) και βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και κυρίως του ασβεστίου. Όπως προαναφέρθηκε, οι παραπάνω ουσίες επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων. Πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ολιγοφρουκτόζη αναστέλλει την ηπατική λιπογένεση και συνεπώς, προκαλεί μια σημαντική υποτριγλυκεριδαιμική δράση. Λόγω της πρόσφατα αποδεδειγμένης, μεταβολικής σύνδεσης ανάμεσα στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στους σχετικούς παράγοντες κινδύνους για αθηροσκληρωτικές καρδιαγγειακές νόσους, και λόγω της υπερτριγλυκεριδαιμίας που από μόνη της είναι παράγοντας κινδύνου για αθηρογένεση, αυτές οι δυνητικές λειτουργικές επιδράσεις θα πρέπει να μελετηθούν προσεκτικά σε ανθρώπους, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες που είναι γνωστό ότι συσχετίζονται με υπερινσουλιναιμία και υπερτριγλυκεριδαιμία (Roberfroid, 1999).

Η εκλεκτική αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων στην μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, υποστηρίζει την κατάταξη της ινουλίνης στα πρεβιοτικά. Γενικού ενδιαφέροντος είναι η ερώτηση εάν υπάρχει δοσοεξαρτώμενη σχέση σε ένα τέτοιο σύνθετο οικοσύστημα, όπως είναι η μικροχλωρίδα στο κόλον, αφού μπορεί να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως ο αρχικός αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, σε επίπεδο πληθυσμού, η ερώτηση για τη δόση έχει μικρή σχέση και ότι μια μέση ποσότητα 4-5g/ημέρα, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη μεταβλητότητα του αριθμού των μπιφιδοβακτηρίων στην ανθρώπινη χλωρίδα στο κόλον, είναι δραστική στην διέγερση της ανάπτυξης αυτών των βακτηρίων και την καθιστά ευεργετική για την υγεία (Roberfroid, 1999).

Όσον αφορά τις επιδράσεις της ινουλίνης και της ολιγοφρουκτόζης στον κίνδυνο εμφάνισης ασθένειας, θεωρείται ότι βοηθούν σε περίπτωση δυσκοιλιότητας λόγω

της μάζας των κοπράνων και των επιδράσεών τους στη κινητικότητα του εντέρου, καθώς και σε περίπτωση διάρροιας (Clavel et al., 2005), ειδικά όταν αυτή σχετίζεται με εντερική μόλυνση. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετιστεί άμεσα με την ανασταλτική επίδραση των μπιφιδοβακτηρίων και στα Gram (+) και Gram(-) βακτήρια, όπως αναφέρουν οι Wang and Gibson. Επίσης, σε περίπτωση που βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του ασβεστίου, μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης οστεοπόρωσης (Clavel et al., 2005), γεγονός που ακολουθείται από αλλαγές στην πυκνότητα των οστών σε ανόργανα συστατικά και στην μάζα των οστών των άκρων. Επιπλέον, αναμένεται μείωση του κινδύνου αθηροσκληρωματικής καρδιακής νόσου που σχετίζεται με δυσλιπιδαιμία, ειδικότερα με υπερτριγλυκεριδαιμία, και αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία σχετίζεται με υπερθερμιδική, υψηλή σε υδατάνθρακες, δίαιτα. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί η πιθανή μείωση της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, λόγω της παρεμπόδισης της ανάπτυξης των ανώμαλων κρυπτών και άλλων δεικτών και/ή λόγω της μείωσης της ανάπτυξης του όγκου (Roberfroid, 1999).

1.4 Πρεβιοτικά και δράσεις τους

Ως πρεβιοτικό χαρακτηρίζεται ένας μη εύπεπτος υδατάνθρακας, ο οποίος εκλεκτικά προσαρμόζει την αποικιακή μικροχλωρίδα, σε συνδυασμό με την βελτίωση της υγείας του ξενιστή, για παράδειγμα αυξάνοντας τον αριθμό των ενδογενών μπιφιδοβακτηρίων. Πολλοί υδατάνθρακες αναφέρονται ως πρεβιοτικά, όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (IMO) και η λακτουλόζη. Πολλά είναι τα οφέλη για την υγεία που έχουν σχετιστεί με τα μπιφιδοβακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους το πετυχαίνουν αυτό δεν είναι ισχυρά καθορισμένοι. Αυτοί περιλαμβάνουν την αναστολή της παθογένειας του εντέρου, χαμηλώνοντας τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα, παρεμπόδιση του καρκίνου στο κόλον, αύξηση της απορρόφησης ασβεστίου, σύνθεση βιταμινών και προαγωγή της απάντησης του ανοσοποιητικού (Palframan et al., 2002).

Τα πιο αποδοτικά πρεβιοτικά επίσης μειώνουν ή εξαφανίζουν τις ιδιότητες και τον αριθμό μικροοργανισμών που θεωρούνται παθογόνοι (Gibson et al., 1999).

Πολλά τροφικά συστατικά, ιδιαίτερα αρκετοί ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες (συμπεριλαμβάνονται οι διαιτητικές ίνες), διεκδικούν να έχουν πρεβιοτική δραστηριότητα, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα απαιτούμενα κριτήρια. Δεν είναι όλοι οι διαιτητικοί υδατάνθρακες πρεβιοτικά, και πρέπει να καθιερωθούν πιο σαφή κριτήρια για την κατάταξή τους ως πρεβιοτικά. Αυτά τα κριτήρια είναι: 1) αντοχή στη γαστρική δραστηριότητα, στην υδρόλυση από τα ένζυμα των θηλαστικών και στην γαστρεντερική απορρόφηση. 2) Ζύμωση από την εντερική μικροχλωρίδα και 3) εκλεκτική αύξηση της ανάπτυξης ή/ και της δραστηριότητας αυτών των εντερικών βακτηρίων που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία (Roberfroid, 1999).

Υπάρχουν όμως δυσκολίες στη σύγκριση των διάφορων πρεβιοτικών. Έτσι, στη μελέτη των R. Palframan et al. 2003, χρησιμοποιήθηκε ένας συγκριτικός ποσοτικός πρεβιοτικός δείκτης (Π.Δ.), προκειμένου να καθοριστούν οι πρεβιοτικές επιδράσεις *in vitro*, με την χρήση δεδομένων από πρόσφατες μελέτες ζυμώσεων σε καλλιέργειες. Μια τέτοια ποσοτική περιγραφή της πρεβιοτικής δραστηριότητας, θα διευκολύνει την ορθολογική αξιοποίηση των τροφίμων από τη βιομηχανία και θα εξασφαλίσει ένα μέσο σύγκρισης των πρεβιοτικών δράσεων διαφορετικών τροφίμων. Ο δείκτης μπορεί επίσης να φανεί σημαντικός στην ανάπτυξη νέας, εμπλουτισμένης μορφής των πρεβιοτικών ολιγοσακχαριτών. Τα πρεβιοτικά είναι υδατάνθρακες, οι οποίοι από τον ορισμό τους προκαλούν αλλαγές σε έναν αριθμό κλειδί βακτηριακών γενών στο κόλον, όπως στα μπιφιδοβακτήρια, στα *bacteroides*, στους λακτοβακίλλους και στα κλοστρίδια (υπο-ομάδα *histolyticum*). Παρόλο που είναι γνωστό ότι οι αλλαγές αυτές είναι ευεργετικές για την υγεία, ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Γι αυτό τον λόγο η πρώτη έκδοση του Π.Δ. συμπεριλαμβάνει αλλαγές του πληθυσμού συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων. Ο υπολογισμός του Π.Δ. έγινε με την παρακάτω εξίσωση (Palframan et al., 2003):

$$\text{Π.Δ.} = (\text{Bif/Total}) - (\text{Bac/Total}) + (\text{Lac/Total}) - (\text{Clos/Total})$$

όπου Bif είναι ο αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας/ αριθμό κατά τον εμβολιασμό, Bac είναι ο αριθμός των *Bacteroides* στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας/ αριθμό κατά τον εμβολιασμό, Lac ο αριθμός των λακτοβακίλλων στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας/ αριθμό κατά τον εμβολιασμό, Clos ο αριθμός των κλοστρίδιων στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας/ αριθμό κατά τον εμβολιασμό, και Total είναι ο αριθμός των ολικών βακτηρίων στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας/ αριθμό κατά τον εμβολιασμό (Palframan et al., 2003).

Η εξίσωση υποδεικνύει, ότι μία αύξηση στους πληθυσμούς των μπιφιδοβακτηρίων και/ ή των λακτοβακίλλων, αποτελεί θετική επίδραση, ενώ μια αύξηση στα *Bacteroides* και στα κλοστρίδια (υπο-ομάδα histolyticum), θεωρείται αρνητική. Οι πληθυσμιακές αλλαγές σε αυτές τις ομάδες, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση, συσχετίστηκαν με τα αρχικά τους επίπεδα. Αυτή η αναλογία στη συνέχεια, εκφράστηκε ως μία αναλογία του συνολικού αριθμού των ολικών βακτηρίων σε πραγματικούς αριθμούς. Έτσι, εισάγοντας πραγματικούς αριθμούς, οι πληθυσμιακές αλλαγές κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα αρχικά τους επίπεδα, μειώνοντας έτσι κατά μία τις μεταβλητές που ενυπάρχουν σε αυτές τις μελέτες. Από τη στιγμή που είναι αδύνατο προς το παρόν, να απαριθμηθεί ο αριθμός όλων των βακτηριακών ομάδων στο ανθρώπινο παχύ έντερο, η ενσωμάτωση του αριθμού των ολικών βακτηρίων στον Π.Δ. είναι πολύ σημαντική. Είναι πιθανόν λοιπόν, σε περίπτωση μιας παρατηρούμενης μεγάλης αύξησης των μπιφιδοβακτηρίων σε μια πρεβιοτική μελέτη, να υπάρξει ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού μη αναγνωρισμένων και λιγότερο ευεργετικών βακτηρίων, τα οποία όμως δεν απαριθμούνται. Εάν μια βακτηριακή ομάδα εμφανίζει σχετική αύξηση μεγαλύτερη από αυτή των ολικών βακτηρίων, τότε λαμβάνεται τιμή >1, αντίθετα εάν είναι μικρότερη, τότε η αντίστοιχη τιμή είναι <1. Στη συνέχεια, οι προαναφερθείσες τιμές, εισάγονται στην εξίσωση του Π.Δ., για να ληφθεί ένα συνολικό σκορ (αποτέλεσμα) (Palframan et al., 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, τα συστατικά της τροφής που παρουσιάζουν καλύτερη πρεβιοτική δράση είναι οι μη- πεπτόμενοι ολιγοσακχαρίτες (NDO). Αυτοί είναι ολιγομερή υδατανθράκων, όπου η διαμόρφωση των συνδετικών δεσμών μεταξύ δύο ατόμων των χημικών ενώσεων αυτών, επιτρέπει την αντοχή τους στην υδρολυτικές δραστηριότητες των εντερικών πεπτικών ενζύμων. Παρόλα αυτά, οι μη- πεπτόμενοι ολιγοσακχαρίτες είναι ευαίσθητοι στις μεταβολικές δραστηριότητες από τις βακτηριακές αποικίες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να ζυμώσουν υδατάνθρακες και να παράγουν μικρής αλύσου καρβοξυλικά οξέα και αέρια, καθώς επίσης και να αυξήσουν την μεταβολική ενέργεια, την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό. Οι υδατάνθρακες περιέχουν μίγματα ολιγομερών με διαφορετικού μήκους αλυσίδες και χαρακτηρίζονται από τον βαθμό πολυμερισμού τους (DP). Μη εύπεπτοι ολιγοσακχαρίτες, όπου δημοσιεύσεις υποστηρίζουν την πρεβιοτική δράση τους, είναι οι τύπου ινουλίνης ολιγοσακχαρίτες (ή αλλιώς οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες), οι ολιγοσακχαρίτες της σόγιας (ραφινόζη και σταχιόζη), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτοσυλσουκρόζες, οι μαλτοολιγοσακχαρίτες, συμπεκνώματα παλατινόζης και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες (Gibson et al., 1999).

Τα περισσότερα κοινά πρεβιοτικά έχουν μικρό βαθμό πολυμερισμού, με εξαίρεση την ινουλίνη. Αφού οι ολιγοσακχαρίτες πρέπει να υδρολυθούν από βακτηριακές, σχετιζόμενες με κύτταρα, γλυκοσιδάσες, πριν απορροφηθούν ως μονοσακχαρίτες, είναι λογική η υπόθεση ότι όσο πιο μακρύς είναι ο ολιγοσακχαρίτης, τόσο περισσότερη πρεβιοτική δράση υπάρχει στο κόλον. Για παράδειγμα, η μακράς αλύσου ινουλίνη μπορεί να ασκεί μια πρεβιοτική επίδραση στο κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου, από ότι οι χαμηλοί μοριακού βάρους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορεί να ζυμωθούν πιο γρήγορα στο σακχαρολυτικό εγγύς έντερο (Fuller et al., 1999).

Μία ακόμη ευεργετική δράση τους είναι ότι η ανάπτυξη των πρεβιοτικών, επιτρέπει την αύξηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την ακόλουθη διέγερση της παραγωγής βουτυρικού οξέος (Olano-Martin et al., 2000). Το βουτυρικό οξύ χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας για τα εντεροκύτταρα και πιθανώς συνδέεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες των πρεβιοτικών. Το

προπιονικό οξύ που παράγεται και αυτό από τον μεταβολισμό των πρεβιοτικών, παρεμποδίζει τη διαδικασία σύνθεσης της χοληστερόλης και ίσως αυτός είναι ο λόγος που τα πρεβιοτικά συνδέονται με τη μείωσή της στο αίμα. Επίσης, το προπιονικό οξύ βοηθά στη βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Ανυφαντάκης, 2004). Ωστόσο, ο πληθυσμός των βακτηρίων γαλακτικού οξέος αυξάνεται όχι μόνο από τη χρήση των πρεβιοτικών αλλά και των προβιοτικών (Olano-Martin et al., 2000).

Πίνακας 3 Επιθυμητές ιδιότητες πρεβιοτικών (Fuller et al., 1999).

Επιθυμητά χαρακτηριστικά πρεβιοτικών	Ιδιότητες ολιγοσακχαριτών
Ενεργά στην διατροφικά εφικτή δόση (είναι κατάλληλο να είναι όσο το δυνατόν χαμηλότερη)	Εκλεκτική αύξηση και πολλαπλασιασμός των «ωφέλιμων» βακτηρίων, π.χ. μπιφιδοβακτήρια, λακτοβάκιλλοι, σε ένα σύνθετο μικροβιακό οικοσύστημα
Αποφυγή δυσάρεστων παρενεργειών	Μη-αύξηση προϊόντων που παράγουν αέρια, σηπτικών μικροοργανισμών, παθογόνων κλπ., σε σύνθετη μικροβιακή μικροχλωρίδα
Λεπτός έλεγχος στη ρύθμιση της μικροχλωρίδας	Ζύμωση σε μικτή καλλιέργεια και εκλεκτική αύξηση συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών
Παραμονή/ επιμονή σε κάθε σημείο στο κόλον, π.χ. στο κατώτερο τμήμα του παχέος εντέρου	Υψηλό μοριακό βάρος, αργή ζύμωση
Κυμαινόμενο ιξώδες	Διαθέσιμοι σε διαφορετικά μοριακά βάρη και τρόπους σύνδεσης
Καλή αποθήκευση και σταθερότητα στην επεξεργασία	Έχουν 1-6 δεσμούς και υδατανθρακικούς δακτυλίου πυρανοσίλης
Διαφορετική γλυκύτητα	Κυμαινόμενη σύνθεση μονοσακχαριτών
Αναστολή προσκόλλησης των παθογόνων	Διαθέτουν ακολουθίες κατάλληλων υποδοχέων

Προκειμένου να πετύχουν τις ιδιότητες αυτές, τα πρεβιοτικά πρέπει να μεταβολίζονται από συγκεκριμένα είδη-στόχους, για παράδειγμα από μπιφιδοβακτήρια και λακτοβακίλλους, και όχι από κάποιον άλλο μικροοργανισμό (Fuller et al., 1999).

Οι παράγοντες κινδύνου που ευνοούν την ανάπτυξη καρκίνου περιλαμβάνουν και κληρονομικούς αλλά και περιβαλλοντικούς. Οι κληρονομικοί περιλαμβάνουν τους οικογενειακούς πολύποδες, κληρονομικό καρκίνο του κόλον χωρίς ανάπτυξη πολύποδων, το σύνδρομο Lynch I και II και την ελκώδη κολίτιδα. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την εκβιομηχανοποίηση του τρόπου ζωής, την έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, την έκθεση σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες και την κατανάλωση διατροφής υψηλής σε λίπος και χαμηλή σε φυτικές ίνες. Πιο συγκεκριμένα δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στην μείωση του κινδύνου για καρκίνο, μέσω αλλαγών στη διατροφή, και ιδιαίτερα με αύξηση της πρόσληψης φυτικών ινών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα πρεβιοτικά και με κατανάλωση προβιοτικών (Brady et al., 2000).

Η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μια ακολουθία από γεγονότα, τα οποία αν και δεν είναι πλήρως κατανοητά, πραγματοποιούνται σε καθορισμένα στάδια. Στο πρώτο στάδιο, ένα καρκινογενές προκαλεί μία αλλαγή (μετάλλαξη) στην αλληλουχία του DNA. Το στάδιο αυτό μπορεί να ακολουθεί μιας μεταβολικής ενεργοποίησης του πρόδρομου μορίου που παράγει το καρκινογενές. Είναι αποδεκτό ότι αρκετές μεταλλάξεις πρέπει να συμβούν προκειμένου να αναπτυχθεί ένας όγκος. Τα ακόλουθα βήματα είναι λιγότερο ξεκάθαρα, αλλά συνήθως περιλαμβάνουν αλλαγές στα μονοπάτια μεταγωγής των σημάτων. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα μία υπερανάπτυξη των κρυπτών (crypt) του κόλον, το οποίο έχει ανώμαλη μορφολογία. Οι ανώμαλες κρύπτες μπορεί να θεωρηθούν ως προ-νεοπλαστικές δομές, είναι επιμηκυσμένες και υπερυψωμένες συγκριτικά με τις φυσιολογικές και αναπτύσσονται σε σπειροειδή μορφή. Ένα σίγουρα μικρό, αλλά άγνωστο κλάσμα των ανώμαλων κρυπτών θα εξελιχθεί σε πολύποδες και τελικά σε όγκους (Brady et al., 2000).

Η οξεία παγκρεατίτιδα (AP) είναι μία φλεγμονώδης διαταραχή που συνοδεύεται από μεταβλητά και σοβαρά αποτελέσματα, όπως η πολυοργανική ανεπάρκεια (MOF) και η υψηλή θνησιμότητα σε αρκετές περιπτώσεις (15%-40%). Στο πρώτο στάδιο της νόσου, η αρχική τοπική φλεγμονή που εξελίσσεται στο πάγκρεας, οδηγεί στην απελευθέρωση των κυτοκινών και σε επακόλουθη εμφάνιση του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (SIRS). Αν και η

συνήθης θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει τη διακοπή λήψης τροφής από το στόμα, προκειμένου να μην επιβαρύνεται το πάγκρεας, σε μία έρευνα που έγινε στην Τουρκία, στους ασθενείς χορηγήθηκε εντερική διατροφή που περιείχε συμπλήρωμα πρεβιοτικών. Το αποτέλεσμα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης, με λίγα λόγια, ήταν η βελτίωση της παραμονής στο νοσοκομείο, της διάρκειας της διατροφικής θεραπείας και της οξείας φάσης της απόκρισης, σε σχέση με την εντερική διατροφή χωρίς συμπλήρωμα πρεβιοτικών (Saulnier et al., 2007).

Πιο συγκεκριμένα, οι Karakan et al. πραγματοποίησαν μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη κλινική μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 30 ασθενείς με οξεία παγκρεατίτιδα, οι οποίοι έπρεπε να σταματήσουν τη λήψη τροφής από το στόμα για 48 ώρες και οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Οι εντερικές δίαιτες και στις δύο ομάδες ήταν ισάξιες θερμιδικά (125 kcal/100 mL), με λίπος 35% και πρωτεΐνη 20%. Η ομάδα παρέμβασης έλαβε επιπρόσθετα φυτικές ίνες, εκ των οποίων οι διαλυτές ήταν 0.7 g/100 mL και οι δυσδιάλυτες 0.8 g/100 mL, και ένα συμπλήρωμα πρεβιοτικών σε ποσότητα 1.5 g/100 mL (24 g τη μέρα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το συμπλήρωμα των πρεβιοτικών βελτιώνει την οξεία φάση απόκρισης νωρίτερα από τα συνήθη εντερικά διαλύματα. Η μέση διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο ήταν μικρότερη στην ομάδα παρέμβασης από ότι στην ομάδα ελέγχου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η καταστολή της φλεγμονώδους απάντησης από τα πρεβιοτικά γίνεται νωρίτερα (Saulnier et al., 2007).

1.4.1 Δράσεις πρεβιοτικών ινών στην εντερική μικροχλωρίδα

Ορισμένα πρεβιοτικά έχειδειχθεί ότι αυξάνουν τον αριθμό των μπιφιδοβακτηρίων και των λακτοβακίλλων. Η αύξηση αυτή οδηγεί στην παραγωγή λιπαρών οξέων μικρής αλύσου (SCFA) ως τελικά προϊόντα της ζύμωσης των ολιγοσακχαριτών από τους μικροοργανισμούς αυτούς. Το προφίλ αυτών των λιπαρών οξέων μικρής αλύσου ποικίλλει μεταξύ των ολιγοσακχαριτών και περιέχει μεγαλύτερες ή μικρότερες ποσότητες προπιονικού και βουτυρικού οξέος, τα οποία ασκούν

θετικές αλληλεπιδράσεις στην πρόληψη του καρκίνου του κόλον. Ωστόσο, καθημερινή κατανάλωση πρεβιοτικών oligοσακχαριτών, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αερίων, που αποτελεί μια ανεπιθύμητη παρενέργεια. Αν και ένα υπόστρωμα μπορεί να είναι πρεβιοτικό και συνεπώς να μεταβολίζεται εκλεκτικά από μπιφιδοβακτήρια και λακτοβακίλλους, μπορεί επίσης να υποστεί ζύμωση σε μικρότερο βαθμό από οργανισμούς που παράγουν αέρια, όπως τα κλοστρίδια (Rycroft et al., 2001).

Τα πρεβιοτικά έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε ηλικιωμένους, των οποίων ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων τείνει να εξαφανιστεί (Rycroft et al., 2001).

Επιπλέον, και λόγω της εντερικής ζύμωσης, τα πρεβιοτικά έχουν διάφορες φυσιολογικές επιδράσεις όπως ο έλεγχος του χρόνου διέλευσης και της κινητικότητας της βλεννώδους μεμβράνης, ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων, επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (συγκεκριμένα ιόντα), διαμόρφωση της δραστηριότητας του ανοσοποιητικού και επίδραση στη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Επιπλέον, μπορεί να έχουν και συστηματικές επιδράσεις όπως η ομοίωση υδατανθράκων ή λιπιδίων (Gibson et al., 1999). Τέλος, έχει φανεί ότι τα πρεβιοτικά οδηγούν σε έμμεση μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων του ορού (Mandalari et al., 2007).

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι με τη ζύμωση που υφίστανται από τα διάφορα βακτήρια, αυξάνουν την απορρόφηση και τη διατήρηση διαφόρων μετάλλων όπως του ασβεστίου, μαγνησίου, ψευδαργύρου και σιδήρου. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ασκούν ευεργετική επίδραση σε φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, αυξάνοντας την παραγωγή βουτυρικού οξέος και επιταχύνοντας τόσο τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βλεννογόνου, όσο και την πρόοδο της θεραπείας (Anderson J. J. B., 2004; Mandalari et al., 2007).

Παρόμοιες επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί στη φυσική άμυνα του οργανισμού των βρεφών, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των μπιφιδοβακτηρίων, που συνήθως σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εντερικών μολύνσεων (Mandalari et al., 2007).

1.4.1.1 Μελέτες *In vitro*

Οι μέχρι σήμερα δημοσιευμένες μελέτες της πρεβιοτικής ζύμωσης *in vitro* ποικίλλουν από τη χρήση απλών στατικών κλειστών καλλιιεργειών (Rycroft et al. 2001) έως τις χημειοστατικές καλλιέργειες τριών σταδίων και τη χρήση εντερικού μοντέλου (Macfarlane et al., 1998; Palframan et al., 2003).

Σε μια *in vitro* μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία, χρησιμοποιήθηκαν επτά διαφορετικοί υδατάνθρακες για να διαπιστωθεί η πρεβιοτική δράση τους, μεταξύ των οποίων οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες και η ινουλίνη. Παρατηρήθηκε λοιπόν, μια γενικότερη σημαντική αύξηση του αριθμού των μπιφιδοβακτηρίων για όλα τα υποστρώματα. Παρόλα αυτά μόνο η ινουλίνη και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες (XOS) αύξησαν τον αριθμό των ολικών βακτηρίων. Ξεκάθαρες αλλαγές στον αριθμό των λακτοβακίλλων δεν παρατηρήθηκαν. Όσον αφορά τα κλωστρίδια οι αλλαγές ποικίλλουν στα διάφορα πρεβιοτικά. Όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των φρουκτοολιγοσακχαριτών και ξυλοολιγοσακχαριτών παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση μετά τις πέντε ώρες, ενώ μετά από 24 ώρες σε μερικές περιπτώσεις σημειώθηκε σημαντική μείωση. Παρόμοιες αλλαγές σημειώθηκαν στον πληθυσμό των *Bacteroides* με όλους τους ολιγοσακχαρίτες, με σημαντικότερη αύξηση του αριθμού τους μετά από πέντε ώρες ζύμωσης. Τέλος, στους μικροοργανισμούς όπως η *Escherichia coli* και οι στρεπτόκοκκοι δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στα περισσότερα υποστρώματα, αν και η ινουλίνη προκάλεσε σχετικά μεγάλη αύξηση και στις δύο αυτές ομάδες μέχρι την πάροδο των 24 ωρών, ενώ οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες προκάλεσαν αύξηση αρχικά, η οποία όμως δε διατηρήθηκε (Rycroft et al., 2001).

Μία άλλη *in vitro* έρευνα χρησιμοποίησε πηκτίνο-ολιγοσακχαρίτες (POS) από την λευκή φλούδα πορτοκαλιού, προκειμένου να συγκρίνει την δράση τους με τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, που αποτελούν σίγουρα πρεβιοτικά, και με το άμυλο του οποίου οι δράσεις δεν είναι οι κατάλληλες για να χαρακτηριστεί ως πρεβιοτικό. Υπό ελεγχόμενο pH, κλειστές καλλιέργειες υπό ανάδευση εμβολιάστηκαν με διάλυμα ανθρώπινων κοπράνων και η καταμέτρηση των βακτηρίων έγινε με χρήση φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού και με ανάλυση HPLC.

Τα αποτελέσματα αυτής έδειξαν ότι και οι πηκτίνο-ολιγοσακχαρίτες και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες συντέλεσαν σε μια σημαντική αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων μετά από 24 ώρες από τη ζύμωση για τους πρώτους και μετά από 5 και 10 ώρες για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες. Ο πληθυσμός των *Bacteroides* παρέμεινε σταθερός στα τρία από τα τέσσερα δείγματα που ελέγχθηκαν, με εξαίρεση το άμυλο, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση μετά από 5 ώρες ζύμωσης. Αντίστοιχα, τα επίπεδα των *Clostridium histolyticum* διατηρήθηκαν, με μια μείωση του αριθμού τους μετά από 24 ώρες ζύμωσης. Τέλος, αύξηση για τους λακτοβακίλλους και τους εντερόκοκκους παρατηρήθηκε, αλλά δεν ήταν σημαντική (Manderson et al., 2005).

1.4.1.2 Μελέτες *In vivo*

Προκειμένου να αποδειχθεί μία πρεβιοτική επίδραση των λειτουργικών συστατικών των τροφίμων απαιτείται η *in vivo* μελέτη μέσω κατάλληλων διατροφικών παρεμβάσεων σε στοχοθετημένες ομάδες. (π.χ. άνθρωποι, ζώα φάρμας ή κατοικίδια ζώα), χρησιμοποιώντας έγκυρες μεθοδολογίες για την εξαγωγή επιστημονικών συμπερασμάτων (Roberfroid, 2007).

Σε μια *in vivo* έρευνα που έγινε στη Μινεσότα (ΗΠΑ), έλαβαν μέρος ενενήντα υπερχοληστερολαιμικοί άνδρες και γυναίκες (chol>200mg/dl), μέσω μιας αγγελίας σε εφημερίδα. Οι προϋποθέσεις συμμετοχής τους, η συλλογή των οποίων έγινε μέσω τηλεφώνου, ήταν να μην είναι καπνιστές, να μην έχουν εμφανίσει καρκίνο ή άλλες χρόνιες νόσους, να έχουν ηλικία μεταξύ 22 και 65 ετών και κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (CVD). Από τους εθελοντές ζητήθηκε να διατηρήσουν την συνηθισμένη τους διατροφή με ταυτόχρονη κατανάλωση συμπληρώματος 6 γρ. διαιτητικών ινών από βρώμη (OAT) ή 6 γρ. placebo, το οποίο ήταν δεξτρόζη, 2 φορές τη μέρα και για έξι βδομάδες. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής για την ομάδα παρέμβασης, έδειξαν μια μείωση της ολικής χοληστερόλης και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL), αύξηση των τριγλυκεριδίων (όχι στατιστικά σημαντική), ενώ η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) παρέμεινε αμετάβλητη (Queenan et al., 2007).

Σε μία άλλη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Βέλγιο, ο σκοπός ήταν να ελέγξει την πρεβιοτική δράση της chicory ινουλίνης σε οχτώ υγιείς εθελοντές (5 γυναίκες με δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεταξύ 18 και 24kg/m², 3 άντρες με BMI μεταξύ 19 και 25 kg/m²). Οι εθελοντές ήταν ηλικίας μεταξύ 20 και 50 ετών, δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά ή γαστρεντερικά φάρμακα τους τελευταίους τρεις μήνες και δεν είχαν ιστορικό γαστρεντερικών νοσημάτων. Το συμπλήρωμα που έλαβαν ήταν μια εμπλουτισμένη ολιγοφρουκτόζη από chicory Fn-τύπου, το οποίο παράγεται με μερική ενζυματική υδρόλυση του ραφιναρισμένου εκχυλίσματος από τη ρίζα του ραδικιού (Menne et al., 2000).

Η διάρκεια της έρευνας ήταν 7 εβδομάδες και πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Οι δύο πρώτες εβδομάδες αποτελούσαν το πρώτο στάδιο (στάδιο ελέγχου), κατά τη διάρκεια του οποίου οι εθελοντές ακολούθησαν μια καθορισμένη δίαιτα, χωρίς λήψη συμπληρώματος ολιγοφρουκτόζης. Το δεύτερο στάδιο (1^η παρέμβαση) διήρκησε δύο εβδομάδες και περιλάμβανε την κατανάλωση της καθορισμένης διατροφής και 8 g/d συμπληρώματος chicory ολιγοφρουκτόζης. Τέλος, το τρίτο στάδιο (2^η παρέμβαση), διάρκειας τριών εβδομάδων, απαιτούσε από τους εθελοντές την κατανάλωση της συνήθους διατροφής τους και λήψη 8 g/d συμπληρώματος. Από τις αναλύσεις που έγιναν, προέκυψε ότι με την πρόσληψη συμπληρώματος οι αριθμοί των ολικών αναερόβιων βακτηρίων, των λακτοβακίλλων, των *bacteroides*, των κολίμορφων και των *Clostridium* *preffingens* δεν μεταβλήθηκαν, αν και αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων. Επιπλέον, στο τέλος των παρεμβάσεων 1 και 2, το pH των κοπράνων όλων των εθελοντών μειώθηκε κατά μία μονάδα συγκριτικά με την περίοδο ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται σε αλλαγές που συμβαίνουν στις διαδικασίες ζύμωσης που λαμβάνουν χώρα στο παχύ έντερο και επιβεβαιώνεται και από άλλες παρατηρήσεις τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες (Menne et al., 2000).

1.5 Προβιοτικά

Έχει φανεί από έρευνες ότι η διαχείριση της αποικιακής μικροχλωρίδας βοηθάει την υγεία του ξενιστή, μέσω της κατανάλωσης τροφικών συμπληρωμάτων με ζωντανούς μικροοργανισμούς, γνωστούς ως προβιοτικά (Rycroft et al., 2001).

Είναι σημαντικό να διατηρείται και να ελέγχεται αυτή η ισορροπία ανάμεσα στην εντερική μικροχλωρίδα και στον ξενιστή, αφού υπάρχουν πολλοί παράγοντες του σύγχρονου τρόπου ζωής που αναμένεται να προκαλέσουν αλλαγές είτε στη σύνθεση ή/ και στη δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας. Μερικοί από αυτούς είναι η διατροφή, η θερμοκρασία, η υγρασία, η φαρμακευτική αγωγή, το στρες. Όμως η βελτιωμένη γνώση της εντερικής μικροχλωρίδας οδήγησε στην ανάπτυξη προβιοτικών σκευασμάτων (φαρμακευτικών μιγμάτων) τα οποία αναμένεται να αντιδράσουν θετικά στα προβλήματα αυτά και να εξασφαλίσουν έναν αποτελεσματικό αλλά και φυσικό τρόπο καταπολέμησής τους (Fuller et al., 1999).

Η λέξη προβιοτικό απορρέει από δύο ελληνικές λέξεις που σημαίνουν «για τη ζωή». Από το 1965 εκφράστηκαν διάφοροι ορισμοί και τελικά επικράτησε ότι προβιοτικό είναι ένα ζωντανό και βιώσιμο μικροβιακό διατροφικό συστατικό, το οποίο έχει ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή ζώο βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής του μικροχλωρίδας (Fuller et al., 1999; Brady et al., 2000). Τα προβιοτικά, λοιπόν, ασκούν μια ευεργετική επίδραση στον ξενιστή μεσολαβώντας ανάμεσα στην εντερική μικροχλωρίδα και στην απορρόφηση από τους βιώσιμους μικροοργανισμούς. Ένας τέτοιος ορισμός περιλαμβάνει όχι μόνο φαρμακευτικά μίγματα ειδικά σχεδιασμένα για προβιοτική χρήση, αλλά και παραδοσιακά γιαούρτια και άλλα τρόφιμα ζύμωσης. Προβιοτικά προϊόντα υπάρχουν σε καταστήματα σε μορφή σκόνης, ταμπλέτων, υγρών εναιωρημάτων και σπρέι και προτείνονται για χρήση από ανθρώπους, ζώα φάρμας και κατοικίδια. Τα περισσότερα φαρμακευτικά μίγματα που απευθύνονται στον άνθρωπο έχουν μορφή σκόνης ή ταμπλέτων. Επίσης μπορεί να περιέχουν ένα ή παραπάνω από επτά διαφορετικά είδη βακτηρίων ή μυκήτων (Fuller et al., 1999).

Πίνακας 4 Παραδείγματα από βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται σε προβιοτικά φαρμακευτικά σκευάσματα (Fuller et al., 1999).

<i>Lactobacilloi</i>	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Streptococci</i>
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>S. salivarius subsp thermophilus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bif. longum</i>	<i>Ent. Faecalis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Ent. Faecium</i>
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. casei subsp. Casei</i>		
<i>L. casei Shirota</i>		
<i>Lactobacillus GG</i>		

Πίνακας 5 Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά(Τζανετάκης & Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2000).

Οξυγαλακτικά βακτήρια						
Λακτοβάκιλλοι	Λακτόκοκκοι	<i>Leuconostoc</i> spp.	Στρεπτόκοκκοι	Εντερόκοκκοι	Πεδιόκοκκοι	Προπιονικά βακτήρια
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. gasserii</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. GG</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. cellobiosus</i>	<i>L. lactis subsp. lactis</i> <i>L. lactis subsp. cremoris</i>	<i>Leu. mesenteroides subsp. dextranicus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>

Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των προβιοτικών είναι τα εξής:

- Επιβίωση στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις περιοχές που πρέπει να δράσουν
- Προσκόλληση και αποικισμός στην περιοχή που είναι δραστικά
- Μη ανοσοποιητική απάντηση έναντι των προβιοτικών ειδών

- Μη παθογονική, τοξική, αλλεργική, μεταλλαξιγόνος ή καρκινογόνος δράση είτε των ίδιων των προβιοτικών, είτε των ενζυμικών προϊόντων τους, είτε των κυτταρικών συστατικών μετά το θάνατο των βακτηρίων
- Γενετικά σταθερά, δε μεταφέρουν πλασμίδια
- Εύκολη και αναπαραγόμενη παραγωγή
- Βιώσιμα κατά τη διάρκεια επεξεργασίας και αποθήκευσης (Havenaar & Huis, 1999).

Οι επιθυμητές όμως, ιδιότητες των προβιοτικών για να μπορέσουν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα από τεχνολογική άποψη, είναι η επίδραση στη γεύση του τελικού προϊόντος, στην υφή των τροφίμων, η βιωσιμότητά τους στα τρόφιμα και η σταθερότητά τους σε βιομηχανικές επεξεργασίες. Όσον αφορά τις φυσιολογικές τους ιδιότητες, πρέπει να εμφανίζουν ανοχή στο pH, στους γαστρικούς και παγκρεατικούς χυμούς καθώς και στη χολή. Τέλος, είναι επιθυμητές κάποιες λειτουργικές ιδιότητες, όπως η προσκόλλησή τους στο εντερικό επιθήλιο, η δημιουργία αποικιών στο ανθρώπινο εντερικό σωλήνα, ο ανταγωνισμός τους με παθογόνα, η αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα και ο εμπλουτισμός ή εξισορροπιστική επίδραση στην ανοσολογική απόκριση (Korpela & Saxelin 1999).

Από έρευνες έχει αποδειχθεί ότι τα προβιοτικά με ή χωρίς τα πρεβιοτικά, έχουν μια ανασταλτική και δοσοεξαρτώμενη επίδραση στην ανάπτυξη των ανώμαλων κρυπτών στο κόλον και των όγκων σε ζώα (Brady et al., 2000).

Διάφορες μελέτες εξέτασαν τις επιδράσεις του γάλατος που ήταν ζυμωμένο από λακτοβακίλλους και *Candida*, στον σχηματισμό των όγκων (Takano et al.) Οι ερευνητές βρήκαν ότι η ογκογένεση στο παχύ έντερο προκαλείται από την 1,2-διμεθυλουδραζίνη (DMH), η οποία ήταν μειωμένη στα ποντίκια που έλαβαν το ζυμωμένο γάλα. Οι Shackleford et al. μελέτησαν τις επιδράσεις του ζυμωμένου ή από *Streptococcus thermophilus*, ή από *Lactobacillus bulgaricus*, γάλατος, σε όγκους του παχέος εντέρου, που προκαλεί η DMH. Το ποσοστό επιβίωσης ήταν μεγαλύτερο στα ποντίκια που λάμβαναν το γάλα αυτό, αλλά ο αριθμός των όγκων δε διέφερε ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα παρέμβασης (Brady et al., 2000).

Μία έρευνα των Abdelali et al. μελέτησε τον σχηματισμό ανώμαλων κρυπτών σε ποντίκια που έλαβαν άπαχο γάλα, άπαχο γάλα εμπλουτισμένο με *Bifidobacterium sp. Bio.*, και τα ίδια βακτήρια ενσωματώθηκαν στη διατροφή τους. Οι δΐαιτες αυτές μείωσαν την εμφάνιση των ανώμαλων κρυπτών κατά 50%, ενώ δεν υπήρξε διαφορά στο pH στο τυφλό έντερο. Οι ομάδες που κατανάλωσαν μπιφιδοβακτήρια μείωσαν τη δραστηριότητα της β-γλυκουρονιδάσης στο τυφλό (Brady et al., 2000).

Τα εντερικά βακτήρια μπορεί να μεταβολίσουν τα συστατικά των τροφίμων που δεν απορροφώνται. Ένα παράδειγμα τέτοιων συστατικών είναι οι ισοφλαβόνες, οι οποίες είναι χημικά συγγενείς ενώσεις με τα οιστρογόνα. Βρίσκονται στα φυτά και κυρίως στη σόγια και η βιοδιαθεσιμότητά τους εξαρτάται από τα βακτήρια του εντέρου. Οι μετατροπές των βακτηρίων που γίνονται στις ισοφλαβόνες, περιλαμβάνουν διγλυκοζυλίωση, διμεθυλίωση, ελάττωση και διάσπαση των δακτυλίων, τα οποία οδηγούν σε αλλαγές στις βιολογικές τους δραστηριότητες όπως οιστρογονικές και ανταγωνιστικές δράσεις, αντιοξειδωτικές και ενζυμο-ανασταλτικές ιδιότητες. Γι αυτό οι ισοφλαβόνες σε συνδυασμό με τα ενδογενή προβιοτικά, θεωρείται ότι εμποδίζουν ορμονικές ασθένειες, όπως η οστεοπόρωση, που παρουσιάζεται κυρίως σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Σε μερικές κλινικές έρευνες τα προβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη θεραπεία της δυσανοχής της λακτόζης και της διάρροιας (Clavel et al., 2005).

Οι προβιοτικοί οργανισμοί συντελούν στην αύξηση των εντερικών αντισωμάτων, της παραγωγής κυτοκίνης και στην ενεργοποίηση των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί σε βλεννώδεις μεμβράνες πιο μακρινών περιοχών και στο περιφερικό αίμα (Anderson A D G et al., 2004).

Επιπλέον, μία καλή απόδειξη ότι η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα εμπλέκεται στην ανοχή σε ασθένειες (ειδικά σε γαστρεντερικές μολύνσεις), προέκυψε από τα παρακάτω ευρήματα:

1. αποστειρωμένα ζώα είναι πιο επιρρεπή στη μόλυνση, σε σχέση με τα αντίστοιχα που έχουν μια ολοκληρωμένη εντερική μικροχλωρίδα (Collins and Carter, 1978)

2. λήψη αντιβιοτικών από του στόματος, αυξάνει την ευαισθησία των ζώων στη μόλυνση (Freter, 1955)
3. διαχείριση των κλυσμάτων με εναιωρήματα κοπράνων (administration of enemas of faecal suspensions) από έναν υγιή ενήλικα μπορεί να ελέγξει τη διάρροια που προκαλείται από αντιβιοτικά (Fuller et al., 1999).

Όσον αφορά τον άνθρωπο, έχει προταθεί, ότι συγκεκριμένα μικροβιακά είδη παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στα παρακάτω:

1. Στο σχηματισμό ή την αναδόμηση μιας καλά ισορροπημένης ενδογενούς εντερικής και/ ή αναπνευστικής μικροχλωρίδας, για παράδειγμα, στα νεογνικά παιδιά κατά την εισαγωγή τους σε μονάδα εντατικής θεραπείας, μετά από απολύμανση του γαστρεντερικού σωλήνα με αντιβιοτικά σε συνδυασμό με μεταμόσχευση μυελού των οστών.
2. Στη βελτίωση της αντίστασης της ενδογενούς μικροχλωρίδας του εντερικού, αναπνευστικού και ουροποιητικού σωλήνα, στον αποικισμό από παθογόνα. Η ενδογενής μικροχλωρίδα στην επιφάνεια του σώματος, αναστέλλει τον αποικισμό των μη-ενδογενών μικροοργανισμών. Μερικές φορές όμως παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να διεισδύσουν και/ ή να αποικίσουν σε αυτές τις επιφάνειες, μέσω μιας μαζικής επίθεσης παθογόνων ή μέσω μιας προσωρινής μείωσης των πληθυσμών των ενδογενών στελεχών. Οι μολύνσεις του ουρογεννητικού σωλήνα σχετίζονται με Gram αρνητικά βακτήρια και με μία διαταραχή της αναερόβιας μικροχλωρίδας. Για τη θεραπεία της μόλυνσης και την ανασύσταση της μικροχλωρίδας χρησιμοποιούνται λακτοβάκιλλοι, και μάλιστα ο εμβολιασμός του κόλπου με αυτούς, έχει ευεργετικές επιδράσεις, πιθανόν λόγω της ανταγωνιστικής προσκόλλησης στα ουροεπιθηλιακά κύτταρα. Στο ανώτερο τμήμα του αναπνευστικού σωλήνα (ρινοφάρυγγας), η εμφύτευση ενός α-αιμολυτικού είδους στρεπτόκοκκου, έχει ως αποτέλεσμα την κανονικοποίηση της μικροχλωρίδας των παιδιών. Για τον εντερικό σωλήνα, στην περίπτωση κολίτιδας από *Clostridium difficile* ως θεραπεία χρησιμοποιούνται λακτοβάκιλλοι.

3. Στην ελάττωση των επιπέδων χοληστερόλης ορού. Τρόφιμα που μπορούν να υποστούν ζύμωση μπορεί να μειώσουν τη συγκέντρωση χοληστερόλης ορού, μειώνοντας την εντερική απορρόφηση και της διαιτητικής και της ενδογενούς χοληστερόλης. In vitro πειράματα σε ζώα έδειξαν ότι ο *L. acidophilus* αφομοιώνει μερικές ποσότητες χοληστερόλης του μέσου καλλιέργειας, με επακόλουθη την θεώρηση, ότι ίσως αυτός ο οργανισμός δεσμεύει χοληστερόλη στις εντερικές κοιλότητες, και ως εκ τούτου να μειώνει την απορρόφηση της, μέσω της κυκλοφορίας.
4. Στην αναστολή μεταλλαξιογένεσης του εντερικού περιεχομένου και στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των εντερικών όγκων. Οι ιδιότητες αυτές στηρίζονται στο ότι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αδρανοποιούν ή αναστέλλουν καρκινογενή συστατικά στο γαστρεντερικό σωλήνα, διεγείρουν ή εμπλουτίζουν την απάντηση του ανοσοποιητικού και μειώνουν τις εντερικές, βακτηριακές ενζυμικές δραστηριότητες, όπως της β-γλυκουρονιδάσης, της αζορεδοκτάσης και της νιτροεδοκτάσης, οι οποίες ενεργοποιούν καρκινογενή, μετατρέποντας προκαρκινογενή σε καρκινογενή.
5. Στις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις που έχουν με το ανοσοποιητικό σύστημα. Θεωρείται ότι τα αρμόδια κύτταρα του ανοσοποιητικού ενεργοποιούνται στο έντερο και μεταφέρονται σε βλεννώδεις μεμβράνες άλλων περιοχών, όπως στον αναπνευστικό και ουρογεννητικό σωλήνα. Ο εντεροσχετιζόμενος λεμφικός ιστός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση του γαστρεντερικού σωλήνα. Έτσι, ζωντανοί μικροοργανισμοί του εντέρου ή τα αντιγόνα τους, μπορούν να διεισδύουν στις επιθηλιακές κοιλότητες του εντέρου και να διεγείρουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Μπορεί επίσης να ευνοούν την έκφραση γονιδίων καταστολής (suppressor) ή βοηθητικών κυττάρων και να διεγείρουν την διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Ο όρος μετατόπιση (translocation) χρησιμοποιείται για τη διέλευση των βιώσιμων βακτηρίων από τον γαστρεντερικό σωλήνα στο μεσεντέριο λεμφαδένα και πιθανά σε άλλα όργανα. Αυτός είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο δυνητικά παθογόνα

μπορούν να αποδράσουν από τα κύτταρα φονιάδες και να προκαλέσουν μολύνσεις. Όμως ενδογενή εντερικά βακτήρια όπως οι λακτοβάκιλλοι, μπορούν επίσης να μετατοπίζονται και να επιβιώνουν για πολλές μέρες στο σπλήνα ή άλλες περιοχές, και έτσι να διεγείρουν τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα.

6. Στο μεταβολισμό της λακτόζης με αποτέλεσμα να μειώνουν τη δυσανοχή στη λακτόζη
7. Στη βελτίωση της απορρόφησης του ασβεστίου, με αποτέλεσμα την αναστολή της απασβέστωσης των οστών σε ηλικιωμένα άτομα (γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση)
8. Στη σύνθεση βιταμινών και στο στάδιο της πρώιμης πέψης των πρωτεϊνών (Havenaar & Huis, 1999).

1.6 Συμβιωτικά

Ως συμβιωτικό ορίζεται ένα προϊόν το οποίο περιέχει και προβιοτικά και πρεβιοτικά με αναμενόμενη συνεργιστική δράση (Clavel et al., 2005). Ο συνδυασμός αυτών των δύο, που αναφέρεται ως συμβιωτική επίδραση, έχει ευεργετικά αποτελέσματα στον ξενιστή, βελτιώνοντας την επιβίωση και την εμφύτευση των ζωντανών μικροβιακών διατροφικών συμπληρωμάτων στη γαστρεντερική μικροχλωρίδα. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκλεκτική διέγερση της ανάπτυξης ή της δραστηριότητας του καταβολισμού ενός ή περιορισμένου αριθμού ενδεχόμενων βακτηρίων που προωθούν την υγεία, στον εντερικό σωλήνα και βελτιώνοντας την μικροβιακή ισορροπία του γαστρεντερικού σωλήνα (Amenta et al., 2006).

Παρόλα αυτά, είναι πιθανό να συμβεί παραποίηση της σύνθεσης της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας με την χρήση προ- και πρε-βιοτικών, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο το περιεχόμενο του εντέρου. Όταν τα παραπάνω χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό, τα πρεβιοτικά μπορεί να ενισχύσουν την επιβίωση των προβιοτικών, όπως επίσης να διεγείρουν τη δραστηριότητα των ενδογενών βακτηρίων του ξενιστή (Karakan et al., 2007).

Ως δυσκοιλιότητα έχει οριστεί εκείνη η κατάσταση του εντέρου όπου τα κόπρανα είναι σκληρά και ξηρά, η αφόδευση είναι επίπονη και σπάνια, και καθορίζεται με διαφορετικούς τρόπους στα διάφορα άτομα. Το πιο συχνό κριτήριο είναι η σπάνια συχνότητα αφόδευσης, η οποία μπορεί να είναι λιγότερο από τρεις φορές την εβδομάδα και αποτελεί τη δυσκοιλιότητα τύπου Α. Η δυσκοιλιότητα τύπου Β περιλαμβάνει ασθενείς οι οποίοι έχουν ανώμαλα μεγάλα κόπρανα ή των οποίων η διαδικασία αφόδευσης απαιτεί υπερβολική προσπάθεια (Amenta et al., 2006).

Είναι γνωστό ότι διατροφικοί παράγοντες, όπως η χαμηλή σε φυτικές ίνες δίαιτα και η χαμηλή θερμιδική πρόσληψη, σχετίζονται με δυσκοιλιότητα. Η απώλεια βάρους τυπικά οδηγεί στην απώλεια και λιπώδους και μη λιπώδους ιστού και μπορεί να διαλύσει το εντερικό οικοσύστημα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας κατάστασης, γνωστής ως δυσβίωση (Amenta et al., 2006).

Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι γεμάτος από τρισεκατομμύρια μικροοργανισμών. Ενώ κάποια βακτήρια όπως το *Salmonella*, το *E. coli* και το *Helicobacter pylori*, προκαλούν ασθένειες, κάποια προβιοτικά βακτήρια, όπως ο *Lactobacillus acidophilus* και τα *Bifidobacterium*, προωθούν την υγεία. Διατηρώντας αυτά τα ευεργετικά βακτήρια καταναλώνοντας τρόφιμα υψηλά σε φρουκτοολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη, που είναι γνωστά ως πρεβιοτικά, έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή (Amenta et al., 2006).

Σε μια έρευνα που έγινε στην Ιταλία από τους Michele Amenta et al., εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις της θεραπείας με συμβιωτικό *zir FOS (Bifidobacterium longum W11 + FOS Actilight)*, σε χρόνια δυσκοιλιότητα ασθενών που ακολουθούσαν δίαιτα για απώλεια βάρους. Στην έρευνα αυτή συμμετείχαν 297 εθελοντές, άνδρες και γυναίκες, μέσης ηλικίας 32,2 ετών, και λήφθηκαν υπόψη η ηλικία, το φύλο, ύψος, βάρος, δείκτης μάζας σώματος (BMI), φυσική δραστηριότητα, δυσκοιλιότητα, διατροφή, θεραπεία με ελαστικό ήπιο καθαρτικό. Σαν συμβιωτικό συμπλήρωμα χρησιμοποιήθηκε το *zir fos1 bag* τη μέρα για όλη τη διάρκεια της μελέτης, με σκοπό να θεραπεύσει τη δυσκοιλιότητα. Η παρέμβαση επίσης περιελάμβανε μία μετριοπαθή υποθερμιδική δίαιτα (1,200/1,400 cal) σε όλους τους ασθενείς σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο, που περιελάμβανε καθημερινή κατανάλωση 5 ισοδυνάμων φρούτων και λαχανικών, και μια απλή φυσική δραστηριότητα (30 λεπτά τη μέρα περπάτημα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συμβιωτικά συνέβαλαν στη βελτίωση της δυσκοιλιότητας κατά τη διάρκεια μιας υποθερμιδικής δίαιτας, μετά από 20 μέρες χρήσης του συμπληρώματος. Η απαραίτητη δόση για να παρατηρηθεί βελτίωση της δυσκοιλιότητας, είναι 1 bag συμβιωτικού την ημέρα για τουλάχιστον 20 μέρες. Συμπερασματικά, το συμβιωτικό ρύθμιζε τη δυσβίωση, που είναι συχνά παρούσα κατά τη διάρκεια υποθερμιδικής δίαιτας, γεγονός που το καθιστά χρήσιμο θεραπευτικό φάρμακο για τη δυσκοιλιότητα. Το *zir fos* δρώντας στην κινητικότητα της μετανάστευσης των συμπλόκων (acting on the migration motor complexes), ρυθμίζει την εντερική μεταφορά και βελτιώνει τη δυσκοιλιότητα. Επιπλέον, αυξάνει το νερό στο εντερικό περιεχόμενο, κάνοντας τα κόπρανα πιο ογκώδη και πιο μαλακά και διευκόλυνε την εκκένωση στον τύπο Β δυσκοιλιότητας (Amenta et al., 2006).

Σε μία άλλη διπλά τυφλή μελέτη, που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, έλαβαν μέρος 137 ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν προ- και πρε-βιοτικά πριν υποβληθούν σε προγραμματισμένη εγχείρηση. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, εκ των οποίων στη μία δόθηκε συμβιωτικό (προβιοτικά σε μορφή κάψουλας, 3 φορές τη μέρα και πρεβιοτικά (ολιγοφρουκτόζη) σε μορφή σκόνης 2 φορές τη μέρα) και στην άλλη placebo. Η διάρκεια της παρέμβασης ήταν 2 εβδομάδες. Τελικά, δεν προέκυψε κάποια απόδειξη οφέλους των συμβιωτικών σε προεγχειρητικούς ασθενείς, αφού δεν επηρέασαν σημαντικά τη δημιουργία αποικιών, το βακτηριακό εκτόπισμα, τη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση και τη νοσηρότητα της σήψης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δε χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί, ώστε να επιβιώσουν, ότι η δόση ήταν αρκετά χαμηλή και ότι οι ασθενείς δε συμμορφώθηκαν με τις συστάσεις των ερευνητών. Όλα τα παραπάνω αποτελούν τους περιορισμούς της παραπάνω μελέτης (Karakan et al., 2007).

Κεφάλαιο 2. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να αξιολογηθούν οι πρεβιοτικές ιδιότητες επιλεγμένων ολιγοσακχαριτών (ινουλίνη και φρουκτοολιγοσακχαρίτες), καθώς και διαιτητικών ινών (β-γλουκάνη από κριθάρι και βρώμη), *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται κατά πόσο, και εάν, μεταβάλλεται ο αριθμός συγκεκριμένων μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας, όταν καλλιεργηθούν οι συγκεκριμένοι υδατάνθρακες σε κλειστές καλλιέργειες.

Κεφάλαιο 3. Ερευνητική Μελέτη

3.1 Εθελοντές - Εμβόλιο

Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε προέρχονταν από κόπρανα τριών διαφορετικών εθελοντών. Για κάθε δοκιμή χρησιμοποιούνταν το εμβόλιο από ένα εθελοντή, έτσι ώστε να υπάρχουν τελικά τρεις επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας. Οι τρεις εθελοντές που συμμετείχαν, ήταν υγιείς, δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά ή σκευάσματα προβιοτικών τους τελευταίους τρεις μήνες και η ηλικία τους κυμαίνονταν μεταξύ 22-40 ετών. Η απαιτούμενη ποσότητα κοπράνων που τους ζητήθηκε ήταν περίπου 20g, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ειδικούς αποστειρωμένους συλλέκτες. Στη συνέχεια, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά τους υπό αναερόβιες συνθήκες, μεταφέρθηκαν οι συλλέκτες σε σακούλες GENbag aner 45534 . Για τον έλεγχο των αναερόβιων συνθηκών χρησιμοποιήθηκε δείκτης ελέγχου αναερόβιων συνθηκών.

3.1.1 Καλλιέργεια κλειστού τύπου (batch) με αποκλειστική πηγή C τους υδατάνθρακες: ινουλίνη, β-γλουκάνη από κριθάρι και από βρώμη και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες

Η καλλιέργεια της εντερικής μικροχλωρίδας στους διαφορετικούς υδατάνθρακες πραγματοποιήθηκε σε φιάλες Durham των 50 ml υπό αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία 37°C για 48 ώρες. Οι καλλιέργειες ήταν στατικές.

Το υπόστρωμα περιελάμβανε ένα Βασικό θρεπτικό μέσο (basal culture medium) έτσι ώστε να εξασφαλίζονται οι απαραίτητες επιμέρους θρεπτικές απαιτήσεις των μικροοργανισμών της εντερικής μικροχλωρίδας, στο οποίο διαλύονταν ο υδατάνθρακας κάθε φορά.

Υλικά:

Basal culture medium (Rycroft et al. 2001)

- 2 g/L peptone water

- 2 g/L yeast extract
- 0,1 g/L NaCl
- 0,04 g/L K_2HPO_4
- 0,04 g/L KH_2PO_4
- 0,01 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,01 g/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (ή 0,01 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 2 g/L $NaHCO_3$
- 0,5 g/L cysteine-HCl
- 0,5 g/L bile salts
- 0,05 g/L hemin (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες 1 M NaOH) (0,005-0,02 g άλλοι)
- 2 ml/L Tween 80
- 10μl/L vitamin K1 (10μg/ml)
- 0,001 g/L rezazurin (Steer et al. 2003 ή 4 ml/L rezazurin solution (0,025% w/v sol) (Palframan R.J. et al 2001)

Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 7,0 με 1M HCl (Rycroft et al. 2001)

Σε μπουκάλια Durham των 50 ml τοποθετούμε 45 ml του Basal culture medium και υποβάλουμε σε αποστείρωση στους 121°C για 15min (1 μπουκάλι Durham ανά CHO). Προσθέσουμε με ασηπτική τεχνική στα μπουκάλια Durham, 0,45gr από κάθε υδαάνθρακα (1%κ.ο.) Όσο είναι ακόμα ζεστό το υλικό, το τοποθετούμε στον αναερόβιο θάλαμο για 24 h για να παραμείνει σε αναερόβιες συνθήκες και να διατηρήσει τις αναγωγικές του ιδιότητες.

ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Για το εμβόλιο της κάθε καλλιέργειας ζυγίζονται ~5g κοπράνων σε αποστειρωμένο φιαλίδιο universal και αμέσως μεταφέρονται στον αναερόβιο θάλαμο όπου προστίθενται στη φιάλη με το υπόστρωμα. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με σιφώνιο, έτσι ώστε το εμβόλιο να διαλυθεί σε όλο τον όγκο του υποστρώματος. Στη συνέχεια λαμβάνεται και το πρώτο δείγμα (t=0) όγκου 1ml

και ακολουθούν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και επίστρωση σε τρυβλία με εκλεκτικά και μη-εκλεκτικά υποστρώματα, για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών.

3.1.2 ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ- ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΥΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι μετρήσεις των μικροβιακών πληθυσμών γίνονται συνολικά σε 4 χρονικές στιγμές: 0, 8, 24 και 48 ώρες από τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Έτσι λαμβάνονται αντίστοιχα 4 δείγματα από τις καλλιέργειες (όγκου 1ml), τα οποία επεξεργάζονται στη συνέχεια, έτσι ώστε να μπορέσει να γίνει η καταμέτρηση των αποικιών των διαφορετικών βακτηριακών ομάδων.

Η καταμέτρηση γίνεται με την μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και της επίστρωσης σε τρυβλία με εκλεκτικά και μη-εκλεκτικά υποστρώματα.

Οι διαδοχικές αραιώσεις γίνονται σε φιαλίδια universal και το μέσο της αραιώσης είναι το πεπτονούχο νερό (1/2 δύναμης), το οποίο εξασφαλίζει αναγωγικές συνθήκες. Η διαδικασία γίνεται σε αναερόβιες συνθήκες.

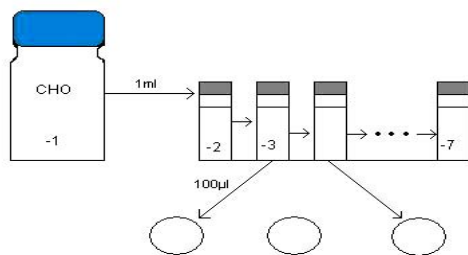
½ strenght-peptone water (για διαδοχικές αραιώσεις) (Steer et al 2003)

- 1 g/L peptone
- 0,5 g/L cysteine-HCl

Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 0,7 με διάλυμα NaOH 4M, διανομή ανά 9 ml σε φιαλίδια Universal, αποστείρωση και βράσιμο 20' πριν την χρήση (pre-reduced) και αφήνονται να κρυώσουν, πριν εισέρθουν στον αναερόβιο θάλαμο.

Το δείγμα που αφαιρείται κάθε φορά από την καλλιέργεια (1ml) μεταφέρεται σε ένα φιαλίδιο Universal, που περιέχει 9ml ½ strenght-peptone water και ακολουθεί ανάδευση. Το τελευταίο αποτελεί την 10^{-2} αραιώση του δείγματος. Στη συνέχεια, από αυτό λαμβάνεται ποσότητα ίση με 1ml και τοποθετείται στο επόμενο φιαλίδιο Universal, που αποτελεί την αραιώση 10^{-3} . Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται

μέχρι την 10^{-7} αραιώση και για κάθε υδατόνθρακα ξεχωριστά. Η αραιώση 10^{-1} είναι η ίδια η καλλιέργεια λόγω της αναλογίας του εμβολίου που προστέθηκε. Τελικά από κάθε υδατόνθρακα έχουν προκύψει 7 διαφορετικές αραιώσεις (10^{-1} - 10^{-7}), από τις οποίες λαμβάνονται, με πιπέτα, 100μL και επιστρώνονται στα τρυβλία, σύμφωνα με τις συγκεκριμένες αραιώσεις ανά υλικό και με τη βοήθεια κεκαμμένης γυάλινης ράβδου. Η διαδικασία της επίστρωσης γίνεται σε αναερόβιες συνθήκες τόσο για τους αναερόβιους όσο και για τους αερόβιους μικροοργανισμούς.



Οι αραιώσεις του δείγματος που χρησιμοποιούνται για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση των βακτηριακών πληθυσμών ποικίλει (πρέπει αριθμός αποικιών σε κάθε τρυβλίο να κυμαίνεται μεταξύ 30-300, μετά την επώαση).. Κάθε φορά πριν την επιλογή των κατάλληλων αραιώσεων (2-3 αραιώσεις) ελέγχουμε τα αποτελέσματα των προηγούμενων δειγματοληψιών αναφορικά με τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών.

3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

3.2.1 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ

3.2.1.1 Συνολική εντερική μικροχλωρίδα.

Για την καταμέτρηση της συνολικής εντερικής μικροχλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης Columbia Blood Agar (CBA), εμπλουτισμένο με 5% αποστειρωμένο αίμα (50ml αίματος ανά 100ml τελικού όγκου θρεπτικού υλικού). Σε 950ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 42g Columbia Agar και 5g άγαρ και γίνεται αποστείρωση του υλικού στους 121°C για 15 λεπτά. Η προσθήκη του αίματος (Defibrinated Horse blood) πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες ύστερα από την αποστείρωση του υλικού και την ψύξη του σε θερμοκρασία 45-50°C. Το CBA, όπως όλα τα στερεά θρεπτικά υλικά, μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90nm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/ τρυβλίο.

Τα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες για την καταμέτρηση της συνολικής αερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας και σε αναερόβιες συνθήκες αντίστοιχα για την καταμέτρηση της συνολικής αναερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

3.2.1.2 Bacteroides spp.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των *Bacteroides spp.* είναι το Wilkins-Chalgren anaerobe agar (OXOID, CM0619) εμπλουτισμένο με το συμπλήρωμα G-N Anaerobe supplement (ανά φιαλίδιο περιέχει 2.5mg Hemin, 0.25mg Menadione, 1.25mg Sodium succinate, 5mg Nalidixic Acid, 1.25mg Vancomycin) (OXOID, SR0108) και 5% αποστειρωμένο αίμα. Συγκεκριμένα, για

την παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 21,5g Wilkins-Chalgren anaerobe agar σε 475ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά, και αποστειρώνονται επιπλέον, τουλάχιστον 10ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για το G-N Anaerobe supplement. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται, αφού ψυχθούν καλά, τα 10ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο G-N Anaerobe supplement εντός του θαλάμου νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες. Ψύχεται το θρεπτικό υλικό στους 50-55°C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το περιεχόμενο του φιαλιδίου G-N Anaerobe supplement καθώς και 25ml defibrinated horse blood. Αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται το υλικό εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C μακριά από το φως και χρησιμοποιούνται το αργότερο σε 72 ώρες.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες. Τα *Bacteroides spp.* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλλοι μικρού μήκους, οι οποίοι δίνουν αποικίες χρώματος γκρι/ άσπρο στο εμπλουτισμένο Wilkins-Chalgren anaerobe agar.

3.2.1.3 *Clostridium perfringens*

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *Clostridium perfringens* είναι το Perfringens Agar Base (Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar) (LAB194) εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό D-Cycloserine (X194). Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 23g Perfringens Agar Base σε 500ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 10 λεπτά, ενώ ταυτόχρονα, αποστειρώνονται και τουλάχιστον 5ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για τη διάλυση του D-Cycloserine. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται, αφού ψυχθούν καλά τα 5ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο D-Cycloserine εντός του θαλάμου νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες, έτσι ώστε να

διαλυθεί το περιεχόμενο. Το θρεπτικό υλικό ψύχεται στους 50-55°C και προστίθεται, υπό ασηπτικές συνθήκες, το διάλυμα του D-Cycloserine. Πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση και μοιράζεται το υλικό σε τρυβλία, εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C στο σκοτάδι έως και 7 ημέρες.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 18-24 ώρες. Τα κύτταρα του *Clostridium perfringens* είναι Gram(+), καταλάση (-), βάκιλλοι, που σχηματίζουν ενδοσπόρια και δίνουν αποικίες μαύρου χρώματος στο εμπλουτισμένο Perfringens Agar Base. Όλες οι αποικίες με χρώμα μαύρο στο Perfringens Agar Base καταμετρώνται ως ενδεχόμενα *Clostridium perfringens*.

3.2.1.4 Λακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus* spp.)

Για την καταμέτρηση και απομόνωση του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Rogosa agar (1.05413.0500, MERCK). Η προετοιμασία του Rogosa agar απαιτεί την ανάμιξη 74,5g υλικού σε 1000ml απιονισμένου ύδατος, ρύθμιση του pH με τη βοήθεια οξικού οξέος στη τιμή 5,5+-0,2 στους 25°C, θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση, και ψύξη στους 40-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C και καταναλώνονται το αργότερο μέσα σε 3-4 ημέρες.

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των λακτοβακίλλων στο εκλεκτικό υλικό Rogosa agar πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες. Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram(+), καταλάση (-) βάκιλλοι ποικίλου μεγέθους.

3.2.1.5 Μπιφιδοβακτήρια (*Bifidobacterium* spp.)

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Bifidobacterium* χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υλικό Beerens' agar. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ανά 1000ml είναι 42,5g Columbia Agar Base, 5g άγαρ με συνολική τελική

συγκέντρωση 15g άγαρ/L, 5g γλυκόζης, 0,5g υδροχλωρική κυστεΐνη (g HCL cysteine.H₂O = g HCL cysteine X 175.64/157,64) ως αναγωγικός παράγοντας και 5ml προπιονικού οξέος ως εκλεκτικός παράγοντας των μπιφιδοβακτηρίων. Αρχικά, προστίθενται το Columbia Agar Base, το άγαρ και η υδροχλωρική κυστεΐνη στο απιονισμένο νερό, και το υλικό υποβάλλεται σε βρασμό μέχρι διάλυσης. Στη συνέχεια, το υλικό ψύχεται στους 40-50°C, προστίθενται η γλυκόζη και το προπιονικό οξύ, προκαλείται διάλυση με ανάδευση και γίνεται ρύθμιση του pH στο 5 ± 0,1 με διάλυμα NaOH 1N. Το Beerens' agar δεν απαιτεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο και πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 48 ωρών από την παρασκευή του.

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των μπιφιδοβακτηρίων στο εκλεκτικό υλικό Beerens' πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72 ώρες. Τα μπιφιδοβακτήρια είναι Gram(+), καταλάση (-) βάκιλλοι σχήματος Υ ή με ροπαλοειδείς υφές.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΕΡΟΒΙΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

3.2.1.6 Ολικά κολίμορφα / E.coli (Total coliforms/ E. coli)

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ολικών κολίμορφων και του *Escherichia coli* είναι το Chromocult Coliform agar. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 26,5g Chromocult Coliform agar σε 1000ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά, υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού, χωρίς αποστείρωση, και ψύξη στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 4°C μακριά από το φως έως και έξι μήνες.

Η επώαση των ολικών κολίμορφων/ *E. coli* στο εκλεκτικό υλικό Chromocult Coliform agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24 ώρες. Το βακτήριο *E. coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο προς βιολετί, ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών και των μπλε σκούρο προς βιολετί αποικιών του *E. coli*. Αποικίες χρώματος

ανοιχτό μπλε/ τυρκουάζ ή αποικίες χωρίς χρώμα δεν καταμετρώνται. Τα ολικά κολίμορφα και το *E. coli* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλλοι μικρού μήκους.

3.2.1.7 Εντερόκοκκοι (*Enterococcus* spp.)

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των εντερόκοκκων είναι το Slanetz & Bartley medium (LAB166). Για την παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 43,5g Slanetz & Bartley medium σε 1000ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά, υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού, χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45°C-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C έως και 7 ημέρες.

Η επώαση των εντερόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Slanetz & Bartley medium πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι κόκκινες και καστανέρυθρες αποικίες καταμετρώνται ως ενδεχόμενοι εντερόκοκκοι. Οι εντερόκοκκοι είναι Gram(+), καταλάση (-) κόκκοι.

3.2.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ – ΧΡΩΣΗ GRAM – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ- ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Μετά την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων και την επώαση των τρυβλίων υπό τις κατάλληλες συνθήκες, πραγματοποιείται περιγραφή της μορφολογίας των παρατηρούμενων αποικιών στα εκλεκτικά υλικά, βάσει του πίνακα που παρατίθεται. Μετά την περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών ακολουθεί η χρώση Gram, η δοκιμασία καταλάσης και η παρατήρηση των χρώσεων στο μικροσκόπιο.

3.2.2.1 Η διαδικασία της χρώσης Gram

Σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρεται μια μικρή σταγόνα απιονισμένου ύδατος με το σταγονόμετρο. Αποστειρώνεται στη φλόγα ο βακτηριολογικός

κρίκος και αφού κρυώσει μεταφέρεται μια πολύ μικρή ποσότητα της καλλιέργειας και αναμιγνύεται με το νερό στην αντικειμενοφόρο απλώνοντάς την. Ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώνεται πριν τοποθετηθεί στον πάγκο. Αφήνεται η αντικειμενοφόρος να στεγνώσει κανονικά και την περνάμε πάνω από την φλόγα του λύχνου για να θανατωθούν τα κύτταρα και να προσηλωθούν στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου (**βακτηριακό επίχρισμα**).

Διαδικασία χρώσης

- Καλύπτεται το βακτηριακό επίχρισμα με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και αφήνεται για 20 sec
- Ξεπλένεται η περίσσεια της χρωστικής με λίγο αποσταγμένο νερό (2 sec)
- Καλύπτεται το επίχρισμα με διάλυμα ιωδίου Gram (Lugol) και αφήνεται για ένα λεπτό.
- Απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος ιωδίου Gram και καλύπτεται η αντικειμενοφόρος με 95% αλκοόλη για 10-29 sec ή μέχρις ότου ο διαλύτης να εκρέει από την αντικειμενοφόρο άχρωμος. Το στάδιο αυτό απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.
- Διακόπτεται η δράση της αλκοόλης πλένοντας την αντικειμενοφόρο με νερό (2 sec)
- Καλύπτεται το επίχρισμα με σαφρανίνη για 20 sec
- Πλένεται προσεκτικά για μερικά δευτερόλεπτα (2 sec), τοποθετείται η αντικειμενοφόρος ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού για να απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα.
- Εξετάζεται το παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο πρώτα με το φακό 40X για εστίαση και μετά με τον ελαιοκαταδυτικό φακό (100X) αφού έχει τοποθετηθεί πρώτα μια μικρή σταγόνα κεδρέλαιου πάνω στη χρώση.

3.2.2.2 Η διαδικασία της δοκιμασίας καταλάσης

Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται μια μικρή σταγόνα 3% H₂O₂. Αποστειρώνεται στη φλόγα ο βακτηριολογικός κρίκος και αφού κρυώσει μεταφέρεται μια πολύ μικρή ποσότητα της καλλιέργειας και αναμιγνύεται με την

3% H₂O₂ στην αντικειμενοφόρο απλώνοντάς την. Εάν παρατηρηθεί αφρισμός, χαρακτηρίζεται ο μικροοργανισμός ως θετικός στη δοκιμασία της καταλάσης [καταλάση (+)].

3.2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΜΕΛΕΤΗΘΟΥΝ

- Τα κύτταρα του *Bacteroides* spp. είναι Gram (-), καταλάση (+) ή (-), βάκιλλοι μικρού μήκους (Wilkins-Chalgren)
- Τα κύτταρα του *Clostridium perfringens* είναι Gram (+), καταλάση(-) βάκιλλοι που σχηματίζουν ενδοσπόρια (TSC agar)
- Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram (+), καταλάση (-) βάκιλλοι ποικίλου μεγέθους. (Rogosa agar)
- Τα μπιφιδοβακτήρια είναι Gram (+), καταλάση (-) βάκιλλοι σχήματος Y ή με ροπαλοειδείς υφές. (Beeren's agar)
- Οι εντερόκοκκοι είναι Gram (+), καταλάση (-) κόκκοι (Slanetz & Bartley medium)
- Τα ολικά κολίμορφα και το *E. coli* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλλοι μικρού μήκους. (Chromocult Coliform agar)

Μετά την περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμασία καταλάσης και τη παρατήρηση των χρώσεων στο μικροσκόπιο πραγματοποιείται η καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών με τα αντίστοιχα επιθυμητά χαρακτηριστικά στις κατάλληλες αραιώσεις των εκλεκτικών υλικών.

ΕΞΑΙΡΕΣΗ στην παραπάνω διαδικασία αποτελούν τα CBA aer και CBA anaer στα οποία πραγματοποιείται απλή καταμέτρηση (χωρίς Gram) του συνόλου των αποικιών, προκειμένου να υπολογιστεί η συνολική μεσόφιλη αερόβια και αναερόβια μικροχλωρίδα αντίστοιχα.

3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Inc.) και το SPSS® for Windows Release 11.5. Η στατιστική επεξεργασία των μικροβιακών πληθυσμών και ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη (prebiotic index) θα πραγματοποιηθεί βάσει των μέσων τιμών των δεκαδικών λογαρίθμων των καταμετρήσεων των αποικιών στα δείγματα κοπράνων των τριών εθελοντών, με αναγωγή του πληθυσμού στο βάρος του αντίστοιχου δείγματος κοπράνων της δειγματοληψίας ($\log_{10}\text{CFU/g}$ κοπράνων).

Ο έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των μικροβιακών πληθυσμών των τεσσάρων υδατανθράκων θα πραγματοποιηθεί βάσει του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Εφόσον οι κατανομές των πληθυσμών είναι κανονικές, η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών προοπτικά για κάθε ένα υδατάνθρακα (0,8,24 και 48 ώρες) θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια του paired t-test (δοκιμασία t για εξαρτημένα δείγματα) και η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών των τεσσάρων υδατανθράκων για κάθε χρονική στιγμή θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης (one-way ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha= 0,05$.

Αν και ο πρεβιοτικός δείκτης δεν υφίσταται στατιστική επεξεργασία, σε αυτό το σημείο θα ήταν καλό να αναφερθεί η εξίσωση με την οποία γίνεται ο υπολογισμός του (Palframan et al., 2005; Olano-Martin et al., 2002):

$$PI_{t(x)} = [(\Delta \log_{10} \text{Bifidobacteria})_{t(x)-t(0)} + (\Delta \log_{10} \text{Lacobacillus})_{t(x)-t(0)} - (\Delta \log_{10} \text{Bacteroides})_{t(x)-t(0)} - (\Delta \log_{10} \text{Clostridium})_{t(x)-t(0)}] / (\log_{10} \text{Total Counts})_{t(0)}$$

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

Στην παρούσα *in vitro* μελέτη της ζύμωσης 4 υδατανθράκων από μικροοργανισμούς της εντερικής μικροχλωρίδας, συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων από τρεις υγιείς εθελοντές, με τα οποία εμβολιάστηκαν οι τέσσερις υδατάνθρακες, προκειμένου να εξεταστεί η πρεβιοτική δράση των τελευταίων, σύμφωνα με τις μεταβολές που προκαλούν ή όχι, στους πληθυσμούς των βακτηρίων που υπάρχουν στα κόπρανα. Από τις καταμετρήσεις που έγιναν προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα, τα οποία παρατίθενται παρακάτω για κάθε υδατάνθρακα χωριστά.

4.1.1 Αποκλειστική πηγή C: ΙΝΟΥΛΙΝΗ

Οι μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν, όταν η αποκλειστική πηγή άνθρακα ήταν η ινουλίνη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 που ακολουθεί.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί παρουσιάζονται ως $\log_{10}\text{cfu/gr}$ κοπράνων. CFU: colony forming units αντιστοιχεί στον όρο «Βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες», που ισοδυναμεί με τον αριθμό των αποικιών που καταμετρώνται.

Πίνακας 6 Μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο χρόνο, με αποκλειστική πηγή C την ινουλίνη

	INU			
	0	8	24	48
Ολική αερόβια μικροχλωρίδα	8,33 ± 1,00	7,72 ± 1,49	6,42 ± 1,06*	4,56 ± 3,43
Ολικά κολίμορφα	7,66 ± 0,78	6,20 ± 1,72	2,90 ± 1,66*†	1,76 ± 1,31*†
<i>E. coli</i>	7,63 ± 0,79	6,19 ± 1,73	2,90 ± 1,66*†	1,76 ± 1,31*†
Εντερόκοκκοι	5,91 ± 0,96	4,46 ± 1,15	3,37 ± 0,84*	2,71 ± 1,49*
Ολική αναερόβια μικροχλωρίδα	9,36 ± 0,28	9,62 ± 0,18	8,63 ± 0,50	8,01 ± 0,31*†‡
<i>Clostridium perfringens</i>	4,41 ± 0,86	3,39 ± 0,99*	3,26 ± 0,54*	3,20 ± 0,88*
Λακτοβάκιλλοι	3,94 ± 0,75	3,43 ± 0,79	3,87 ± 1,62	4,67 ± 3,69
<i>Bacteroides spp.</i>	8,18 ± 0,42	7,97 ± 0,85	7,19 ± 1,38	5,30 ± 1,68†
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8,81 ± 0,24	9,17 ± 0,30	8,01 ± 0,75	5,47 ± 1,72

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο (0 ώρες)

† στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 8 ώρες

‡ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 24 ώρες

INU=ινουλίνη

Οι πληθυσμοί εκφράζονται σε log₁₀CFU/g κοπράνων και οι τιμές (μέσος ± τυπική απόκλιση) προκύπτουν από τα δεδομένα των τριών εθελοντών

Παρατηρούμε ότι τα ολικά αερόβια βακτήρια παρουσίασαν γενικότερα μείωση. Όταν έγινε σύγκριση του πληθυσμού που καταμετρήθηκε στις 24 ώρες σε σχέση με το εμβόλιο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης υπήρξε τάση μείωσης του πληθυσμού των 24 ωρών σε σχέση με το δείγμα των 8 ωρών.

Όσον αφορά τα ολικά κολίμορφα, ο αριθμός τους μειώθηκε σημαντικά μετά από 24 και 48 ώρες επώασης συγκρινόμενος με το εμβόλιο (t=0). Επίσης στατιστικά σημαντική μείωση είχαν οι πληθυσμοί αυτής της κατηγορίας στις 24 και στις 48 ώρες επώασης συγκρινόμενοι με τους πληθυσμούς στις 8 ώρες. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα για τον πληθυσμό του *E. coli*.

Στους εντερόκοκκους διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού τους μετά από 24 και 48 ώρες επώασης στην ινουλίνη, αλλά διαφαίνεται και μία τάση μείωσης στους πληθυσμούς αυτούς μετά από 24 ώρες, συγκρινόμενα με τα επίπεδα των πληθυσμών που υπήρχαν στις 8 ώρες καλλιέργειας στην ινουλίνη.

Η ολική αναερόβια μικροχλωρίδα μειώθηκε σημαντικά μετά από 48 ώρες επώασης σε σύγκριση με το εμβόλιο ($t=0$), αλλά και με τα επίπεδα των πληθυσμών στις 8 και 24 ώρες καλλιέργειας στην ινουλίνη. Επίσης φαίνεται μία τάση μείωσης ήδη από τις 8 ώρες επώασης συγκρινόμενη με το εμβόλιο ($t=0$).

Ο πληθυσμός των κλωστριδίων μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις χρονικές στιγμές (8, 24, 48 ώρες) που έγινε δειγματοληψία κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας στην ινουλίνη, συγκρινόμενο με το εμβόλιο ($t=0$).

Οι λακτοβάκιλλοι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των πληθυσμών τους σε καμία χρονική στιγμή δειγματοληψίας, αλλά φαίνεται ότι μειώνονται ελαφρά μετά από 8 ώρες επώασης, ενώ μετά τις 24 ώρες (δείγματα 24 και 48 ωρών) αυξάνονται οι πληθυσμοί τους σταδιακά ($3,87 \pm 1,62$ και $4,67 \pm 3,69 \log_{10} \text{cfu/gr}$) σε σύγκριση με τον πληθυσμό που είχαν στις 8 ώρες.

Στον πληθυσμό του γένους Bacteroides παρατηρήθηκε τάση μείωσης μετά από 48 ώρες καλλιέργειας συγκρινόμενη με το εμβόλιο ($t=0$), όπως επίσης και με τα επίπεδα του πληθυσμού στις 24 ώρες. Φαίνεται όμως ότι η αλλαγή ήταν πιο δραστική μεταξύ των επιπέδων των πληθυσμών που καταμετρήθηκαν στις 8 και στις 48 ώρες, όπου σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τέλος, ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων παρουσίασε μία τάση αύξησης μετά τις πρώτες 8 ώρες επώασης, ενώ στη συνέχεια η τάση αυτή αντιστράφηκε και παρατηρείται τάση μείωσης του πληθυσμού στις 48 ώρες καλλιέργειας συγκρινόμενου με τον αρχικό πληθυσμό και με εκείνον που είχε αναπτυχθεί στις 8 ώρες. Επίσης ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων στις 24 ώρες επώασης, παρουσιάζει τάση μείωσης συγκρινόμενος με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες επώασης.

Πρεβιοτικός δείκτης για το υπόστρωμα της ινουλίνης

Εφαρμόζοντας την εξίσωση που περιγράφεται στη σελίδα (78) στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης για την ινουλίνη σε κάθε χρονική στιγμή, αξιοποιώντας τις μετρήσεις των πληθυσμών ($\log_{10}\text{CFU/gr}$ κοπράνων) από τις εξής κατηγορίες μικροοργανισμών: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* spp. και ολική αναερόβια μικροχλωρίδα

Π.Δ. για τις 8 ώρες: 0,112

Π.Δ. για τις 24 ώρες: 0,147

Π.Δ. για τις 48 ώρες: 0,185

4.1.2 Αποκλειστική πηγή C: β-ΓΛΟΥΚΑΝΗ από κριθάρι

Οι μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν, όταν η αποκλειστική πηγή άνθρακα ήταν η β-γλουκάνη από κριθάρι, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 που ακολουθεί.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί παρουσιάζονται ως $\log_{10}\text{cfu/gr}$ κοπράνων. CFU: colony forming units αντιστοιχεί στον όρο «Βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες», που ισοδυναμεί με τον αριθμό των αποικιών που καταμετρώνται.

Πίνακας 7 Μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο χρόνο, με αποκλειστική πηγή C την β-γλουκάνη από κριθάρι

	BAR			
	0	8	24	48
Ολική αερόβια μικροχλωρίδα	8,07 ± 1,40	7,93 ± 1,07	6,77 ± 1,40	6,48 ± 1,77
Ολικά κολίμορφα	7,72 ± 0,82	7,26 ± 0,74	4,84 ± 1,30 ^{*†}	2,87 ± 2,43 [†]
<i>E. coli</i>	7,70 ± 0,82	7,26 ± 0,74	4,84 ± 1,30 ^{*†}	2,87 ± 2,43 ^{*†}
Εντερόκοκκοι	5,63 ± 1,17	4,63 ± 1,48	3,57 ± 2,40	3,26 ± 2,05
Ολική αναερόβια μικροχλωρίδα	9,52 ± 0,15	9,47 ± 0,36	8,64 ± 0,32 ^{*†}	7,99 ± 0,79
<i>Clostridium perfringens</i>	4,46 ± 0,97	3,53 ± 0,79 [*]	3,20 ± 0,37	3,13 ± 0,61 [*]
Λακτοβάκιλλοι	4,01 ± 0,88	3,81 ± 0,82	4,52 ± 3,31	4,19 ± 3,99
<i>Bacteroides spp.</i>	8,42 ± 0,28	8,21 ± 0,68	7,42 ± 0,72	5,20 ± 3,63
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,11 ± 0,43	9,37 ± 0,62	7,99 ± 0,72 ^{*†}	4,66 ± 3,17

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο (0 ώρες)

† στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 8 ώρες

‡ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 24 ώρες

BAR=β-γλουκάνη από κριθάρι

Οι πληθυσμοί εκφράζονται σε log10CFU/g κοπράνων και οι τιμές (μέσος ± τυπική απόκλιση) προκύπτουν από τα δεδομένα των τριών εθελοντών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7, η ολική αερόβια μικροχλωρίδα, με τη χρήση β-γλουκάνης από κριθάρι ως αποκλειστική πηγή C, φαίνεται να μειώνεται σταδιακά σε όλες τις χρονικές στιγμές της δειγματοληψίας (t=8, 24 και 48 ώρες) αν και η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Τα ολικά κολίμορφα βακτήρια μειώθηκαν σταδιακά μέσα στο χρόνο και αυτά, αλλά εδώ παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν στις 24 ώρες συγκρινόμενα με το εμβόλιο (t=0), αλλά και με τον πληθυσμό που σημειώθηκε στις 8 ώρες επώασης. Επίσης σημαντική διαφορά παρουσίασε ο πληθυσμός των 48 ωρών συγκρινόμενος με τον πληθυσμό που σημειώθηκε στις 8 ώρες επώασης, ενώ σε σχέση με το εμβόλιο παρουσίασε μόνο τάση μείωσης.

Όπως αναμενόταν από τα παραπάνω αποτελέσματα, ο πληθυσμός του βακτηρίου E. coli μειώθηκε και αυτός. Μετά από την στατιστική επεξεργασία φάνηκε ότι σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που καταμετρήθηκαν στις 24 και 48 ώρες όταν συγκρίνονται με το και με τον πληθυσμό που παρατηρήθηκε στις 8 ώρες.

Στους εντερόκοκκους αν και φαίνεται ότι οι πληθυσμοί τους μειώνονται στον χρόνο, δε προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη σύγκριση των πληθυσμών στις διαφορετικές χρονικές στιγμές. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός των εντεροκόκκων που καταμετρήθηκε στις 48 ώρες παρουσίαζε τάση μείωσης σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο και με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες.,

Για τα ολικά αναερόβια βακτήρια φαίνεται ότι μειώνεται κατά τρόπο στατιστικά σημαντικό ο πληθυσμός τους μετά από 24 ώρες καλλιέργειας με αποκλειστική πηγή C τη β-γλουκάνη από κριθάρι, συγκρινόμενο με το εμβόλιο αλλά και με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες. Ο πληθυσμός των 48 ωρών αν και μειώθηκε σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο και με τα αντίστοιχα επίπεδα που παρουσίασε στις 8 ώρες, δεν σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά, αλλά τάση μείωσης.

Ο πληθυσμός των κλωστριδίων μειώθηκε κατά τις 48 ώρες καλλιέργειας με αποκλειστική πηγή C τη β-γλουκάνη από κριθάρι και μάλιστα σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δειγματοληψίες μετά από 8, και 48 ώρες επώασης συγκρινόμενα με το εμβόλιο και τάση μείωσης του πληθυσμού των 24 ωρών πάλι συγκρινόμενο με το εμβόλιο ($t=0$)

Οι λακτοβάκιλλοι έμειναν σχετικά ανεπηρέαστοι, με μια αρχική μείωση του πληθυσμού τους μετά από τις 8 ώρες επώασης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, ακόλουθη αύξηση στις 24 ώρες και σταθεροποίηση (48 ώρες) κοντά στον αρχικό τους πληθυσμό, χωρίς να υπάρξει κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Ο πληθυσμός του γένους Bacteroides αν και μειώθηκε στην πορεία του χρόνου της καλλιέργειας, η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική πιθανόν λόγω των μεγάλων τυπικών αποκλίσεων.

Τέλος, τα μπιφιδοβακτήρια αν και μέχρι τις 8 ώρες καλλιέργειας αυξήθηκαν, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα, στη συνέχεια μειώθηκαν. Μάλιστα η μείωση του πληθυσμού τους που παρατηρήθηκε στις 24 ώρες σε σχέση με τον πληθυσμό του εμβολίου και εκείνου στις 8 ώρες, ήταν στατιστικά σημαντική.

Πρεβιοτικός δείκτης για το υπόστρωμα της β-γλουκάνης από κριθάρι

Εφαρμόζοντας την εξίσωση που περιγράφεται στη σελίδα (78) στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης για τη β-γλουκάνη από κριθάρι, σε κάθε χρονική στιγμή, αξιοποιώντας τις μετρήσεις των πληθυσμών ($\log_{10}\text{CFU/gr}$ κοπράνων) από τις εξής κατηγορίες μικροοργανισμών: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* spp. και ολική αναερόβια μικροχλωρίδα

Π.Δ. για τις 8 ώρες: 0,127

Π.Δ. για τις 24 ώρες: 0,191

Π.Δ. για τις 48 ώρες: 0,035

4.1.3 Αποκλειστική πηγή C: β-ΓΛΟΥΚΑΝΗ από βρώμη

Οι μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν, όταν η αποκλειστική πηγή άνθρακα ήταν η β-γλουκάνη από βρώμη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 που ακολουθεί.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί παρουσιάζονται ως $\log_{10}\text{cfu/gr}$ κοπράνων. CFU: colony forming units αντιστοιχεί στον όρο «Βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες», που ισοδυναμεί με τον αριθμό των αποικιών που καταμετρώνται.

Πίνακας 8 Μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο χρόνο, με αποκλειστική πηγή C την β-γλουκάνη από βρώμη

	OAT			
	0	8	24	48
Ολική αερόβια μικροχλωρίδα	7,85 ± 1,10	8,10 ± 0,96	6,43 ± 0,16	4,02 ± 2,68
Ολικά κοκκίμορφα	7,68 ± 0,74	6,62 ± 1,88	4,67 ± 1,75 [†]	2,00 ± 1,72 ^{*†‡}
<i>E. coli</i>	7,67 ± 0,74	6,60 ± 1,90	4,66 ± 1,77 [†]	2,00 ± 1,72 ^{*†‡}
Εντερόκοκκοι	5,70 ± 1,03	4,84 ± 1,39	4,20 ± 2,27	3,72 ± 2,60
Ολική αναερόβια μικροχλωρίδα	9,40 ± 0,57	9,38 ± 0,45	8,30 ± 0,30	7,55 ± 0,48 [†]
<i>Clostridium perfringens</i>	4,58 ± 1,03	3,33 ± 1,08 [*]	3,36 ± 0,61 [*]	3,33 ± 0,79 [*]
Λακτοβάκιλλοι	4,75 ± 1,32	4,12 ± 1,86	3,62 ± 1,19	2,33 ± 2,31
<i>Bacteroides</i> spp.	8,28 ± 0,39	8,35 ± 0,40	7,96 ± 0,37 [†]	6,83 ± 1,92
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,21 ± 0,59	8,32 ± 0,49	7,14 ± 1,34 [*]	3,64 ± 2,42

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο (0 ώρες)

† στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 8 ώρες

‡ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 24 ώρες

OAT=β-γλουκάνη από βρώμη

Οι πληθυσμοί εκφράζονται σε log₁₀CFU/g κοπράνων και οι τιμές (μέσος ± τυπική απόκλιση) προκύπτουν από τα δεδομένα των τριών εθελοντών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8, η ολική αερόβια μικροχλωρίδα, με τη χρήση β-γλουκάνης από βρώμη ως αποκλειστική πηγή C, φαίνεται να αυξάνεται μέχρι τις 8 ώρες και στη συνέχεια ο πληθυσμός της σταθερά μειώνεται αν και η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (υπήρχε μεγάλη τυπική απόκλιση, ιδιαίτερα στις 48 ώρες). Παρατηρήθηκε όμως μία τάση μείωσης μετά από σύγκριση του πληθυσμού των 24 ωρών με τον αντίστοιχο των 8 ωρών.

Τα ολικά κοκκίμορφα βακτήρια μειώνονται σε όλες τις δειγματοληψίες, στην πορεία του χρόνου. Η πτώση του πληθυσμού τους ήταν μάλιστα στατιστικά σημαντική στις 48 ώρες συγκρινόμενα με τον πληθυσμό που είχαν τόσο στο εμβόλιο, όσο και στις 8 ώρες αλλά και στις 24 ώρες καλλιέργειας. Όταν συγκρίθηκε ο πληθυσμός των 24 ωρών με τους αντίστοιχους του εμβολίου (t=0) και του δείγματος των 8 ωρών, βρέθηκε ότι παρουσιάζει τάση μείωσης και στατιστικά σημαντική διαφορά αντίστοιχα.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα για το E. coli, όταν συγκρίθηκαν οι πληθυσμός των 48 ωρών με τους πληθυσμούς των υπόλοιπων δειγματοληψιών ($t=0$, $t=8$, $t=24$). Αντίστοιχα συμπεράσματα με εκείνα των ολικών κολίμορφων βακτηρίων προέκυψαν μετά από την σύγκριση του πληθυσμού του *E.coli* στις 24 ώρες και των πληθυσμών των υπόλοιπων δειγματοληψιών ($t=0$, $t=8$).

Όσον αφορά τους εντερόκοκκους, ο αριθμός τους μειώθηκε αλλά όχι στατιστικά σημαντικά στην πορεία του χρόνου, πιθανά λόγω μεγάλων αποκλίσεων που σημειώθηκαν. Για τον πληθυσμό των εντερόκοκκων μετά από 8 ώρες καλλιέργειας παρατηρείται μία τάση μείωσης συγκρινόμενο με το αρχικό εμβόλιο.

Η ολική αναερόβια μικροχλωρίδα παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στις 48 ώρες, σε σχέση με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες καλλιέργειας. Όταν η σύγκριση του πληθυσμού των 48 ωρών έγινε με το εμβόλιο και με τον πληθυσμό των 24 ωρών παρουσιάστηκε απλά τάση μείωσης.

Ο πληθυσμός των κλωστριδίων μειώθηκε σταδιακά στο χρόνο. Ο πληθυσμός που καταμετρήθηκε μετά από 8, 24 και 48 ώρες καλλιέργειας μειώθηκε σημαντικά συγκρινόμενος με το αρχικό εμβόλιο,.

Ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων επίσης παρουσίασε μείωση κατά τη καλλιέργεια με αποκλειστική πηγή C τη β-γλουκάνη από βρώμη, αν και οι συγκρίσεις μεταξύ των πληθυσμών των λακτοβακίλλων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή. Μόνο τάσης μείωσης εμφανίστηκε από τη σύγκριση του πληθυσμού των 48 ωρών και εκείνου του αρχικού εμβολίου.

Τα βακτήρια του γένους Bacteroides επίσης, φαίνεται ότι στην αρχή (8 ώρες) παραμένουν σταθερά με ελαφρά αύξηση και στη συνέχεια μειώνονται. Μόνο

κατά τη σύγκριση του πληθυσμού των 24 ωρών καλλιέργειας με εκείνο της δειγματοληψίας των 8 ωρών φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τέλος ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων στις 24 ώρες παρουσίασε μείωση στατιστικά σημαντική συγκρινόμενος με το εμβόλιο ($t=0$). Σημειώθηκε επίσης μία τάση μείωσης μεταξύ των πληθυσμών που καταμετρήθηκαν στις 48 ώρες και του εμβολίου, όπως επίσης και τάση μείωσης φάνηκε μετά από τη σύγκριση του πληθυσμού των 48 ωρών καλλιέργειας και 8 ωρών αντίστοιχα.

Πρεβιοτικός δείκτης για το υπόστρωμα της β-γλουκάνης από βρώμη

Εφαρμόζοντας την εξίσωση που περιγράφεται στη σελίδα (78) στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης για τη β-γλουκάνη από βρώμη, σε κάθε χρονική στιγμή, αξιοποιώντας τις μετρήσεις των πληθυσμών ($\log_{10}\text{CFU/gr}$ κοπράνων) από τις εξής κατηγορίες μικροοργανισμών: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* spp. και ολική αναερόβια μικροχλωρίδα

Π.Δ. για τις 8 ώρες: -0,036

Π.Δ. για τις 24 ώρες: -0,200

Π.Δ. για τις 48 ώρες: -0,701

4.1.4 Αποκλειστική πηγή C: Φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS)

Οι μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν, όταν η αποκλειστική πηγή άνθρακα ήταν φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 που ακολουθεί.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί παρουσιάζονται ως $\log_{10}\text{cfu/gr}$ κοπράνων. CFU: colony forming units αντιστοιχεί στον όρο «Βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες», που ισοδυναμεί με τον αριθμό των αποικιών που καταμετρώνται.

Πίνακας 9 Μεταβολές του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο χρόνο, με αποκλειστική πηγή C φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες

	FOS			
	0	8	24	48
Ολική αερόβια μικροχλωρίδα	8,53 ± 1,21	7,27 ± 0,89	6,22 ± 0,72	5,68 ± 0,63
Ολικά κολίμορφα	7,62 ± 0,89	5,26 ± 2,10	2,86 ± 1,80 ^{††}	1,75 ± 1,30 ^{*†}
<i>E. coli</i>	7,61 ± 0,88	5,25 ± 2,10	2,86 ± 1,80 ^{††}	1,75 ± 1,30 [†]
Εντερόκοκκοι	5,54 ± 0,76	4,38 ± 1,48	3,52 ± 2,40	3,40 ± 2,22
Ολική αναερόβια μικροχλωρίδα	9,42 ± 0,43	9,03 ± 0,07	7,90 ± 1,13	7,16 ± 1,02 [‡]
<i>Clostridium perfringens</i>	4,39 ± 1,03	3,36 ± 0,82 [*]	3,18 ± 0,44	3,15 ± 0,59
Λακτοβάκιλλοι	4,13 ± 0,96	4,17 ± 0,59	4,00 ± 0,89	5,63 ± 1,24 [*]
<i>Bacteroides</i> spp.	8,27 ± 0,43	7,40 ± 1,22	6,87 ± 2,16	5,32 ± 3,76
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,02 ± 0,34	8,65 ± 0,58	7,13 ± 1,76	6,26 ± 1,71

* στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αρχικό εμβόλιο (0 ώρες)

† στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 8 ώρες

‡ στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις 24 ώρες

FOS=φρουκτοολιγοσακχαρίτες

Οι πληθυσμοί εκφράζονται σε log10CFU/g κοπράνων και οι τιμές (μέσος ± τυπική απόκλιση) προκύπτουν από τα δεδομένα των τριών εθελοντών

Παρατηρούμε ότι η ολική αερόβια μικροχλωρίδα, στη καλλιέργεια όπου αποκλειστική πηγή C είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες φαίνεται ότι μειώνεται σταδιακά μέσα στο χρόνο χωρίς να σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μόνο ο πληθυσμός που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες καλλιέργειας παρουσίασε μία τάση μείωσης συγκρινόμενος με το εμβόλιο.

Ο πληθυσμός των ολικών κολίμορφων βακτηρίων παρουσίασε πολύ πιο δραματικές αλλαγές στην πορεία του χρόνου, που αξιολογήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας με αποκλειστική πηγή C τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, ο πληθυσμός μειώνεται στατιστικά σημαντικά συγκρινόμενος με το εμβόλιο, αλλά και με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε μετά από 8 ώρες καλλιέργειας. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται και μεταξύ του πληθυσμού των 48 ωρών και των αντίστοιχων του εμβολίου και των 8 ωρών.

Αντίστοιχα κυμάνθηκαν και οι μεταβολές του πληθυσμού του βακτηρίου *E. coli*, με τις ίδιες στατιστικά σημαντικότητες. Φαίνεται μάλιστα ότι ο πληθυσμός των ολικών κολίμορφων να αποτελείται σχεδόν μόνο από κύτταρα του *E.coli*.

Ο πληθυσμός των εντερόκοκκων κατά την καλλιέργεια με αποκλειστική πηγή C τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, μειώνεται στο βάθος του χρόνου αλλά δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στους πληθυσμούς τους.

Η ολική αναερόβια μικροχλωρίδα μειώνεται και αυτή σταδιακά. Παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών που καταμετρήθηκαν στις 48 ώρες και του αντίστοιχου των 24 ωρών. Επίσης καταγράφεται τάση μείωσης όταν ο πληθυσμός των 48 ωρών συγκρίνεται με το εμβόλιο και με τον πληθυσμό των 8 ωρών.

Ο πληθυσμός των κλωστριδίων μειώνεται στην πορεία του χρόνου. Ο πληθυσμός που καταμετρήθηκε στο δείγμα των 8 ωρών ήταν στατιστικά μικρότερος από εκείνον του εμβολίου. Παρατηρήθηκε επίσης τάση μείωσης των πληθυσμών που καταμετρήθηκαν στις 24 και στις 48 ώρες, συγκρινόμενα με το εμβόλιο.

Ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων σημειώνει αύξηση στα δείγματα που ελήφθησαν στις 8 και 48 ώρες. Παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μετά από σύγκριση του πληθυσμού των 48 ωρών και εκείνον του εμβολίου. Επίσης ο τελικός αυτός πληθυσμός παρουσιάζει τάση αύξησης συγκρινόμενος με τον πληθυσμό που καταμετρήθηκε στις 8 ώρες καλλιέργειας, αλλά και στις 24 ώρες καλλιέργειας.

Ο πληθυσμός του γένους *Bacteroides* αν και φαίνεται ότι μειώνεται, παρόλα αυτά οι διαφορές στους πληθυσμούς στις διαφορετικές χρονικές στιγμές δεν παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα.

Τέλος, ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων φαίνεται από τον Πίνακα 9 ότι μειώνεται στο χρόνο. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών στις διαφορετικές χρονικές στιγμές, εκτός από τη σύγκριση μεταξύ των πληθυσμών στις 48 και στις 24 ώρες, που παρουσιάζει τάση μείωσης..

Πρεβιοτικός δείκτης για το υπόστρωμα των φρουκτο-ολιγοσακχαριτών (FOS)

Εφαρμόζοντας την εξίσωση που περιγράφεται στη σελίδα (78) στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης για τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, σε κάθε χρονική στιγμή, αξιοποιώντας τις μετρήσεις των πληθυσμών ($\log_{10}\text{CFU/gr}$ κοπράνων) από τις εξής κατηγορίες μικροοργανισμών: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacteroides* spp. και ολική αναερόβια μικροχλωρίδα

Π.Δ. για τις 8 ώρες: 0,174

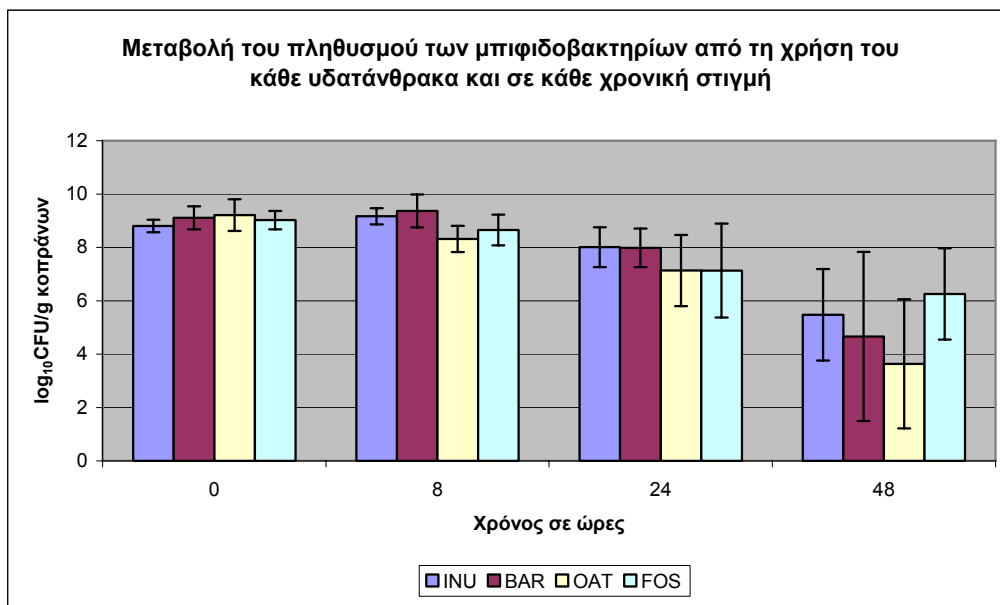
Π.Δ. για τις 24 ώρες: 0,075

Π.Δ. για τις 48 ώρες: 0,409

Σύγκριση των πληθυσμών των μικροοργανισμών κατά την καλλιέργειά τους στους διαφορετικούς υδατάνθρακες, σε κάθε χρονική στιγμή

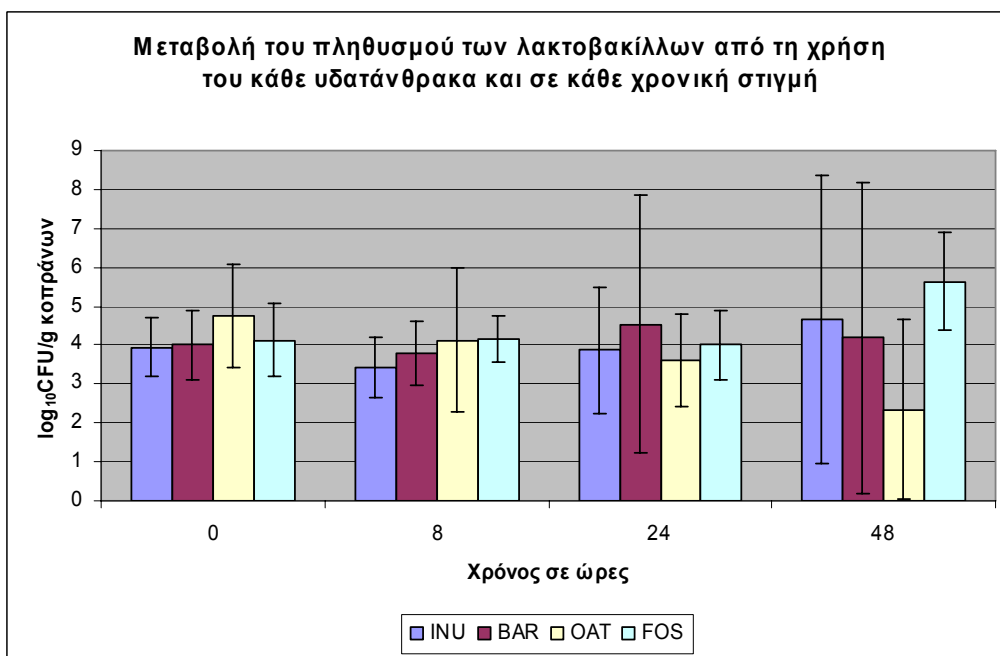
Σε μία προσπάθεια σύγκρισης της επίδρασης της πηγής C, στους μικροβιακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν από την εντερική μικροχλωρίδα, έγινε σύγκριση των μέσων τιμών των πληθυσμών για κάθε χρονική στιγμή μεταξύ των 4 διαφορετικών υδατανθράκων. Μετά από την στατιστική επεξεργασία φάνηκε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στους μέσους πληθυσμούς μεταξύ των υδατανθράκων, στις διαφορετικές χρονικές στιγμές που εξετάστηκαν.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή των βακτηριακών πληθυσμών που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του Πρεβιοτικού δείκτη δηλ. της ολικής αναερόβιας μικροχλωρίδας, των λακτοβακίλλων, των μπιφιδοβακτηρίων, του *Clostridium perfringens* και του *Bacteroides* spp.



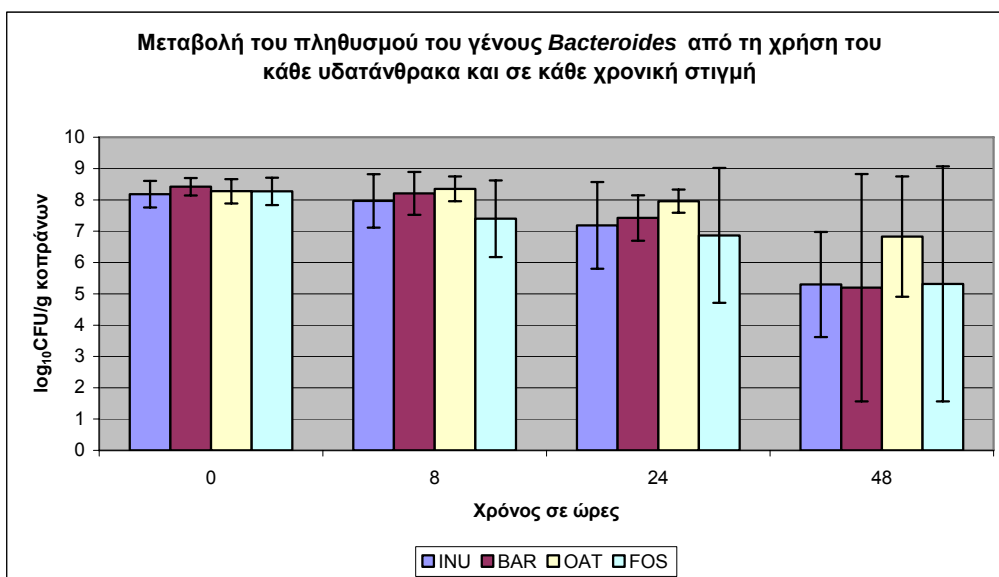
Εικόνα 2 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του πληθυσμού των μπιφιδοβακτηρίων από τη χρήση κάθε υδατάνθρακα σε κάθε χρονική στιγμή

Deleted: 2



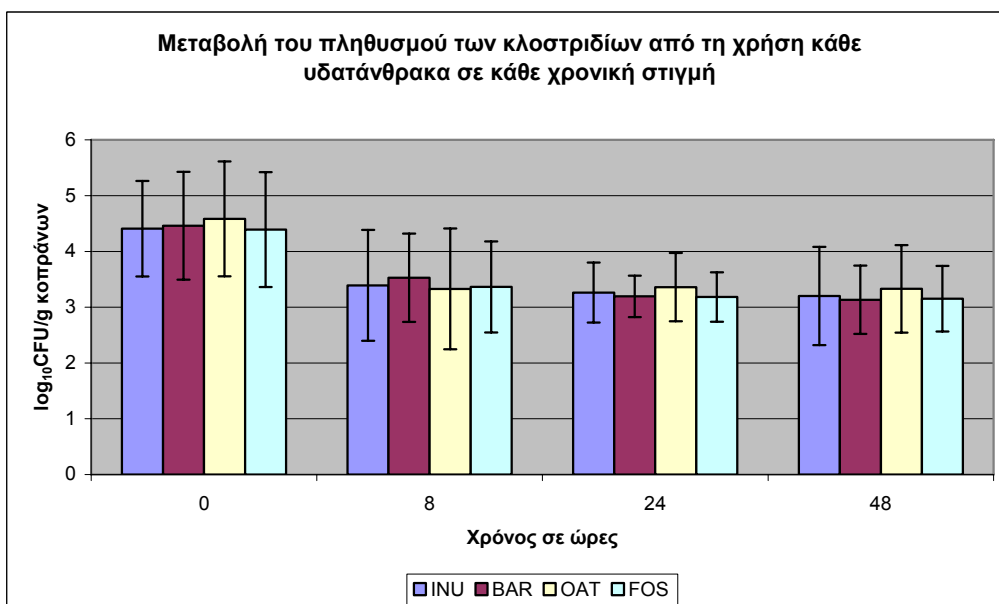
Εικόνα 3 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του πληθυσμού των λακτοβακίλλων από τη χρήση του κάθε υδατάνθρακα σε κάθε χρονική στιγμή

Deleted: 3



Εικόνα 4 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του πληθυσμού του γένους *Bacteroides* από τη χρήση κάθε υδατάνθρακα σε κάθε χρονική στιγμή

Deleted: 4



Εικόνα 5 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του πληθυσμού των κλωστριδίων από τη χρήση του κάθε υδατάνθρακα σε κάθε χρονική στιγμή

Deleted: 5

Κεφάλαιο 5. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης των υδατανθράκων, ινουλίνη, β-γλουκάνη από κριθάρι και από βρώμη και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, από τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας που περιέχονται στα κόπρανα των τριών εθελοντών. Τα βακτήρια που μελετήθηκαν ήταν αντιπροσωπευτικά της εντερικής μικροχλωρίδας και δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στα *Bifidobacterium* spp. και *Lactobacillus* spp., που αποτελούν ευεργετικά για την υγεία βακτήρια, καθώς και στα *Clostridium* spp. και *Bacteroides* spp., τα οποία συνδέονται κατά καιρούς με διάφορες νοσογόνες καταστάσεις.

Σε μία από τις πρώτες μελέτες που δημοσιεύτηκε το 1993, οι Wang & Gibson μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών υδατανθράκων στα επίπεδα των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως επίσης και στα επίπεδα των οργανικών οξέων βραχείας αλύσου που εκλύονται. Η καταμέτρηση των πληθυσμών γίνεται στις 12 ώρες μετά από τον εμβολιασμό, χρονική στιγμή που δεν συμπίπτει με τις δειγματοληψίες της παρούσας μελέτης, η συγκέντρωση του υδατάνθρακα ήταν 0,7% (κ.ο.) -εμείς χρησιμοποιήσαμε 1% (κ.ο.)- και η καταμέτρηση των πληθυσμών έγινε με κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές, αντίστοιχες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στους πληθυσμούς ενώ στα μπιφιδοβακτήρια παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού τους.

Το 2001, οι Rycroft et al. μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών υδατανθράκων μεταξύ αυτών και της ινουλίνης, σε πληθυσμούς της εντερικής μικροχλωρίδας που καταμετρήθηκαν στις 5 και στις 24 ώρες, με την τεχνική FISH, η οποία θεωρείται πολύ πιο ευαίσθητη, από τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με αυτές που ακολουθήθηκαν και στην παρούσα μελέτη (pH, συγκέντρωση υδατάνθρακα). Παρατήρησαν ότι ήδη μετά από 5 ώρες καλλιέργεια υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση των

μπιφιδοβακτηρίων, των στρεπτόκοκκων και του *E.coli*. Ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. αυξήθηκε σημαντικά μόνο στις 5 ώρες, ενώ οι λακτοβάκιλλοι και τα κλοστρίδια παρέμειναν σταθερά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Palframan et al. (2002), όπου μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών υδατανθράκων, σε δύο διαφορετικά pH (6, 6.8) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής C (1, 2%), μετά από καταμέτρηση των αντίστοιχων βακτηριακών πληθυσμών στις 24 ώρες επώασης παρατηρήθηκαν τα εξής: Όταν η πηγή C ήταν η ινουλίνη (1% κ.ο.) και το pH 6.8, συνθήκες που ομοιάζουν με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ολικών βακτηρίων και των μπιφιδοβακτηρίων, μείωση του πληθυσμού του *Bacteroides* spp., ενώ οι πληθυσμοί των κλοστρίδιων και των λακτοβακίλλων δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές.

Σε επόμενη εργασία ανασκόπησης που ακολούθησε, επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης των Rycroft et al. (2001) και υπολογίστηκε ο Πρεβιοτικός δείκτης που αφορά και την ινουλίνη στις 5 και στις 24 ώρες. Παρά το γεγονός ότι δεν υπολογίστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο οι μικροβιακοί πληθυσμοί και η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελαφρά διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ο ΠΔ για την ινουλίνη στις 5 ώρες ήταν 0.36 και στις 24 ώρες 1,82 (Palframan et al. 2003). Στην ίδια μελέτη υπολογίστηκε ο ΠΔ για την ινουλίνη, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα των Palframan et al. (2002). Π.Δ. για τις 24 ώρες ήταν 0.38.

Στην παρούσα μελέτη η ινουλίνη φαίνεται ότι προκαλεί σημαντική μείωση στα ολικά κολίμορφα και στο *E.coli*, αλλά και στους εντερόκοκκους, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Αντίθετα οι Rycroft et al. (2001) αναφέρουν σημαντική αύξηση των πληθυσμών αυτών, ενώ στην εργασία των Wang & Gibson (1993) παρατηρείται αύξηση, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Κατά την παρούσα εργασία παρατηρήσαμε αύξηση στα μπιφιδοβακτήρια στις 8 ώρες επώαση, μη στατιστικά σημαντική όμως, ενώ στη συνέχεια μειώνονται. Ο πληθυσμός των κλοστρίδιων μειώθηκε σημαντικά μετά από τις 8 ώρες καλλιέργειας παρουσία της ινουλίνης. Στην μελέτη των Wang & Gibson (1993), παρατηρήθηκε αύξηση μη σημαντική των μπιφιδοβακτηρίων στις 12 ώρες,

παράλληλα όμως παρέμειναν σταθερά και τα κλοστρίδια. Αντίθετα στη μελέτη των Rycroft et al. (2001), παρατηρείται σημαντική αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων ήδη από τις 5 ώρες καλλιέργειας, ενώ τα κλοστρίδια παραμένουν σχεδόν σταθερά. Αντίστοιχα αποτελέσματα με την πιο πάνω μελέτη αναφέρονται και από τους Palframan et al. (2002).

Ο πληθυσμός του γένους *Bacteroides* μειώνεται στην παρούσα εργασία, ενώ οι Wang & Gibson (1993) αναφέρουν σταθερά επίπεδα, οι Rycroft et al. (2001) σημαντική αύξηση στις 5 ώρες και οι Palframan et al. (2002), σημαντική μείωση στις 24 ώρες.

Οι λακτοβάκιλλοι σημείωσαν έντονη διακύμανση στις διαφορετικές χρονικές στιγμές της μελέτης αυτής, αυξανόμενοι τελικά στο δείγμα των 48 ωρών. Αντίθετα οι Wang & Gibson (1993), αλλά και οι Rycroft et al. (2001), παρουσιάζουν σταθερά επίπεδα λακτοβακίλλων μέχρι τις 12 και τις 24 ώρες αντίστοιχα. Οι Palframan et al. (2002) αναφέρουν μη σημαντική μείωση των λακτοβακίλλων στις 24 ώρες.

Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει για τις δράσεις της β-γλουκάνης από κριθάρι και από βρώμη, δεν μελετούν κάποια πιθανή πρεβιοτική τους επίδραση στον άνθρωπο, με αποτέλεσμα να απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να καθοριστεί αν όντως υπάρχει κάποια πιθανή πρεβιοτική επίδραση. Η παρούσα εργασία έρχεται για πρώτη πιθανόν φορά να μελετήσει την επίδραση της β-γλουκάνης στους πληθυσμούς της εντερικής μικροχλωρίδας. Παρόλο που οι διαφορές στις μεταβολές του μικροβιακού πληθυσμού δεν έχουν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των υδατανθράκων, παρακάτω θα αναφερθούν συγκριτικά τα αποτελέσματα αυτών των δύο τύπων β-γλουκάνης.

Στη β-γλουκάνη και από κριθάρι και από βρώμη, οι πληθυσμοί των ολικών κολίμορφων βακτηρίων και του *E. coli* μειώθηκαν σημαντικά στις 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, ενώ οι εντερόκοκκοι έδειξαν μία μείωση, η οποία δεν ήταν σημαντική. Παρόμοια ήταν και η επίδραση αυτών των δύο τύπων β-γλουκάνης στον πληθυσμό της αναερόβιας μικροχλωρίδας, με τη διαφορά ότι στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού τους επιτεύχθηκε πιο γρήγορα στη β-γλουκάνη

από κριθάρι, στις 24 ώρες, ενώ στην άλλη αυτό έγινε στις 48 ώρες. Επιπλέον και στις δύο περιπτώσεις ο πληθυσμός των κλοστριδίων παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στις 8 και 24 ώρες καλλιέργειας.

Όσον αφορά τους λακτοβακίλλους στη β-γλουκάνη από κριθάρι, αυτοί έμειναν σχετικά ανεπηρέαστοι, ενώ κατά τη καλλιέργεια με αποκλειστική πηγή C τη β-γλουκάνη από βρώμη, φάνηκε να μειώνεται ο πληθυσμός του, αν και η μείωση αυτή δεν έφτασε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Ο πληθυσμός του γένους *Bacteroides* για τη β-γλουκάνη από κριθάρι, αν και μειώθηκε στην πορεία του χρόνου της καλλιέργειας, η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική πιθανόν λόγω των μεγάλων τυπικών αποκλίσεων, ενώ τα βακτήρια του γένους αυτού με β-γλουκάνη από βρώμη, φαίνεται ότι στην αρχή (8 ώρες) παραμένουν σταθερά με ελαφρά αύξηση και στη συνέχεια μειώνονται, και μάλιστα στατιστικά σημαντικά στις 24 ώρες καλλιέργειας. Τέλος, τα μπιφιδοβακτήρια στη β-γλουκάνη από κριθάρι, αν και μέχρι τις 8 ώρες καλλιέργειας αυξήθηκαν, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα, στη συνέχεια μειώθηκαν. Μάλιστα η μείωση του πληθυσμού τους που παρατηρήθηκε στις 24 ώρες στατιστικά σημαντική. Ο αντίστοιχος πληθυσμός με τη β-γλουκάνη από βρώμη στις 24 ώρες, παρουσίασε μείωση στατιστικά σημαντική συγκρινόμενος με το εμβόλιο ($t=0$). Σημειώθηκε επίσης μείωση στις 8 και 24 ώρες, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σχετικά με τις τιμές του Πρεβιοτικού δείκτη, αυτές ήταν θετικές σε όλες τις χρονικές στιγμές που εξετάστηκαν για τη β-γλουκάνη από κριθάρι, ενώ για τη β-γλουκάνη από βρώμη ήταν όλες αρνητικές. Οι αρνητικές τιμές της β-γλουκάνης από βρώμη υποδηλώνουν ότι ο υδατάνθρακας αυτός δεν έδειξε πρεβιοτική δραστηριότητα στις συνθήκες που μελετήσαμε.

Παρόλο που πρόκειται για β-γλουκάνη και στο κριθάρι και στη βρώμη, οι διαφορετικές επιδράσεις της στους μικροβιακούς πληθυσμούς, δε θα έπρεπε να μας εκπλήσσει, αφού το κριθάρι περιέχει μεγαλύτερο (5-10%) ποσοστό β-γλουκάνης από τη βρώμη (<5%) (Queenan et al., 2007; Keogh et al., 2003; Delaney et al., 2003). Επιπλέον έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την δόσοεξαρτώμενη επίδραση της β-γλουκάνης, όχι στην εντερική

μικροχλωρίδα αλλά σε στη δράση της στα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (Kim et al., 2006).

Επίσης η χημική τους δομή παρόλο που είναι και στις δύο μία γραμμική mixed-link (1→3)(1→4)-β-D-γλουκάνη (Queenan et al., 2007; Keogh et al., 2003), μπορεί να διαφέρει στον βαθμό πολυμερισμού της και επομένως να προκύπτουν διαφορετικού μοριακού βάρους β-γλουκάνες. Όμως, οι Kim et al., (2006), ανέφεραν ότι το μοριακό μέγεθος της β-γλουκάνης μπορεί να επηρεάζει τις δράσεις της. Έτσι εάν το μοριακό μέγεθός της είναι μικρό, το ιξώδες μειώνεται και συνεπώς μειώνεται η αποτελεσματικότητά της.

Στην έρευνα των Olano-Martin et al., (2000) εξετάστηκε η ικανότητα ορισμένων ολιγοσακχαριτών, και των φρουκτοολιγοσακχαριτών, να ζυμώνονται από την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με αυτές που ακολουθήθηκαν και στην παρούσα μελέτη (pH, συγκέντρωση υδατάνθρακα) και η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών πραγματοποιήθηκε στις 0, 6, 24 και 48 ώρες επώασης με κλασικές μεθόδους καταμέτρησης, όπως συνέβη και σε αυτή την περίπτωση. Γενικότερα παρατηρήθηκε αύξηση των ολικών αναερόβιων βακτηρίων μέχρι τις 48 ώρες, μείωση των κλωστριδίων στις 48 ώρες, μείωση του πληθυσμού του γένους *Bacteroides* στις 6 ώρες και αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων στις 6 ώρες καλλιέργειας.

Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Palframan et al. (2002), όπου μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών υδατανθράκων, σε δύο διαφορετικά pH (6, 6.8) και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής C (1, 2%), μετά από καταμέτρηση των αντίστοιχων βακτηριακών πληθυσμών στις 24 ώρες επώασης παρατηρήθηκαν τα εξής: Όταν η πηγή C ήταν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (1% κ.ο.) και το pH 6.8, συνθήκες που ομοιάζουν με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ολικών βακτηρίων και των μπιφιδοβακτηρίων, σημαντική μείωση του πληθυσμού του *Bacteroides* spp., ενώ οι πληθυσμοί των κλωστριδίων και των λακτοβακίλλων δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές. Σε επόμενη εργασία ανασκόπησης που

ακολούθησε, επεξεργάστηκαν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης και υπολογίστηκε ο Πρεβιοτικός δείκτης για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, ο οποίος ήταν 1,73 δεν υπολογίστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο οι μικροβιακοί πληθυσμοί και η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελαφρά διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Palframan et al. 2003).

Στην έρευνα των Sterr et al., (2003), αξιολογήθηκε η ζύμωση της γενιστεΐνης στο παχύ έντερο, καθώς και επιδράσεις κάποιων πρεβιοτικών στους πληθυσμούς της εντερικής μικροχλωρίδας, μεταξύ των οποίων ήταν και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες. Παρόλο που η καταμέτρηση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας έγινε με κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές και σε χρόνο 0 και 24 ώρες, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν διαφορετική από αυτήν της παρούσας μελέτης. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν ενός σταδίου χημειοστατικές καλλιέργειες, όπου οι συνθήκες που επικρατούσαν ήταν παρόμοιες με τις δικές μας (pH, συγκέντρωση υδατανθράκων και κοπράνων), καθώς και τριών σταδίων χημειοστατικές καλλιέργειες με τρία διαφορετικά pH (5.5 pH για το πρώτο δοχείο καλλιέργειας, 6,2 για το δεύτερο και 7,0 για το τρίτο). Τελικά, όσον αφορά τις καλλιέργειες του ενός σταδίου, παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση των πληθυσμών των ολικών αναερόβιων βακτηρίων, των λακτοβακίλλων και των μπιφιδοβακτηρίων, και μια σημαντική μείωση του πληθυσμού του γένους *Bacteroides* spp. και των κλοστρίδιων.

Μία επιπλέον έρευνα των Manderson et al., (2005) είχε σκοπό να καθορίσει τις πρεβιοτικές επιδράσεις ολιγοσακχαριτών που περιέχονται σε χυμό πορτοκαλιού, μεταξύ των οποίων ήταν και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, στα επίπεδα των μικροβιακών πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως επίσης και στα επίπεδα των οργανικών οξέων βραχείας αλύσου που εκλύονται. Η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών έγινε στις 0,5,10 και 24 ώρες μετά από τον εμβολιασμό και με *in situ* υβριδισμό με 16SrRNA probes, που είναι μια πιο ευαίσθητη μέθοδος από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι συνθήκες pH ήταν ίδιες με της παρούσας, αλλά η ποσότητα υδατανθράκων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2% (κ.ο.), σε αντίθεση με τη δικιά μας που ήταν 1% (κ.ο.) σε κάθε δοχείο. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του πληθυσμού των

μπιφιδοβακτηρίων και των *Eubacterium* ήδη από τις 5 πρώτες ώρες καλλιέργειας, η οποία διατηρήθηκε και στις 10 και στις 24 ώρες. Ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων και των εντερόκοκκων αυξήθηκε, όχι όμως στατιστικά σημαντικά, ενώ αυτός των *Bacteroides* και των κλοστριδίων παρουσίασε μείωση, και αυτή όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Παρά το γεγονός ότι δεν υπολογίστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο οι μικροβιακοί πληθυσμοί και η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελαφρά διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ο ΠΔ για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες ήταν 9,98 στις 5 ώρες, 6,32 στις 10 ώρες και 7,84 στις 24 ώρες.

Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη των Mandalari et al., (2007), εξετάστηκε η επίδραση των ολογοσακχαριτών από περγαμότο στην καμπύλη αύξησης σε συγκεκριμένα στελέχη, καθώς και η πρεβιοτική τους επίδραση συγκριτικά με τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, που αποτελούν πιθανό πρεβιοτικό, και με το άμυλο, που δεν έχει πρεβιοτικές ιδιότητες. Η καταμέτρηση των πληθυσμών της εντερικής μικροχλωρίδας στο χρόνο 0, 10 και 24 ώρες έγινε με τη μέθοδο FISH, η οποία είναι πιο ευαίσθητη από τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με αυτές που ακολουθήθηκαν και στην παρούσα μελέτη (pH, συγκέντρωση υδατάνθρακα), αν και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κοπράνων 10% (κ.ο.), γεγονός που δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα. Παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων αυξήθηκε σημαντικά και στις 10 και στις 24 ώρες για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές ελέγχου από το άμυλο. Το ίδιο συνέβη και με τους πληθυσμούς του γένους *Bacteroides* spp., των λακτοβακίλλων και των *Eubacterium*. Αντίθετα, ο πληθυσμός των κλοστριδίων παρουσίασε σημαντική αύξηση στις 10 ώρες και στη συνέχεια σημαντική μείωση στις 24 ώρες, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές ελέγχου. Παρά το γεγονός ότι δεν υπολογίστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο οι μικροβιακοί πληθυσμοί και η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελαφρά διαφορετική από εκείνη (επιπλέον συμπεριλήφθηκε και ο πληθυσμός των *Eubacterium*) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ο ΠΔ για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες ήταν 6,12 στις 10 ώρες και 3,43 στις 24 ώρες.

Στην παρούσα μελέτη οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες φαίνεται ότι προκαλούν σημαντική μείωση στα ολικά κολίμορφα και στο *E.coli*, μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Τα ίδια συνέβη στην έρευνα των Sterr et al., (2003), όπου σύμφωνα με τις χημειοστατικές καλλιέργειες τριών σταδίων, στο πρώτο δοχείο παρατηρήθηκε μείωση των κολίμορφων σε επίπεδο που να μην εμφανίζονται.

Ο πληθυσμός των εντερόκοκκων στην παρούσα μελέτη παρουσίασε μείωση, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ στην έρευνα των Manderson et al., (2005) παρουσιάστηκε μη σημαντική αύξηση.

Κατά την παρούσα εργασία παρατηρήσαμε μία γενικότερη, όχι όμως στατιστικά σημαντική, μείωση στα μπιφιδοβακτήρια και στα *Bacteroides*, ενώ ο πληθυσμός των κλοστριδίων μειώθηκε σημαντικά μετά από τις 8 ώρες καλλιέργειας παρουσία των φρουκτοολιγοσακχαριτών. Στην έρευνα των Olano-Martin et al., (2000) παρατηρήθηκε μείωση των κλοστριδίων στις 48 ώρες, μείωση των *Bacteroides* στις 6 ώρες και αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων στις 6 ώρες καλλιέργειας. Σε αυτή των Palframan et al. (2002), φάνηκε μια σημαντική αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων, σημαντική μείωση του πληθυσμού του *Bacteroides* spp., ενώ ο πληθυσμός των κλοστριδίων δεν παρουσίασε σημαντική αλλαγή. Στην έρευνα των Sterr et al., (2003), όσον αφορά του ενός σταδίου καλλιέργειας, παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση του πληθυσμού των μπιφιδοβακτηρίων, και μια σημαντική μείωση του πληθυσμού του γένους *Bacteroides* spp. και των κλοστριδίων. Οι Manderson et al., (2005) παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση του πληθυσμού των μπιφιδοβακτηρίων από τις 5 πρώτες ώρες καλλιέργειας, η οποία διατηρήθηκε και στις 10 και στις 24 ώρες. Ο πληθυσμός των *Bacteroides* και των κλοστριδίων παρουσίασε μείωση, όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, οι Mandalari et al., (2007) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των μπιφιδοβακτηρίων και του γένους *Bacteroides* spp. αυξήθηκε σημαντικά και στις 10 και στις 24 ώρες για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες. Αντίθετα, ο πληθυσμός των κλοστριδίων παρουσίασε σημαντική αύξηση στις 10 ώρες και στη συνέχεια σημαντική μείωση στις 24 ώρες, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές ελέγχου.

Οι λακτοβακίλλοι σημείωσαν έντονη διακύμανση στις διαφορετικές χρονικές στιγμές της μελέτης αυτής, αυξανόμενοι στατιστικά σημαντικά στο δείγμα των 48 ωρών. Αντίθετα οι Palframan et al. (2002) παρουσιάζουν σταθερά επίπεδα λακτοβακίλλων. Οι Sterr et al., (2003) όσον αφορά του ενός σταδίου καλλιέργειας, παρατήρησαν μια σημαντική αύξηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων, ενώ σύμφωνα με τις χημειοστατικές καλλιέργειες τριών σταδίων, στο πρώτο δοχείο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των λακτοβακίλλων. Οι Manderson et al., (2005) έδειξαν ότι ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων αυξήθηκε, όχι όμως στατιστικά σημαντικά. Τέλος, οι Mandalari et al., (2007) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων αυξήθηκε σημαντικά και στις 10 και στις 24 ώρες για τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι δεν είναι εύκολο να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών ερευνητικών ομάδων γιατί αφενός επικρατούν διαφορετικές συνθήκες (pH, συγκέντρωση υδατάνθρακα, εμβολίου, τύπος καλλιέργειας, χρονική στιγμή δειγματοληψίας) και αφετέρου χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνικές για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών (μοριακές τεχνικές όπως η FISH, ή κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές).

Στο σημείο αυτό, είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι υπήρξαν κάποιοι περιοριστικοί παράγοντες στην παρούσα μελέτη, οι οποίοι πιθανόν να επηρέασαν τα αποτελέσματά της. Ένας από αυτούς ήταν η χρήση μεγαλύτερου εμβολίου από την εντερική μικροχλωρίδα, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η εκκίνηση της καλλιέργειας με μετρήσιμους πληθυσμούς από κάποιες κατηγορίες μικροοργανισμών. Πιθανά η αύξηση αυτή του εμβολίου να οδήγησε σε γρήγορη κατανάλωση της πηγής άνθρακα (υδατάνθρακες) ή κάποιου άλλου θρεπτικού συστατικού που έγινε τελικά περιοριστικός παράγοντας για την αύξηση κάποιων μικροβιακών ομάδων.

Κεφάλαιο 6. Βιβλιογραφία

1. MacFarlane G. & McBain A. (1999). The Human Colonic Microbiota. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. eds. p: 1-25.
2. Olano-Martin E., Mountzouris K. C., Gibson G. R. & Rastall R. A. (2000) *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83: 247-255.UK
3. Anderson A. D. G., McNaught C. E., Jain P. K. & MacFie J. (2004). Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. U.K. *Gut* 53:241–245
4. Menne E., Guggenbuhl N. & Roberfroid M. (2000). Fn-type Chicory Inulin Hydrolysate Has a Prebiotic Effect in Humans.
5. Olano-Martin E., Gibson G. R. & Rastall R. A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. UK
6. Rycroft C. E., Jones M. R., Gibson G. R. & Rastall R. A. (2001). A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 878±887
7. Manderson K., Pinart M., Tuohy K. M., Grace W. E., Hotchkiss A. T., Widmer W., Yadhav M. P., Gibson G. R. & Rastall R. A. (2005). *In Vitro* Determination of Prebiotic Properties of Oligosaccharides Derived from an Orange Juice Manufacturing By-Product Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec: p:8383–8389. USA

8. Fuller R., House R. & Green R. (1999). Probiotics. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. eds. p: 89-99
9. Brady L. J., Gallaher D. D. & Busta F. F. (2000). The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer. *J. Nutr.* 130: 410S–414S.
10. Saulnier D. M. A., Molenaar D., De Vos W. M., Gibson G. R. & Kolida S. (2007). Identification of Prebiotic Fructooligosaccharide Metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1753–1765
11. Scardovi V. (1986) *Genus Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472^{AL}. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 2*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.1418-1434
12. Poupard J. A., Husain In & Norris R. F. (1973). Biology of the *Bifidobacteria*. American Society For Microbiology, p.136-165
13. Kandler O. & Weiss N. (1986). *Genus Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 2*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.1209-1219
14. Cato E. P., Lance W. G. & Finegold S. M. (1986). *Genus Clostridium* Prazmowski 1880, 23^{AL}. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 2*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.1141-1143
15. Ewing & Brenner (1986). Family I. Enterobacteriaceae RHAN 1937, Nom. fam. cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958,73. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 1*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.1418-1434

16. Orskov F. (1986). *Genus I. Escherichia Castellani and Chalmers 1919, 941^{AL}*. In Snealth P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 1*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.420-423
17. Holdeman L. V., Kelley R. W. & Moore W. E. C.(1986). *Genus I. Bacteroides Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL}* . In Snealth P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 1*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.604-606
18. Klein G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 123-131
19. Mundt L. J. O. (1986). *Enterococci*. In Snealth P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holth J.G. eds. '*Berge's manual of Systematic Bacteriology, vol 2*', Williams and Wilkins, Baltimore, p.1063-1065
20. Gibson G. R., Rastall R. A. & Roberfroid M. B. (1999). Prebiotics. . In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. eds. p: 101-123
21. Mandalari G., Nueno Palop C., Tuohy K., Gibson G. R., Bennett R. N., Waldron K. W., Bisignano G., Narbad A. & Faulds C. B.(2007). *In vitro* evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73: 1173–1179
22. Roberfroid M. B. (1999). Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J. Nutr.* 129: 1398S–1401S
23. Franck A. (1999). Prebiotics in Consumer Products. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. eds. p: 291-300

24. Jung K. H., Kim M., Ha E., Kim H. K., Kim Y. O., Kang S. A., Chung J. & Yim S. (2007). The Suppressive Effect of β -Glucan on the Production of Tumor Necrosis Factor-Alpha in BV2 Microglial Cells. Communication. Biosci. Biotechnol. Biochem.,71(5): 1360-1364, Republic of Korea
25. Kim S. Y., Song H. J., Lee Y. Y., Cho K. & Roh Y. (2006). Biomedical Issues of Dietary fiber β -Glucan. J Korean Med Sci, 21: 781-789, Republic of Korea
26. Queenan K. M., Stewart M. L., Smith K. N., Thomas W., Fulcher R. G. & Joanne L. (2007). Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. Canada Nutrition Journal, 6:6 doi:10.1186/1475-2891-6-6, Canada
27. Bourdon I., Yokoyama W., Davis P., Hudson C., Backus R., Richter D., Knuckles B. & O Schneeman B. (1999). Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with β -glucan. Am J Clin Nutr 69:55–63
28. Keogh G. F., Cooper G. JS., Mulvey T. B., McArdle B. H., Coles G. D., Monro J. A. & Poppitt S. D. (2003). Randomized controlled crossover study of the effect of a highly β -glucan–enriched barley on cardiovascular disease risk factors in mildly hypercholesterolemic men. Am. J. Clin. Nutr., American Society for Clinical Nutrition,78: 711–718.USA
29. Palframan R., Gibson G., Rastall R. (2002) Effect of pH and Dose on the Growth of Gut Bacteria on Prebiotic Carbohydrates *in vitro*. Anaerobe, 8: 287–292.
30. Steer T. E., Johnson I. T., Gee J. M. & Gibson G. R. (2003). Metabolism of the soyabean isoflavone glycoside genistin *in vitro* by human gut bacteria and the effect of prebiotics. British Journal of Nutrition, 90: 635-642

31. Barrangou R., Altermann E., Hutkins R., Cano R. & Klaenhammer T. R. (2003). Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. USA
32. Roberfroid M. (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. The Journal of Nutrition, 137: 830S-837S
33. Clavel T., Fallani M., Lepage P., Levenez F., Mathey J., Rochet V., Serezat M., Sutren M., Henderson G., Bennetau-Pelissero C., Tondy F., Blaut M., Dore J. & Coxam V. (2005). Isoflavones and Functional Foods Alter the Dominant Intestinal Microbiota in Postmenopausal Women. J. Nutr. 135: 2786–2792
34. Palframan R., Gibson G. R. & Rastall R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. UK.
35. Ανυφαντάκης Ε. (2004). Τυροκομία, Χημεία – Φυσικοχημεία – Μικροβιολογία. Β΄ έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
36. Anderson J. J. B. (2004). Prebiotics and Minerals. *Krause's: Food, Nutrition & Diet Therapy*, 11th edition. L. Kathleen Mahan Sylvia Escott-Stump. Chapter 5, p.122.
37. Τζανετάκης Ν. & Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε. (2000). Μικροβιολογία και Υγιεινή Παραδοσιακών τυριών. Θεσσαλονίκη
38. Havenaar R. & Huis J. H. J. (1999). Probiotics: A General View. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*, Brian J.B. Wood eds. p: 151-170

39. Korpela R. & Saxein M. (1999). Probiotics in Consumer Products. In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. eds. p: 281-289

40. Amenta M., Cascio M. T., Di Fiore P. & Venturini I. (2006). Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic zir fos (*Bifidobacterium longum* W11 + FOS Actilight). ACTA BIOMED, 77: 157-162

41. Karakan T., Ergun M., Dogan I., Cindoruk M. & Unal S. (2007). Comparison of early enteral nutrition in severe acute pancreatitis with prebiotic fiber supplementation versus standard enteral solution: A prospective randomized double-blind study. World J Gastroenterol, May 21, 13(19): 2733-2737

42. Wang X. & Gibson G.R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology, 75: 373-380. UK

43. Delaney B., Nicolosi R.J., Wilson T. A., Carlson t., Frazer S., Zheng G., Hess R., Ostergren K., Haworth J. & Knutson N. (2003) β -Glucan Fractions from Barley and Oats Are Similarly Antiatherogenic in Hypercholesterolemic Syrian Golden Hamsters. J. Nutr. 133: 468–495.