

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής



Πτυχιακή Μελέτη

Ανίχνευση πιθανής πρεβιοτικής δράσης σε μύκητες
του γένους *Ganoderma*

ΡΟΗΛΙΔΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

A.M. 21047

Τριμελής επιτροπή:

Κυριακού Αδαμαντίνη- Επιβλέπουσα

Κώτσου Μαρία

Ζερβάκης Γεώργιος

Στην αγαπημένη μου
Φωτεινή...

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κυρία Κυριακού Αδαμαντίνη για την σπουδαία βοήθεια της, για τις πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες της αλλά και για την καθοδήγηση της. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω σε προσωπικό επίπεδο για την στήριξη που μου προσέφερε.

Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να δώσω στην υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης Διατροφής-Διαιτολογίας κυρία Μήτσου Ευδοκία για την μεγάλη και πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε τόσο κατά την διάρκεια του πειράματος όσο και κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και για την μεγάλη υπομονή της. Παρά το φόρτος εργασίας της ήταν πάντα πρόθυμη να συζητήσει μαζί μου οτιδήποτε απαραίτητο για την παρούσα μελέτη και την ευχαριστώ για αυτό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ Κώτσου Μαρία για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια του πειράματος αλλά και μετέπειτα.

Ευχαριστώ επίσης την συμφοιτήτριά μου Σεκκίδου Μικαέλα, με την οποία μοιραστήκαμε ένα μεγάλο μέρος της προσπάθειας και των δυσκολιών των πειραμάτων, για την βοήθεια και την πολύτιμη στήριξη της σε προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε, τους φίλους μου για την στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα καθώς και την κυρία Βασιλάκη Καλλιόπη για την σπουδαία συμπαράσταση της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην αγαπημένη μου Σαπατζόγλου Φωτεινή, που ξεκινήσαμε μαζί την πορεία μας σε αυτό το Πανεπιστήμιο. Την ευχαριστώ για τα μαθήματα ζωής που μου έδωσε και για την τιμή που μου έκανε να είναι στη ζωή μου έστω και για λίγο.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
Θεωρητικό Μέρος.....	9
1. Βασιδιομύκητες.....	10
1.1 Κύρια χαρακτηριστικά μυκήτων/ βασιδιομυκήτων.....	10
1.2 Μανιτάρια.....	11
1.2.1 Ιστορικά στοιχεία.....	12
1.2.2 Διατροφική αξία.....	12
1.2.2.1 Β-γλυκάνες στα μανιτάρια.....	14
1.2.3 Ευεργετικές ιδιότητες μανιταριών.....	15
1.2.3.1 Ανοσορυθμιστική δράση.....	16
1.2.3.2 Αντικαρκινική δράση.....	17
1.2.3.3 Πρεβιοτική δράση μανιταριών.....	17
1.3 <i>Pleurotus ostreatus</i>	18
1.4 <i>Ganoderma lucidum</i>	19
2. Εντερικός μικροβιόκοσμος.....	21
2.1 <i>Bifidobacterium</i> spp.....	23
2.2 <i>Lactobacillus</i> spp.....	24
2.3 <i>Clostridium</i> spp.....	24
2.4 <i>Bacteroides</i> spp.....	25
2.5 Διαιτητικές ίνες.....	25
2.5.1 Β-γλυκάνες.....	28
2.6 Πρεβιοτικά.....	29
2.6.1 Ινουλίνη.....	30
2.6.2 Β-γλυκάνες ως υποψήφιο πρεβιοτικό.....	31
2.7 Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσού SCFA.....	31
Σκοπός.....	33
Πειραματικό Μέρος.....	34
3.1 Υπόστρωμα προς εξέταση.....	35
3.2 Δείγματα και επεξεργασία κοπράνων-Προετοιμασία εμβολίου.....	36
3.3 <i>In vitro</i> ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες.....	37
3.3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	39
3.3.1.1 Απομόνωση ολικού μικροβιακού DNA από κόπρανα.....	39

3.3.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR.....	39
3.3.3	Προσδιορισμός Πρεβιοτικού Δείκτη.....	41
3.4	Στατιστική επεξεργασία.....	42
3.5	Κυτταροτοξικότητα.....	42
3.5.1	Λυοφιλίωση υπερκειμένων της ζύμωσης <i>in vitro</i>	43
3.5.2	Καλλιέργεια ανθρώπινων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων.....	43
3.5.3	Υλικά καλλιεργειών.....	43
3.5.4	Αναβίωση κυττάρων από υγρό άζωτο.....	45
3.5.5	Πολλαπλασιασμός κυττάρων και διαίρεση της κυτταροκαλλιέργειας.....	46
3.5.6	Καλλιέργεια κυττάρων σε βοθρία.....	47
3.5.7	Επίδραση υπερκειμένων στις κυτταροκαλλιέργειες.....	47
3.5.8	Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας.....	48
3.5.9	Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	48
4.	Αποτελέσματα.....	50
4.1	Ζύμωση (<i>in vitro</i>) των εκχυλισμάτων καρποφοριών των στελεχών <i>Pleurotus ostreatus</i> IK1123 και <i>Ganoderma lucidum</i> LGAM9720 από τον εντερικό μικροβίοκοσμο υγιών εθελοντών	50
4.2	Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών.....	53
4.3	Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Caco-2) μετά από επώαση με τα υπερκείμενα της ζύμωσης των εκχυλισμάτων των καρποφοριών των στελεχών <i>Pleurotus ostreatus</i> IK1123 και <i>Ganoderma lucidum</i> LGAM9720 από τον εντερικό μικροβίοκοσμο υγιών εθελοντών.....	55
	Συζήτηση.....	59
	Συμπεράσματα.....	64
	Βιβλιογραφία.....	65

Περίληψη

Εισαγωγή: Οι μικροοργανισμοί του εντέρου σχηματίζουν ένα από τα πιο πυκνά και με μεγάλη βιοποικιλότητα σύνολο, που καλείται εντερικός μικροβιόκοσμος και το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή. Σημαντικές προσπάθειες γίνονται προς την κατεύθυνση της διαμόρφωσης και διατήρησης της σύστασης ενός «υγιούς» εντερικού μικροβιόκοσμου, μέσω της διατροφής αλλά και με τη χορήγηση συμπληρωμάτων, όπως τα προβιοτικά. Αναγνωρισμένα προβιοτικά είναι οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης και οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, αλλά μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι β-γλυκάνες που περιέχονται στο κυτταρικό τοίχωμα ανώτερων μυκήτων και βρώσιμων μανιταριών. Τα μανιτάρια έχουν χρησιμοποιηθεί από τα αρχαία χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική πολλών λαών τόσο για πρόληψη όσο και για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Οι β-γλυκάνες που περιέχονται στο κυτταρικό τους τοίχωμα (0.21 - 0.53g/100g ξηρού βάρους) χαρακτηρίζονται από τις πλευρικές αλυσίδες που διαθέτουν, κυρίως β-1,3-γλυκάνες αλλά και β-1,6 καθώς και οι β-1,4. Σημαντική πηγή β-γλυκανών είναι τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* που αποκαλούνται πλευράνες (pleuran). Οι πλευράνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως συμπληρώματα διατροφής λόγω της ανοσορυθμιστικής τους δράσης. Το γένος *Ganoderma* μελετάται κυρίως για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες λόγω της πληθώρας των βιοενεργών συστατικών που περιέχει.

Σκοπός: Η μελέτη πιθανής προβιοτικής δράσης των εκχυλίσμάτων πολυσακχαριτών (κυρίως β-γλυκανών) από τα μανιτάρια του *Pleurotus ostreatus* και του *Ganoderma lucidum* *in vitro*.

Μεθοδολογία: Χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα πολυσακχαριτών (β-γλυκάνες) δύο ειδών βασιδιομυκήτων, του *Pleurotus ostreatus* και του *Ganoderma lucidum* ως υπόστρωμα σε *in vitro* ζύμωση για 24 ώρες από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών εθελοντών. Απομονώθηκε το ολικό μικροβιακό DNA και έγινε ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR) ($\log_{10}$ copies/ml) με αντίστοιχα εξειδικευμένα μόρια εκκινητές των ολικών βακτηρίων, των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, του *Lactobacillus* group, των θειοαναγωγικών κλοστριδίων καθώς και του γένους *Bacteroides*. Ακολούθησε ο προσδιορισμός του προβιοτικού δείκτη για κάθε υπόστρωμα στις 24 ώρες ζύμωσης. Τέλος, ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα που πιθανόν ασκούν τα προϊόντα ζυμώσεως σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου Caco-2 τα οποία επώαστηκαν με το υπερκείμενο των παραπάνω ζυμώσεων.

Αποτελέσματα: Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *Pleurotus ostreatus* δεν επέδειξε κάποια προβιοτική δράση. Αντίθετα στα εκχυλίσματα πολυσακχαριτών του *Ganoderma*

lucidum που είχαν καλλιεργηθεί τόσο σε πριονίδι οξιάς όσο και στο ίδιο υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 50% απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου διαπιστώθηκαν θετικοί πρεβιοτικοί δείκτες.

Abstract

Introduction: Intestinal microbiota (IM), an ecosystem of high density and biodiversity is recognized for its impact on health and disease. Diet is one of the most important parameters that influence the composition of intestinal microbiota. Extensive research has demonstrated that specific dietary supplements, the prebiotics, may modify the IM towards a "healthier" composition.

Inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides are the most recognized prebiotics. Recently, the beta-glucans found in some cereal grains and in the cell wall of Basidiomycetes and edible mushrooms have gained a great interest for their effect on human health. Mushrooms have been used since ancient times in the traditional medicine both for prevention and treatment of various diseases. Mushroom beta-glucans (0.21 - 0.53g /100g dry weight), are characterized by their side groups (beta-1,6 and beta 1,4-D-glucose) that are attached to the main beta-1,3-D-Glucose residues. Pleurans, beta-glucans of the genus *Pleurotus*, have been used as food supplements for their immunomodulatory activity. The genus *Ganoderma* has been well studied mainly for its medicinal properties due to its abundant bioactive components.

Purpose: To study *in vitro* the potential prebiotic activity of polysaccharide extracts (mainly beta-glucans) from the mushrooms of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum*.

Methodology: The polysaccharide extracts (beta-glucans) from *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* mushrooms were used as substrate in an *in vitro* fermentation for 24 hours by the faecal microbiota of three healthy volunteers. Total bacteria, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* group, *Clostridium perfringens* and *Bacteroides* spp. were quantified using real-time PCR. Prebiotic index was calculated for every substrate used after 24 hours of fermentation. Finally, the viability (%) of Caco-2 epithelial cells was measured after the co-incubation with supernatants originated from the fermentation with faecal microbiota.

Results: The polysaccharide extract of *Pleurotus ostreatus* mushrooms did not show any prebiotic effect. On the contrary, positive prebiotic indices were calculated for the polysaccharide extracts from *Ganoderma lucidum* mushrooms cultivated in beech sawdust (BS) and in BS plus two-phase olive mill waste.

Θεωρητικό Μέρος

1. Βασιδιομύκητες

1.1 Κύρια χαρακτηριστικά μυκήτων/ βασιδιομυκήτων

Οι μύκητες είναι χημειοργανότροφοι- ετερότροφοι ευκαριωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι ζουν παρασιτικά και σαπροφυτικά απορροφώντας μόρια τροφής από τον ξενιστή και το περιβάλλον. Είναι το τρίτο από τα πέντε Βασίλεια, σύμφωνα με την παλιά κατάταξη του Whittaker, περιλαμβάνουν έξι φύλα και έχουν διαστάσεις μικρότερες από την ικανότητα του γυμνού οφθαλμού, όταν όμως σχηματίσουν καρποφορίες που μπορεί να εκτείνονται από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και μισό μέτρο, τότε γίνονται ορατοί [1]. Σε αντίθεση με τα πρωτόζωα, οι μύκητες διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο ομοιάζει με αυτό των φυτικών κυττάρων με τη κύρια διαφορά πως στο τοίχωμα αυτό των μυκήτων δεν υπάρχει κυτταρίνη αλλά χιτίνη ή άλλες υδατανθρακικές ενώσεις. Άλλωστε το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αποτελείται από πολυσακχαρίτες κατά 80-90% ενώ ολοκληρώνουν το σύμπλεγμα πρωτεΐνες, λιποειδή, πολυφωσφορικά και ανόργανα άλατα. Οι μύκητες μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι, με τους δεύτερους να αποτελούνται από τις υφές δηλαδή τις νηματοειδής κατασκευές και τα μυκήλια όπως ονομάζονται κοινώς τα σώματα των μυκήτων.

Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες που κατατάσσονται οι μύκητες, όντας ετερότροφοι οργανισμοί (ετερότροφος οργανισμός καλείται αυτός που έχει την ανάγκη έτοιμων οργανικών ουσιών για να τραφεί) είναι α) οι σαπροφυτικοί, β) οι παρασιτικοί και γ) οι μυκορριζικοί μύκητες. Αρχικά οι σαπροφυτικοί μύκητες, τρέφονται αποδομώντας τις οργανικές ενώσεις νεκρών κυττάρων άλλων οργανισμών φυτικών και ζωικών και θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς αποικοδομητές. Το έργο αυτό θεωρείται πολύ σημαντικό για τον πλανήτη και τους βιότοπους. Αντίθετα οι παρασιτικοί μύκητες προσλαμβάνουν τις ενώσεις που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους, ζώντας παρασιτικά σε ζωντανούς οργανισμούς όπως φυτά ή ζώα. Τέλος, οι μυκορριζικοί μύκητες αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες των δέντρων. Με αυτόν τον τρόπο και οι δύο οργανισμοί – φυτό και μύκητας- εξασφαλίζουν τις απαραίτητες συνθήκες διαβίωσης τους [1].

Οι Βασιδιομύκητες είναι μία από τις κύριες ομάδες των μυκήτων και σε αυτήν κατατάσσονται και τα μανιτάρια, τα οποία αποτελούν μακροσκοπικές καρποφορίες των μυκήτων. Το μυκήλιο αποτελεί το σώμα των μυκήτων και δημιουργείται από τις υφές, οι οποίες είναι διακλαδισμένα νημάτια μικρής διαμέτρου. Οι υφές ουσιαστικά είναι τα κύτταρα

των μυκήτων, αποτελούνται από το πρωτόπλασμα που περιβάλλεται από πρωτοπλασματική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα. Στο πρωτόπλασμα περιέχονται ουσιαστικά τα κυτταρικά οργανίδια καθώς και ο πυρήνας του κυττάρου. Για να πραγματοποιηθεί πολλαπλασιασμός των υφών απαιτείται αύξηση του πρωτοπλάσματος, επιμήκυνση και διακλάδωση της υφής καθώς και μιτωτικός πολλαπλασιασμός των πυρήνων. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε πολυπύρηνος οργανισμός που δημιουργείται μπορεί να αναπτυχθεί σε καινούργιο μυκήλιο. Επιπλέον οι υφές διακρίνονται σε υφές οι οποίες φέρουν κατά διαστήματα εγκάρσια διαφράγματα και σε υφές οι οποίες έχουν ενιαίο εσωτερικό χώρο. Οι Βασιδιομύκητες καθώς και οι Ασκομύκητες ανήκουν στις υφές που φέρουν εγκάρσια διαφράγματα.

Η αναπαραγωγή των Βασιδιομυκήτων πραγματοποιείται μέσω των σπορίων που σχηματίζονται από εξειδικευμένες υφές. Τα σπόρια αυτά μπορεί να είναι είτε εγγενούς είτε αγενούς αναπαραγωγής. Στην περίπτωση της εγγενούς αναπαραγωγής, προηγείται σεξουαλική σύζευξη πυρήνων-γαμετών αντίθετου φύλου και το μυκήλιο που σχηματίζεται φέρει νέο γονότυπο. Στην εγγενή αναπαραγωγή, τα σπόρια ονομάζονται βασιδιοσπόρια και σχηματίζονται σε αναπαραγωγικά όργανα που ονομάζονται βασίδια. Στην αντίθετη περίπτωση της αγενούς αναπαραγωγής, τα σπόρια ονομάζονται κονίδια και σχηματίζονται με μιτωτικό πολλαπλασιασμό πυρήνων. Ο σχηματισμός πραγματοποιείται στους κονιδιοφόρους που με τη σειρά τους σχηματίζονται είτε από τις μυκηλιακές υφές είτε στο εσωτερικό ή την επιφάνεια σύνθετων καρποφοριών αγενούς αναπαραγωγής.

1.2 Μανιτάρια

Οι μυκηλιακοί βασιδιομύκητες που σχηματίζουν μεγάλα καρποσώματα, έχουν στην καθημερινότητα την κοινή ονομασία μανιτάρια. Στην πραγματικότητα, το μανιτάρι ορίστηκε από τους Chang και Miles ως « ένας μακρομύκητας με διακριτικό σώμα καρποφορίας που μπορεί να είναι είτε υπόγειο είτε επίγειο αρκετά μεγάλο ώστε να φαίνεται με γυμνό οφθαλμό και να μπορεί να συλλεχθεί με το χέρι ». Ταξινομικά, μανιτάρια αποκαλούνται οι Βασιδιομύκητες καθώς και κάποια είδη Ασκομυκήτων [2]. Όπως αναφέρθηκε, τα μανιτάρια ζουν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους υπό μορφή απλού μυκηλίου στο έδαφος, στα δέντρα, στα φύλλα και σε πολλά άλλα μέρη του βιόκοσμου. Αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο και καλλιεργούνται στις περισσότερες περιοχές του κόσμου καθώς φαίνεται πως εκτός από τα διατροφικά οφέλη που παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό εμφανίζουν και μία πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων που θα αναφερθούν παρακάτω.

Η παραγωγή των μανιταριών ανά τον κόσμο αυξάνεται σταδιακά, προκειμένου να καλύψει την μεγάλη ζήτηση που υπάρχει τα τελευταία χρόνια. Η Κίνα αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους παραγωγούς μανιταριών αφού μόνο το έτος 2007 παρήγαγε περισσότερο από 1.5 εκατομμύριο τόνους μανιταριών, αύξηση κατά 65% μέσα σε 10 χρόνια. Ακολουθούν χώρες όπως οι Η.Π.Α., ο Καναδάς, το Ισραήλ, η Ινδία, η Σιγκαπούρη και το Καζακστάν ως νέοι παραγωγοί [4]. Σήμερα εκτιμάται πως υπάρχουν 140000 είδη μανιταριών στον κόσμο με μόνο το 10% να έχει αναγνωρισθεί ενώ περίπου 2000 μανιτάρια είναι βρώσιμα εκ των οποίων 20 είναι τα πιο δημοφιλή [2], [4].

1.2.1 Ιστορικά στοιχεία

Από αρχαιοτάτων χρόνων, τα μανιτάρια έχουν αξιοποιηθεί ευρύτατα στην ανθρώπινη διατροφή καθώς και την παραδοσιακή ιατρική. Χώρες της Ανατολικής Ασίας όπως η Κίνα και η Ιαπωνία χρησιμοποιούν 2000 χρόνια το μανιτάρι ως συμπλήρωμα διατροφής καθώς και ως προϊόν με φαρμακευτικές ιδιότητες. Στην παραδοσιακή ιατρική των Ανατολικών χωρών, το βρώσιμο μανιτάρι κατείχε πάντοτε μία θέση ως μέσω πρόληψης και θεραπείας πολλών ασθενειών καθώς και ως μέσο προώθησης της μακροβιότητας και της ευημερίας του ανθρώπου. Τα φαρμακευτικά μανιτάρια όπως αποκαλούνται στην Ιαπωνία, την Κίνα, την Κορέα και άλλες Ασιατικές χώρες κατέχουν μία ξεχωριστή θέση στην σύγχρονη έρευνα και την κλινική πρακτική όχι μόνο των χωρών αυτών αλλά και όλου του κόσμου, καθώς φαίνεται πως πραγματικά τα μανιτάρια προσδίδουν στον άνθρωπο πολλά ευεργετικά οφέλη. Αυτό οφείλεται κυρίως στις μοναδικές ιδιότητες των ενώσεων που προέρχονται από τα μανιτάρια.

Η παράδοση των μανιταριών ξεκινά στην Κίνα περί το 600μ.Χ. με το *Auricularia Auricular*, ενώ στην Ευρώπη η καλλιέργεια των μανιταριών ξεκινά τον 17^ο αιώνα στην Γαλλία [4].

1.2.2 Διατροφική Αξία

Υπάρχουν διάφορες μορφές που ο άνθρωπος καταναλώνει τα μανιτάρια στη διατροφή του: φρέσκα, μαγειρεμένα, αποξηραμένα. Τα βρώσιμα μανιτάρια περιέχουν 5-15% ξηρή μάζα και αποτελούν πλούσιες πηγές διαιτητικών ινών και εύκολα εύπεπτων πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 19-35% της ξηρής μάζας του μανιταριού και ανήκουν στις πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας παρότι τα μανιτάρια συγκαταλέγονται στην ομάδα των λαχανικών. Αυτό τα καθιστά ιδιαίτερα καλή επιλογή για χορτοφαγικές δίαιτες καθώς είναι η

μόνη φυτική επιλογή που διαθέτει πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Επιπλέον η συνολική αναλογία των πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη από αυτή των λαχανικών με τις αλβουμίνες και τις σφαιρίνες να κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό ενώ οι προλαμίνες και οι γλουτελίνες να κατέχουν το μικρότερο. Περιλαμβάνονται όλα τα απαραίτητα αμινοξέα ενώ τα σημαντικότερα αμινοξέα που περιέχονται στα μανιτάρια είναι η λευκίνη, η βαλίνη, η γλουταμίνη, το ασπαρτικό οξύ καθώς και το γλουταμινικό οξύ [3].

Η περιεκτικότητα σε λιποειδή είναι χαμηλή 20-30g/Kg (2-6% επί ξηρής μάζας) με το λινελαϊκό οξύ (C18:2), το ελαϊκό οξύ (C 18:1) και το παλμιτικό οξύ (C 16:0) να είναι τα κυριότερα λιπαρά οξέα [3].

Επιπλέον, τα μανιτάρια περιέχουν τέφρα 80-120g/Kg επί ξηρής μάζας στην οποία απαντάται το κάλιο (K), ο φώσφορος (P), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca), ο χαλκός (Cu), ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), το μαγγάνιο (Mn) και το σελήνιο (Se). Ακόμη τα μανιτάρια είναι πηγές βιταμινών B1, B12, C, D, φυλλικού οξέος, ριβοφλαβίνης (B2) καθώς και νιασίνης. Εντούτοις, θα πρέπει να σημειωθεί πως η περιεκτικότητα όλων των παραπάνω ενώσεων ποικίλει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας καθώς και τις συνθήκες συλλογής των μανιταριών. Παραδειγματικά η βιταμίνη D2 συναντάται μόνο σε άγρια μανιτάρια καθώς οι καλλιέργειες των μανιταριών δεν διαθέτουν ηλιακό φως και χρειάζονται φώτα UV-B για να παραχθεί η βιταμίνη αυτή. Η τελική σύσταση του μανιταριού επηρεάζεται και από τον τρόπο μαγειρικής παρασκευής που θα υποστεί από τον καταναλωτή [5].

Αξιοσημείωτο είναι πως το θερμιδικό περιεχόμενο των μανιταριών είναι αρκετά χαμηλό, όπως και το νάτριο, τα λιποειδή και η χοληστερόλη, κάτι που τα καθιστά εξαιρετική επιλογή για υποθερμιδικές και χορτοφαγικές δίαιτες ενώ είναι η μόνη φυτικής προέλευσης τροφή που περιέχει βιταμίνη D.

Οι υδατάνθρακες των μανιταριών συνίστανται κυρίως από πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα [5]. Η σύνθεση των πολυσακχαριτών στα μανιτάρια δεν είναι όμοια, εξαρτάται από την προέλευση, το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης καθώς και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Οι πολυσακχαρίτες που αφθονούν στα μανιτάρια είναι κυρίως η χιτίνη, η ημικυτταρίνη, οι β- καθώς και α- γλυκάνες, οι μαννάνες, οι ξυλάνες και οι γαλακτοζάνες ενώ το μοριακό τους βάρος εξαρτάται από την προέλευση τους και κυμαίνεται από 5 έως 2000 kDa [6]. Η χιτίνη είναι ένας στηρικτικός αμινο-πολυσακχαρίτης με δομικές μονάδες μόρια N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένα με β (1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, βρίσκεται στο κέλυφος των μαλακόστρακων, στον σκελετό ορισμένων εντόμων και αντικαθιστά την κυτταρίνη στα κυτταρικά τοιχώματα ορισμένων

φυτών. Μαζί με τις β-γλυκάνες η χιτίνη δημιουργεί ένα δυνατό κυτταρικό τοίχωμα για τους μύκητες.

Οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών παρουσιάζονται κυρίως είτε ως γραμμικές είτε ως διακλαδισμένες γλυκάνες με διαφορετικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς όπως (1→3), (1→6), (1→4)-β-γλυκάνες καθώς και (1→3)-α-γλυκάνες. Εντούτοις υπάρχουν και ετεροπολυσακχαρίτες οι οποίοι μπορεί να περιέχουν γλυκουρονικό οξύ, ξυλόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, αραβινόζη και ριβόζη [2]. Λόγω της ύπαρξης αυτών των ενώσεων, των διαλυτών και μη διαλυτών φυτικών ινών, τα μανιτάρια εντάσσονται στα τρόφιμα τα οποία συμβάλλουν στην καλή πεπτική λειτουργία του οργανισμού.

Ωστόσο, παρά την πληθώρα θρεπτικών συστατικών που παρέχουν τα μανιτάρια στον ανθρώπινο οργανισμό το έδαφος περιέχει διάφορα συστατικά και βαρέα μέταλλα όπως αρσενικό, κάδμιο, υδράργυρο, μόλυβδο και ψευδάργυρο που μεταφέρονται στον σώμα του μανιταριού με αποτέλεσμα να βλάπτουν την υγεία του καταναλωτή. Αυτό συμβαίνει κυρίως στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη, όπου η συλλογή άγριων μανιταριών του δάσους αποτελεί σημαντική ασχολία της καθημερινότητας των πολιτών. Υπάρχουν εδάφη στην Ευρώπη που μετά από 30 χρόνια από το δυστύχημα του Chernobyl περιέχουν ραδιενεργό καίσιο (^{137}Cs) το οποίο συσσωρεύεται σε ορισμένα μανιτάρια. Ωστόσο, ελπιδοφόρο είναι το γεγονός πως η ποσότητα των βλαβερών αυτών ραδιενεργών συστατικών φθίνει με το πέρασ του χρόνου αλλά και κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος και του μουλιάσματος [5].

1.2.2.1 Β-γλυκάνες στα μανιτάρια

Οι β-γλυκάνες αποκτούν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την ιατρική και φαρμακευτική κοινότητα λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των ανώτερων μυκήτων και αυτά τα οποία προσδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες στα μανιτάρια. Οι β-γλυκάνες βρίσκονται σε πολλά είδη τροφίμων, ένα εκ των οποίων είναι και τα μανιτάρια στα οποία μπορεί να περιέχονται είτε στο κυρίως σώμα του μανιταριού είτε στα σπόρια και στο μυκήλιο. Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες εξαρτάται από ο βαθμό ωρίμανσης του σώματος του μανιταριού, με βέλτιστη τη περίοδο πριν την ωρίμανση των σπορίων [5]. Συνήθως κυμαίνεται από 0.21 έως 0.53g/100g επί ξηρής μάζας εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό (54-82%) ανήκει στις αδιάλυτες ίνες ενώ το 16-46% ανήκει στις διαλυτές. Είναι αξιοσημείωτο πως η διαλυτότητα αυξάνεται με την επίδραση της θέρμανσης και ως εκ τούτου το μαγείρεμα των μανιταριών συνεισφέρει σε αυτό καθώς οι διαλυτές ίνες

είναι αυτές που ευεργετούν τον οργανισμό ως ωφέλιμα συστατικά και συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον.

Οι γλυκάνες διαφέρουν δομικά ως προς τις πλευρικές αλυσίδες τους και αυτό τις καθιστά μοναδικές ως προς τα διάφορα είδη των μυκήτων. Οι πιο άφθονες β-γλυκάνες του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος είναι οι β-1,3-γλυκάνες που αποτελούν το 65-90% όλων των β-γλυκανών του μύκητα [8]. Ωστόσο, στα μανιτάρια οι υπόλοιπες μορφές β-γλυκανών που συναντώνται είναι οι β (1→6) καθώς και οι β (1→4).

Έρευνες καταδεικνύουν πως οι β-γλυκάνες παρουσιάζουν ανοσορρυθμιστική δράση με ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και παραγωγή αντισωμάτων ενώ σημαντικές είναι και οι αντικαρκινικές δράσεις που πιθανότατα προσφέρουν κυρίως οι β-(1→3) γλυκάνες με επιπλέον β-(1→6) πρόσθετα σημεία διακλάδωσης [4].

Ορισμένες β-γλυκάνες φαίνεται πως προωθούν την δραστηριότητα των μακροφάγων και ως εκ τούτου αυξάνεται και η παραγωγή των IL-1, IL-6 καθώς και IL-8 οι οποίες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και παραγωγή και άλλων λευκοκυττάρων. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη, πως η αυξημένη κατανάλωση συγκεκριμένων β-γλυκανών μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή της ινσουλίνης, αυξάνοντας την κατά 25%, κάτι που μπορεί να βοηθήσει τα επόμενα χρόνια στην αντιμετώπιση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II [7].

Επιπλέον, οι β-γλυκάνες φαίνεται πως παρουσιάζουν κάποια δραστηριότητα στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης του αίματος σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα. Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι β-γλυκάνες των μυκήτων φαίνεται πως μειώνουν τόσο τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης όσο και τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης του αίματος. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη πως υπάρχει μείωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων αλλά και μικρή αύξηση της HDL-χοληστερόλης. Τα μειωμένα επίπεδα της χοληστερόλης φαίνεται πως συνδέονται με την αυξημένη ποσότητα της λεπτίνης. Ωστόσο, η σύνθεση της λεπτίνης, μίας πολύ σημαντικής ορμόνης για τον ανθρώπινο οργανισμό που ελέγχει το αίσθημα της πείνας, φαίνεται πως υποστηρίζεται μόνο από τη συμπληρωματική χορήγηση β-γλυκανών. Περαιτέρω έρευνα της σχέσης αυτής πιθανόν να αναδείξει σημαντικά οφέλη για το λιπιδαιμικό προφίλ του ανθρώπινου οργανισμού μετά τη συμπληρωματική χορήγηση β-γλυκανών [7].

1.2.3 Ευεργετικές ιδιότητες μανιταριών

Με το πέρασμα των αιώνων, η παραδοσιακή ιατρική έχει παραχωρήσει τη θέση της στην επιστήμη και την έρευνα. Πιστεύεται πως τα μανιτάρια εκτός από τις σημαντικές

διατροφικές ιδιότητες που προσδίδουν στο ανθρώπινο σώμα (καθώς διαθέτουν χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο, νάτριο, λιποειδή και χοληστερόλη και είναι πλούσια σε βιταμίνες, πρωτεΐνες, διαιτητικές ίνες και ιχνοστοιχεία) κατέχουν και έναν σημαντικό ρόλο στην υγεία και την ευημερία του ανθρώπινου οργανισμού παρέχοντας του πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων. Μέρος των ιδιοτήτων αυτών οφείλεται στα βιολογικά ενεργά συστατικά των μανιταριών όπως είναι οι πολυσακχαρίτες που έχουν μελετηθεί περισσότερο, οι γλυκοπρωτεΐνες και τα τριτερπένια [4]. Οι ευεργετικές δράσεις που πιθανολογείται πως οφείλονται στα μανιτάρια είναι μεταξύ άλλων:

- αντικαρκινική
- ανοσορρυθμιστική
- αντιφλεγμονώδης δράση
- αντιβακτηριακή καθώς και αντιμικροβιακή δράση
- αντιοξειδωτική δράση
- πιθανή πρεβιοτική δράση

Επιπλέον, η ενσωμάτωση των βρώσιμων μανιταριών στην διατροφή μπορεί να επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα σε καρδιαγγειακές παθήσεις, στο διαβήτη, στην οστεοπόρωση, στο κοινό κρυολόγημα καθώς ακόμη και στην αντιμετώπιση της νόσου του AIDS [5].

1.2.3.1 Ανοσορρυθμιστική δράση

Αρκετές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια καταδεικνύουν πως συστατικά των ανώτερων βρώσιμων μυκήτων παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα σε κυτταρικές δραστηριότητες καθώς και στην δευτερογενή παραγωγή χημικών ενώσεων που μπορούν να ενισχύσουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και να υποστηρίξουν την θεραπεία διαφόρων ασθενειών [7]. Οι β-γλυκάνες είναι ένα από τα συστατικά των μανιταριών που εμφανίζουν ανοσορρυθμιστικές δράσεις χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις και βρίσκονται στο επίκεντρο της έρευνας [24]. Έχει φανεί πως πιθανόν εμφανίζουν θετικές επιπτώσεις στη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος με ενεργοποίηση των μακροφάγων, φαγοκυττάρωση των παθογόνων καθώς και ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών [25]. Επιπλέον, οι λεκτίνες ορισμένων μανιταριών παρουσιάζουν εκτός των άλλων ιδιοτήτων τους ανοσορρυθμιστική δραστηριότητα [26].

1.2.3.2. Αντικαρκινική δράση

Σε μία εποχή που ο καρκίνος ως ασθένεια απειλεί τη ζωή χιλιάδων ανθρώπων, η επιστήμη έχει στραφεί και στην αξιοποίηση των βασιδιομυκήτων. Έρευνες δείχνουν πως τα μανιτάρια μπορούν στο μέλλον να έχουν κάποια θέση στη πρόληψη αλλά και στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Η ιδιότητα τους αυτή οφείλεται κυρίως στους πολυσακχαρίτες των μανιταριών, τις β-γλυκάνες αλλά και στις λεκτίνες που περιέχουν. *In vitro* έρευνες καθώς και κλινικές μελέτες, έχουν δείξει πως η κατανάλωση ορισμένων καρποφοριών βασιδιομυκήτων μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της ογκογένεσης, με τις γλυκάνες των μυκήτων να κατέχουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες [7]. Τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση φαίνεται πως διαθέτουν οι β-1,3-γλυκάνες με 1,6 δεσμούς διακλάδωσης και μοριακό βάρος 400kDa. Οι γλυκάνες των μανιταριών εμφανίζουν την αντικαρκινική δράση τους κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.

1.2.3.3 Πρεβιοτική δράση μανιταριών

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη για εναλλακτικές πηγές πρεβιοτικών έχει οδηγήσει στους βασιδιομύκητες ως υποψήφια πηγή πρεβιοτικών αφού όπως αναφέρθηκε περιέχουν β-γλυκάνες που φαίνεται να εμφανίζουν πιθανή πρεβιοτική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα μανιτάρια που συνδυάζουν τόσο γεύση, υφή, άρωμα όσο και ευεργετικά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον η καλλιέργεια τους είναι οικονομική, η παραγωγή τους αυξημένη λόγω της μεγάλης ζήτησης που υπάρχει από τους καταναλωτές παγκοσμίως και οι τρόποι μαγειρικής παρασκευής τους άφθονοι. Ως εκ τούτου τα μανιτάρια είναι υποψήφια ως εναλλακτική πηγή πρεβιοτικών, κάτι που βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Η πρεβιοτική τους δράση έγκειται στο ότι ο ανθρώπινος οργανισμός δεν διαθέτει τα ένζυμα για να υδρολύσει τους β-γλυκοζυτικούς δεσμούς στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα και με αυτό τον τρόπο οι ουσίες αυτές γίνονται ανθεκτικές στα πεπτικά ένζυμα του στομάχου. Ως εκ τούτου καταλήγουν να υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου και να αυξάνουν την ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου.

1.3 *Pleurotus ostreatus*

Το *Pleurotus ostreatus* ανήκει στο γένος *Pleurotus* το οποίο αριθμεί πάνω από 40 είδη στην οικογένεια των Tricholomataceae [9]. Λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής καθώς και της καλής ικανότητας προσαρμογής που διαθέτει καλλιεργείται ευρέως σε όλο τον κόσμο και κυρίως στην Ασία, την Ευρώπη και την Αμερική. Μεγάλο είναι το ενδιαφέρον για τα μανιτάρια αυτά, τόσο στο ερευνητικό όσο και στο διατροφικό επίπεδο, καθώς συνδυάζουν γεύση, διατροφική αξία και φαρμακευτικές ιδιότητες. Επιπροσθέτως η καλλιέργεια των *Pleurotus* δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την θερμοκρασία, δεν προσβάλλεται εύκολα από ασθένειες ενώ δεν χρειάζεται προϊόντα λιπάσματος ή ασβεστόλιθο για την καλλιέργεια του [10].

Ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια του χρησιμοποιείται πριονίδι ξύλου, φλοιός βαμβακόσπορου, άχυρο, απόβλητα χαρτιού, φύλλα, υπολείμματα ζαχαροκάλαμου καθώς και φύλλα μπανανιάς. Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, φώσφορο, ασβέστιο, σίδηρο, κάλιο, νάτριο καθώς και βιταμίνες όπως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, φυλλικό οξύ και νιασίνη [10].

Πολλά φαίνεται να είναι τα οφέλη των μανιταριών του γένους *Pleurotus* που έχουν κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς πολλές ενώσεις που απομονώθηκαν εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη δράση ενώ φαίνεται πως διαδραματίζουν θετικό ρόλο τόσο στην υπερχοληστερολαιμία όσο και στην υπέρταση [12]. Συγκεκριμένα έχει πραγματοποιηθεί αρκετά μεγάλη έρευνα ως προς την αντιοξειδωτική δράση που φαίνεται να εμφανίζει το *Pleurotus ostreatus* συγκρινόμενο με γνωστό εμπορικό προϊόν, κάτι που ανοίγει συζητήσεις για μία ενδεχόμενη θέση των μανιταριών στην φαρμακευτική βιομηχανία. Οι κύριες ουσίες των μανιταριών του γένους *Pleurotus* που παρουσιάζουν φαρμακευτικές ιδιότητες είναι οι λεκτίνες που παρουσιάζουν αντικαρκινική καθώς και ανοσορρυθμιστική δράση, οι φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές δράσεις και οι β-γλυκάνες [3]. Συγκεκριμένα το *Pleurotus ostreatus* φαίνεται πως εμφανίζει αντικαρκινικές ιδιότητες και υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικούς ασθενείς, κάτι που οφείλεται κυρίως στη χημική σύσταση των μανιταριών αυτών [9]. Ακόμη έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια κατέδειξαν πως παρουσιάζει μείωση της χοληστερόλης λόγω των β-1,3-D-γλυκανών που περιέχει [5]. Παρότι δεν είναι ακόμη γνωστός ο ακριβής μηχανισμός που πραγματοποιείται κάτι τέτοιο, οι β-γλυκάνες του *P. ostreatus* αυξάνουν την αντίσταση του

εντερικού βλεννογόνου σε φλεγμονώδεις καταστάσεις ενώ αναστέλλουν και την ανάπτυξη εντερικού έλκους [7].

Πλευράνες

Οι β-γλυκάνες όπως έχει ήδη αναφερθεί παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των σημαντικών ευεργετικών ιδιοτήτων που φαίνεται να προσφέρουν στον ανθρώπινο οργανισμό [11]. Μία από τις σημαντικότερες πηγές β-γλυκανών είναι τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* που αποκαλούνται πλευράνες (pleuran). Οι πλευράνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως συμπληρώματα διατροφής λόγω της ανοσοκατασταλτικής τους δράσης. [13]. Έρευνες έχουν δείξει πως οι πλευράνες παρουσιάζουν

-αντιοξειδωτική

-ανοσορυθμιστική

-αντιφλεγμονώδη

-αναλγητική [6],

-αντικαρκινική δράση [7].

Επιπλέον αυξάνουν την αντίσταση του εντερικού βλεννογόνου σε πιθανές φλεγμονές και αναστέλλουν την ανάπτυξη εντερικών ελκών [7]. Ο μηχανισμός που πραγματοποιείται κάτι τέτοιο δεν είναι ακόμη γνωστός, εντούτοις φαίνεται πως οι πλευράνες μειώνουν την ποσότητα των συζυγών διενίων στο εντερικό περιβάλλον, στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Η περιεκτικότητα των πλευρανών υπολογίζεται στα 2,2 - 5,3 mg/g ξηρής μάζας εκ των οποίων οι 37.8% είναι υδατοδιαλυτές ενώ το υπόλοιπο 62.2% είναι μη διαλυτές β-γλυκάνες. Οι πλευράνες έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 600000-700000 Da ενώ η δομή που συναντάται συνήθως είναι η β-(1,3)-D-γλυκάνες και οι β-(1,6)-D-γλυκάνες [4] [13].

1.4 *Ganoderma lucidum*

Η χρήση του *Ganoderma lucidum* έχει βαθιές ρίζες στο χρόνο, καθώς για χιλιάδες χρόνια χρησιμοποιείτο σε χώρες όπως η Κίνα, η Ιαπωνία καθώς και σε άλλες ασιατικές χώρες ως φάρμακο στην παραδοσιακή ιατρική. Θωρείται ακόμη και σήμερα στις χώρες αυτές, πως προάγει την υγεία και συμβάλλει στη μακροβιότητα καταπολεμώντας μία πληθώρα ασθενειών ενώ το όνομα του Lingzhi αναφέρεται σε πνευματική δύναμη και αιώνια αθανασία. Έχει υπάρξει έμπνευση για καλλιτέχνες, έχει συσχετιστεί με θρησκείες ενώ έχει

συμπεριληφθεί σε πολλά βιβλία. Τα οφέλη που αποδίδονταν στο μανιτάρι αυτό ήταν τονωτικές επιδράσεις στον οργανισμό, ενίσχυση της καρδιακής λειτουργίας, ενίσχυση της ζωτικής ενέργειας και της μνήμης, καθώς και αντιγηραντικά αποτελέσματα.

Πέραν όμως από αυτές τι εικασίες που στηρίζονται σε παραδοσιακές τεχνικές και πολιτιστικά ήθη, μεγάλο είναι το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια για το *Ganoderma lucidum* καθώς φαίνεται να είναι πολλά τα οφέλη του που υποστηρίζονται επιστημονικά.

Το *Ganoderma lucidum* είναι ένα μεγάλο, σκούρο ξυλώδες μανιτάρι γυαλιστερό εξωτερικά. Καλλιεργείται σε ξύλο, άχυρο ή πριονίδι και το όνομα του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «γάνος» που σημαίνει λαμπερός και τη λέξη δέρμα.

Το *Ganoderma lucidum* ανήκει στην οικογένεια Ganodermataceae που περιλαμβάνει πολύπορους βασιδιομύκητες ενώ συνολικά 219 είδη της οικογένειας ανήκουν στο γένος *Ganoderma*. Τα διαφορετικά είδη του μανιταριού αυτού βρίσκονται παντού ανά τον κόσμο με διαφορετικά χαρακτηριστικά σε κάθε περιοχή όπως το σχήμα και το χρώμα του σώματος του μανιταριού που μπορεί να ποικίλει από μαύρο και κόκκινο μέχρι άσπρο και κίτρινο.

Είναι πλέον γνωστό πως το *G. lucidum* είναι μοναδικό για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες παρά για την διατροφική του αξία. Άλλωστε λόγω της ξυλώδους υφής του παραδίδεται στο εμπόριο ως σκόνη, συμπλήρωμα, τσάι, ακόμη και έλαιο. Ωστόσο, τα μανιτάρια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιποειδή και υψηλή σε φυτικές ίνες και υδατάνθρακες και αυτά τα καθιστά μία καλή διατροφική πηγή ενέργειας, Πιο συγκεκριμένα τα κύρια συστατικά που περιέχει το *Ganoderma lucidum* είναι υδατάνθρακες 26-28%, πρωτεΐνη 7-8%, λιποειδή 3-5%, ακατέργαστες ίνες 59% καθώς και τέφρα 1,8% .

Παρόλα αυτά, τα οφέλη του μανιταριού οφείλονται κυρίως στη πληθώρα βιοενεργών συστατικών που περιέχει όπως τα τριτερπένια, τους πολυσακχαρίτες όπως οι β-γλυκάνες, τις στερόλες, τις φαινόλες καθώς και τις γλυκοπρωτεΐνες του. Οι πολυσακχαρίτες του *G.lucidum* είναι κυρίως ετεροπολυμερείς υψηλού μοριακού βάρους και η γλυκόζη αποτελεί το κυριότερο συστατικό του μορίου ενώ ενώνεται με μόρια όπως η ξυλόζη, η μαννόζη, η γαλακτόζη καθώς και η φουκόζη ολοκληρώνοντας έτσι τον πολυσακχαρίτη. Επιπροσθέτως αυτή η φυσική ξυλώδης υφή του *G.lucidum* έγκειται στο γεγονός ότι περιέχει χιτίνη, έναν πολυσακχαρίτη η δομή του οποίου είναι ανάλογη με της κυτταρίνης και βρίσκεται κυρίως σε οστρακόδερμα. Η δεύτερη μεγάλη βιοενεργή ομάδα του *G.lucidum* είναι τα τριτερπένια, μία σημαντική υπο-ομάδα των τερπενίων τα οποία αποτελούνται από έξι μονάδες ισοπρενίου. Είναι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις οι οποίες στοχεύουν στην κυτταρική απόπτωση, στην αγγειογένεση καθώς και στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο η

περιεκτικότητα των τριτερπενίων είναι διαφορετική σε διαφορετικά σημεία και στάδια ωρίμανσης του μανιταριού. Ο σημαντικότερος υπότυπος των τριτερπενίων είναι το γανοδερικό οξύ το οποίο αποτελείται από 4 κυκλικά και 2 γραμμικά ισοπρένια και υπάρχουν προτάσεις που αποδίδουν κυρίως σε αυτό το πλήθος οφελών του μανιταριού. Μέσα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, τα κύρια οφέλη που αποδίδονται στο *G.lucidum* είναι η βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω των πολυσακχαριτών που περιέχει, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική καθώς και κυτοτοξική δραστηριότητα, αντιμεταστατικές ιδιότητες, δράση κατά του ιού HIV, νευροπροστατευτικές ιδιότητες καθώς και μείωση συμπτωμάτων παθολογικής φύσεως στο ουροποιητικό σύστημα των αντρών [14].

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες οφείλονται κυρίως στους πολυσακχαρίτες που έχουν απομονωθεί από το *Ganoderma lucidum* οι οποίοι παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση σε πειράματα *in vitro* σε περιπτώσεις λευχαιμίας, λεμφώματος, καρκίνου του μαστού καθώς και της ουροδόχου κύστης. Άλλες έρευνες υποστηρίζουν πως δύο πολυσακχαρίτες, ο GP-1 και ο GP-2 που προέρχονται από το συγκεκριμένο μανιτάρι, παρουσιάζουν ανοσοτροποποιητική δράση ενώ οι ενεργές πρωτεογλυκάνες GLIS επιδεικνύουν μία υψηλή ικανότητα για αύξηση της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης σε ποντίκια που φέρουν όγκο [5].

2. Εντερικός μικροβιόκοσμος

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονη ερευνητική δραστηριότητα γύρω από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου, με ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Σε αυτό έχει συνεισφέρει σημαντικά η πρόοδος των βιοτεχνολογικών μέσων καθώς έχει προσφέρει ταχύτατες αναλύσεις που επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της σύνθετης βιοποικιλότητας του ανθρώπινου οργανισμού. Μία από τις σπουδαιότερες τεχνικές που έχουν συμβάλει στο έργο αυτό, είναι η ταχεία ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA με διαδικασίες που καθιστούν εφικτό τον λεπτομερή χαρακτηρισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου, της αλληλεπίδρασης των μικροβίων μεταξύ τους καθώς και την σχέση που αναπτύσσεται με την λειτουργία του οργανισμού τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε παθολογικό επίπεδο. Συγκεκριμένα μεταβολές στην σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου έχουν συσχετιστεί με πολλαπλά νοσήματα όπως ο ορθοκολικός καρκίνος, η παχυσαρκία, διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου καθώς και αλλεργίες [15]. Αυτό συμβαίνει καθώς το ανθρώπινο σώμα αποικείται σε υπερμεγέθη αριθμό από μικροοργανισμούς (βακτήρια, ιούς, αρχαία, φάγους, μύκητες) που

ζουν συμβιωτικά με τον οργανισμό και διαμορφώνουν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα. Υπολογίζεται πως ο αριθμός αυτός κυμαίνεται στα 10^{14} βακτηριακά κύτταρα (με αυστηρώς αναερόβια βακτήρια να κυριαρχούν), κάτι που ξεπερνά ακόμα και τον αριθμό των ίδιων των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο είναι γνωστό πως μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 20-40% μπορούν να καλλιεργηθούν, καθώς μεγάλος αριθμός αναερόβιων μικροοργανισμών είναι απίθανο να καλλιεργηθεί με τις σύγχρονες μικροβιολογικές τεχνικές [16]. Τα βακτήρια αυτά αποικούν σχεδόν κάθε επιφάνεια του σώματος που έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον όπως το δέρμα, η αναπνευστική οδός, η γαστρεντερική οδός αλλά και η ουρογεννητική οδός. Ο ξενιστής παρέχει τροφή και χώρο ανάπτυξης στις μικροβιακές κοινότητες ενώ αντλεί πολλά οφέλη για τις μεταβολικές και αμυντικές λειτουργίες του οργανισμού του [17]. Οι κύριες λειτουργίες που αποδίδονται στο ανθρώπινο μικροβίωμα είναι ο καταβολισμός των άπεπτων φυτικών ινών, ο μεταβολισμός των χολικών αλάτων, η σύνθεση βιταμινών και κυρίως της βιταμίνης K και B₁₂, ο καταβολισμός λιπαρών οξέων, η ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων καθώς και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [15].

Η σύσταση του εντερικού μικροβιώματος διαφέρει ανάμεσα σε άτομα του ίδιου φύλου, μεταξύ των φίλων αλλά και μεταξύ ατόμων με διαφορετική ηλικία. Κάθε άνθρωπος φιλοξενεί το δικό του ξεχωριστό υπόδειγμα της βακτηριακής του σύνθεσης που αποτελείται από 600000 μικροβιακά γονίδια [17]. Ωστόσο, ο εντερικός μικροβιόκοσμος των περισσότερων ανθρώπων μπορεί κατηγοριοποιηθεί σε μια από τις τρεις ομάδες: Bacteroides, Prevotella, Ruminococcus ενώ η επικράτηση του κάθε εντερότυπου καθορίζεται από διαιτητικούς παράγοντες [15]. Υπάρχουν περίπου 400-500 είδη μικροβίων που συνιστούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο που ανήκουν κυρίως στα δύο φύλα Firmicutes (gram+) και Bacteroidetes (gram-). Επίσης και τα Actinobacteria (gram+) ανιχνεύονται στο παχύ έντερο [16]. Το φύλο Firmicutes είναι το μεγαλύτερο και αριθμεί πάνω από 200 γένη όπως το *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* και *Clostridium* [16]. Σε μικρότερη αναλογία παρουσιάζονται τα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria καθώς και Cyanobacteria. Ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηριακών κυττάρων εντοπίζεται στο παχύ έντερο και ως εκ τούτου το ανθρώπινο μικροβίωμα είναι σε αυτή τη περιοχή πολύ πυκνότερο και πολύπλοκο.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος μεταβάλλεται στα διάφορα στάδια της ηλικίας. Κατά την μεταγεννητική περίοδο, το νεογνό που είναι στείρο μικροβίων καθώςον βρίσκεται στη μήτρα μεταφέρεται σε ένα περιβάλλον με μικροβιακό φορτίο και αρχίζει σταδιακά η αποίκηση του από μικροοργανισμούς. Αξιοσημείωτο είναι πως η διαδικασία του τοκετού επηρεάζει την

ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος καθώς το νεογνό έρχεται σε επαφή με τα μικρόβια του γεννητικού σωλήνα της μητέρας. Κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή και παρουσιάζουν διαφορετική σύσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Πολλή σημαντική θέση στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου κατέχει και το μητρικό γάλα, καθώς οι εκκρίσεις του μαστού περιέχουν αντισώματα IgA, καζεΐνη και λακτοφερίνη που θωρακίζουν το νεογνό. Ο πρώτος χρόνος της ζωής ενός παιδιού είναι ιδιαίτερα σημαντικός ως προς τη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιώματος καθώς μετά το πέρας του χρόνου, ομοιάζει με εκείνο ενός ενήλικα και ασκεί τη μεγαλύτερη δράση του στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στην ηλικία πλέον των τεσσάρων ετών, ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει ωριμάσει και αποκατασταθεί πλήρως. Η τελική πλέον σύσταση του, έχει διαμορφωθεί βάσει της φυσιολογίας του ξενιστή, του γενότυπου, του ιστορικού του αλλά και βάσει του περιβάλλοντος [16].

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ενηλίκων παραμένει αρκετά σταθερός με μικρές διακυμάνσεις έως την 7^η δεκαετία. Αντίθετα ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ηλικιωμένων ανθρώπων παρουσιάζει μεγάλες διαφορές σε κάθε άτομο ξεχωριστά και διαφέρει από εκείνη των νεότερων ανθρώπων. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό πως η διαιτητική συμπεριφορά του ανθρώπου επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου του και αυτός είναι ένας παράγοντας που οδηγεί μετέπειτα στην υγεία ή την ασθένεια.

Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη σύσταση του είναι τα αντιβιοτικά. Η χρήση των αντιβιοτικών γίνεται όλο και συχνότερη με αποτέλεσμα να καταστρέφεται ανεπιστρεπτί κάποιες φορές η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου απομακρύνοντας ωφέλιμα μικρόβια. Η απομάκρυνση αυτή μπορεί να επάγει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών με άσχημες συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η επιρροή των αντιβιοτικών φαρμάκων ξεπερνιέται σε κάποιες περιπτώσεις μέσα σε κάποιες εβδομάδες και η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου επανέρχεται, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις η αρχική σύνθεση μπορεί να μην επανέλθει.

2.1 *Bifidobacterium* spp.

Ορισμένα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* αναγνωρίζονται συχνά ως προβιοτικά λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων που προσδίδουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Υπολογίζεται πως αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% του εντερικού μικροβιόκοσμου ενός ενήλικα με το *Bifidobacterium longum* να είναι ένα από τα κυρίαρχα στελέχη [21]. Τα στελέχη του γένους

Bifidobacterium παράγουν γαλακτικό οξύ καθώς και οξικό οξύ ως τα κύρια παραπροϊόντα της ζύμωσης των υδατανθράκων, ενώ παράγουν και μικρές ποσότητες φορμικού οξέως και αιθανόλης. Κάποιες από τις ευεργετικές δράσεις των μικροοργανισμών αυτών είναι η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, η παραγωγή βιταμίνης D, η αναστολή της αύξησης των παθογόνων μικροοργανισμών, ή μείωση της αμμωνίας καθώς και των επιπέδων χοληστερόλης του αίματος ενώ σημαντική είναι η δράση των *Bifidobacterium* στην επαναφορά των βακτηριακών πληθυσμών σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από λήψη αντιβιοτικών [5]. Επιπλέον, έρευνες σε πειραματόζωα που έχουν δεχτεί πρεβιοτική θεραπεία έχουν δείξει πως οι μικροοργανισμοί αυτοί συμβάλουν στην μείωση της συγκέντρωσης των εντερικών ενδοτοξινών καθώς βελτιώνουν και την χαμηλού βαθμού φλεγμονή [19].

2.2 *Lactobacillus* spp.

Το γένος *Lactobacillus* είναι ταξινομικά σύνθετο και αποτελείται από περισσότερα από 170 είδη που δεν μπορούν εύκολα να διαφοροποιηθούν. Οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του ανθρώπινου σώματος, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν και παθογόνες καταστάσεις. Οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν τα σάκχαρα για να παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο ή μοναδικό προϊόν ζύμωσης. Είναι αερανεκτικά αναερόβιοι, Gram + μικροοργανισμοί και δεν παράγουν σπόρια. Μαζί με τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* αναφέρονται συνήθως ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί [13]. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί εκατοντάδες χρόνια στην παραγωγή γιαουρτιού, τυριού και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε όξινα περιβάλλοντα, ικανοί να αναπτύσσονται σε τιμές pH έως και 4. Ακόμη οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν μία ικανότητα να παρέχουν στα κύτταρα μία αντι-φλεγμονώδη απόκριση [27].

2.3 *Clostridium* spp.

Τα βακτήρια του γένους *Clostridium* είναι υποχρεωτικώς αναερόβια, Gram + βακτήρια που μπορούν να σχηματίσουν σπόρια. Αποτελούν ραβδόμορφους βακίλλους και βρίσκονται σε πολλά εδάφη, σε ιζήματα λιμνών αλλά και στην εντερική οδό. Αρκετά είδη του γένους *Clostridium* εκτελώντας τη ζύμωση σακχάρων παράγουν βουτυρικό οξύ ως τελικό προϊόν, καθώς και ακετόνη και βουτανόλη. Πολλά είδη του γένους *Clostridium* υπό ειδικές

συνθήκες είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένειες στον άνθρωπο και στο ζωικό βασίλειο καθώς παράγουν τοξίνες επικίνδυνες για την υγεία. Το είδος *C. perfringens* συνδέεται με ασθένειες όπως αεριογόνος γάγγραινα, επιλόχειος μόλυνση, τοξιναιμία και τροφική δηλητηρίαση.

2.4 *Bacteroides* spp.

Το γένος *Bacteroides* περιέχει υποχρεωτικά αναερόβια είδη τα οποία είναι Gram -. Τα είδη αυτά δεν παράγουν σπόρια και είναι σακχαρολυτικά δηλαδή έχουν την ικανότητα ζύμωσης σακχάρων. Ως κύρια προϊόντα ζύμωσης παράγουν οξικό και ηλεκτρικό οξύ. Διάφορα είδη του γένους *Bacteroides* είναι κυρίαρχα βακτήρια του παχέος εντέρου του ανθρώπου, ωστόσο μερικά είδη είναι παθογόνα και είναι από τα πιο σημαντικά αναερόβια βακτήρια που προκαλούν μολύνσεις στον άνθρωπο [28]. Αυτό συμβαίνει καθώς διαθέτουν ισχυρούς μηχανισμούς που τα καθιστά ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

2.5 Διαιτητικές Ίνες

Οι διαιτητικές ή φυτικές ίνες όπως ονομάζονται, αναγνωρίστηκαν ως ωφέλιμες ουσίες για τον ανθρώπινο οργανισμό στα μέσα της δεκαετίας του 1970, ωστόσο η έννοια της ίνας είχε ήδη εμφανιστεί κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1850 στη Γερμανία. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια καταδεικνύουν την σημαντικότητα των ινών στην καλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος καθώς και στην πρόληψη και αντιμετώπιση ενός αριθμού ασθενειών. Είναι δύσκολο παρόλα αυτά να υπάρξει ένας ενιαίος ορισμός για τις διαιτητικές ίνες ως μία ομοιογενή ομάδα καθώς αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά. Εντούτοις, με τον όρο διαιτητικές ίνες επικαλείται κάποιος τους άπεπτους -από τα ανθρώπινα ένζυμα- υδατάνθρακες και τη λιγνίνη που απαντάται στο εσωτερικό των φυτών. Οι διαιτητικές ίνες βρίσκονται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα ενός φυτικού κυττάρου που περιέχει πάνω από 95% φυτικές ίνες όπως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνες και πολυσακχαρίτες. Ως εκ τούτου, οι διαιτητικές ίνες στη τροφή του ανθρώπου προέρχονται από την κατανάλωση φυτικών τροφίμων ενώ σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των ινών που περιέχονται κατέχει το τμήμα του φυτικού τροφίμου που καταναλώνεται –ρίζα, φύλλα, μίσχος- καθώς και η ωριμότητα του φυτού. Στον πίνακα,

παρατίθενται οι σημαντικότερες διαιτητικές ίνες της διατροφής του ανθρώπου, η δομή, η αποικοδόμηση που υφίστανται καθώς και τα τρόφιμα στα οποία βρίσκονται.

Καθώς οι διαιτητικές ίνες δεν είναι μία ομοιογενής ομάδα όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των ινών. Μία εξ αυτών είναι η ομαδοποίηση βάσει της διαλυτότητας των ινών στο νερό καθώς κάποιες είναι υδατοδιαλυτές αλλά κάποιες άλλες δεν είναι. Στις υδατοδιαλυτές ίνες ανήκουν κάποιες ημικυτταρίνες, η πηκτίνη, τα κόμμεα καθώς και οι β-γλυκάνες ενώ στις αδιάλυτες ίνες η κυτταρίνη, η λιγνίνη και οι υπόλοιπες ημικυτταρίνες. Οι διαλυτές ίνες έχουν την ιδιότητα να καθυστερούν τη γαστρική εκένωση, να μειώνουν την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και το εντερικό περιεχόμενο να έχει αυξημένο χρόνο παραμονής στην γαστρεντερική οδό. Αντιθέτως οι αδιάλυτες ίνες έχουν μειωμένο χρόνο παραμονής στην γαστρεντερική οδό ενώ αυξάνουν τον όγκο των κοπράνων. Αυτό συμβαίνει καθώς η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων που επέρχεται με την διέλευση των ινών στο κόλον, προκαλεί αύξηση του όγκου των κοπράνων μέσω της αύξησης της μάζας των βακτηρίων.

Ένας δεύτερος τρόπος ταξινόμησης των ινών είναι η ικανότητα των ινών να υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια του παχέος εντέρου. Τα κύρια προϊόντα που παράγονται από την ζύμωση των φυτικών ινών είναι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, το γαλακτικό οξύ, το υδρογόνο, το διοξείδιο του άνθρακα καθώς και το μεθάνιο. Η ζύμωση της κάθε ίνας πραγματοποιείται από διαφορετικά βακτήρια, σε διαφορετική ποσότητα και παράγει συγκεκριμένα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Τα πλεονεκτήματα της ζύμωσης των ινών για το γαστρεντερικό σύστημα είναι μεταξύ άλλων

- η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στον αυλό του εντέρου**, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH του εντερικού περιβάλλοντος

- την αύξηση της απορρόφησης νερού και νατρίου στο κόλον**

- τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βλεννογόνου**

- την παροχή ενέργειας**, καθώς τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου αποτελούν ενεργειακή πηγή για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου.

Αντίθετα οι ίνες που δεν υφίστανται ζύμωση ή υφίστανται σε μικρό βαθμό όπως η κυτταρίνη, η λιγνίνη και η ημικυτταρίνη κατέχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των μικροβίων του παχέος εντέρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να πραγματοποιείται αύξηση του όγκου των κοπράνων με τον τρόπο που προαναφέρθηκε καθώς και αποτοξίνωση που παρέχεται με την αύξηση του αριθμού των μικροβίων και την απομόνωση ουσιών και τοξινών.

Ένας ακόμη τρόπος ταξινόμησης των διαιτητικών ινών είναι η ικανότητα κατακράτησης νερού και το ιξώδες. Αυτή η ικανότητα έγκειται στο γεγονός πως κάποιες ίνες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να προσροφούν νερό συγκριτικά με κάποιες άλλες. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της προσρόφησης νερού είναι η καθυστέρηση της εκκένωσης τροφής από το στομάχι, μείωση της λειτουργίας των ενζύμων με αποτέλεσμα τη αναστολή της ενζυμικής υδρόλυσης των θρεπτικών συστατικών, μείωση της ρυθμού διάχυσης των θρεπτικών συστατικών καθώς και μείωση του χρόνου παραμονής στο λεπτό έντερο.

Η μεγάλη ευεργετική δράση που προσδίδουν οι διαιτητικές ίνες στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί σημείο έρευνας για τις επιστήμες υγείας τα τελευταία χρόνια. Η επαρκής πρόσληψη των ινών μπορεί να:

-συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ασθενών μέσω της μειωμένης απορρόφησης των υδατανθράκων

-συμβάλλει στη μείωση της χοληστερόλης ορού που συνδέεται με καρδιαγγειακά νοσήματα

-οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών όπως χολόλιθοι, δυσκοιλιότητα, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, εγκολπωματίτιδα

-αποτελέσει προστασία ενάντια του καρκίνου του παχέος εντέρου

-να ωφελήσει άτομα που επιθυμούν να χάσουν βάρος με αύξηση της αίσθησης του κορεσμού.

Εν κατακλείδι η πρόσληψη των διαιτητικών ινών είναι απαραίτητη σε μία ισορροπημένη διατροφή καθώς οι κύριες πηγές φυτικών ινών είναι τα φρούτα, τα λαχανικά και τα σιτηρά που έχουν αποδεδειγμένα οφέλη για τον οργανισμό.

Διαιτητική Ίνα	Δομή	Αποικοδόμηση	Προέλευση
Κυτταρίνη	Γραμμικό πολυμερές μονάδων γλυκόζης συνδεδεμένο με β(1-4) γλυκοζ. δεσμό	Πολύ μικρό ποσοστό της κυτταρίνης αποικοδομείται από τα βακτήρια του π. εντέρου.	Πίτουρο, όσπρια, αρακάς, βολβοί, λάχανο, μήλα, σπόροι
Λιγνίνη	Τρισδιάστατο πολυμερές από φαινολικές μονάδες ενωμένες με ισχυρούς ενδομοριακούς δεσμούς.	Υφίσταται ζύμωση σε πολύ μικρό βαθμό.	Καρότα, σιτάρι, φρούτα με σπόρους όπως η φράουλα

Κόμμεα	Τα κύρια σάκχαρα είναι η γαλακτόζη, το γλυκουρονικό οξύ, το ουρονικό οξύ, η αραβινόζη, η ραμνόζη και η μαννόζη	Υφίστανται ζύμωση σε σημαντικό βαθμό από τα βακτήρια.	Πλιγούρι, κριθάρι, όσπρια
Πηκτίνη	Πρωτεΐον συστατικό της πηκτίνης το γαλακτουρονικό οξύ	Μεταβολίζονται σε μεγάλο βαθμό από τα βακτήρια του π. εντέρου.	Όσπρια,ξηροί καρποί, μήλα, φράουλες, ορισμένα λαχανικά
B-γλυκάνες	Ομοπολυμερή που αποτελούνται από μονάδες γλυκοπυρανόζης	Αποικοδομούνται σε μεγάλο βαθμό στο κόλον.	Βρώμη, Κριθάρι, Μανιτάρια
Φρουκτάνες-Ινουλίνη	Κεντρική αλυσίδα με 2 έως 60 μονάδες φρουκτόζης (β 2-1) δεσμούς και ένα μόριο γλυκόζης στη θέση C2 της αλυσίδας.	Υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια του π. εντέρου.	Πικραλίδα, κρεμμύδι, σκόρδα, μπανάνες
Χιτίνη	Μόρια N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένα με $\beta(1,4)$ δεσμούς	-	Κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων, κέλυφος μαλακοστράκων
Ανθεκτικό Άμυλο	Προκύπτει από την χημική τροποποίηση του αμύλου	Αποικοδομείται μερικώς Από τα βακτήρια του κόλον.	Στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων
Πολυδεξτρόζη	Αποτελείται από μόρια γλυκόζης και σορβιτόλης	Αποικοδομείται μερικώς από τα βακτήρια στο κόλον.	Σε σιρόπια

2.5.1 B-γλυκάνες

Οι γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες που σχηματίζονται από μονομερή γλυκόζης και περιλαμβάνουν την κυτταρίνη, το γλυκογόνο και τη δεξτράνη. Οι πιθανοί συνδυασμοί που μπορεί να προκύψουν στη φύση είναι περιορισμένοι και υπολογίζονται στους τριακόσιους, με τα ομοπολυμερή της D-γλυκόζης να είναι τα πιο συχνά. Η ποικιλία των συνδυασμών αυτών έγκειται στους διαφορετικούς δεσμούς που ενώνουν τα μόρια, στους υποκαταστάτες καθώς και στις διακλαδώσεις των αλυσίδων [20].

Οι β-γλυκάνες ανήκουν στις διαιτητικές ίνες και απαντώνται ως άπεπτοι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από μονομερή D-γλυκόζης ενωμένα με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες μπορεί να εμφανίζονται είτε ως γραμμικές αλυσίδες είτε ως διακλαδισμένες δομές ανάλογα πάντα με την προέλευση τους. Οι β-1,3-D-γλυκάνες καθώς και οι β-1,4-D-γλυκάνες παρουσιάζονται στα κυτταρικά τοιχώματα ανώτερων φυτών και σε

σπόρους ή δημητριακά ενώ οι β-1,6-D-γλυκάνες όπως και η β-1,3-D-γλυκάνες που προαναφέρθηκαν συντίθενται από μύκητες και ζύμες. [20]

Οι κυριότερες πηγές β-γλυκανών είναι τα δημητριακά και συγκεκριμένα η βρώμη και το κριθάρι, οι ζύμες, τα μανιτάρια, τα φύκια καθώς και κάποια βακτήρια.

Κάποια από τα σημαντικότερα οφέλη των β-γλυκανών είναι η ανοσοδιεγερτική και η αντικαρκινική τους δράση [20].

2.6 Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά ορίζονται ως «επιλεκτικά ζυμώσιμα συστατικά τα οποία επιτρέπουν συγκεκριμένες αλλαγές, τόσο στην σύνθεση όσο και στη δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου κάτι το οποίο παρέχει οφέλη στην υγεία και ευεξία του ξενιστή». Ωστόσο ο κύριος σκοπός των πρεβιοτικών είναι να διεγείρουν την ανάπτυξη ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων όπως είναι τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* καθώς και του γένους *Lactobacillus* τα οποία παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή.

Τα περισσότερα πρεβιοτικά είναι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες, με μικρή έρευνα να έχει πραγματοποιηθεί για τους άπεπτους πολυσακχαρίτες που τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να πραγματοποιείται. Τα κύρια πρεβιοτικά που είναι αναγνωρισμένα και διατίθενται στο εμπόριο είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, η ινουλίνη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη καθώς και η πολυδεξτρόζη [13]. Επιπλέον κάποιοι ολιγοσακχαρίτες όπως η μαννιτόλη, η μαλτοδεξτρίνη, η ραφινόζη και η σορβιτόλη παρουσιάζουν κάποια πρεβιοτική δράση και κατέχουν μία θέση ως υποψήφια πρεβιοτικά.

Πολλοί σύνθετοι υδατάνθρακες μακράς αλύσου που βρίσκονται σε τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα μανιτάρια, τα βότανα, οι ρίζες ραδικιών, η σόγια και οι πατάτες έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές εναλλακτικές πηγές πρεβιοτικών. Τα κύρια οφέλη που παρουσιάζουν τα πρεβιοτικά στον ξενιστή είναι:

- βελτίωση της ακεραιότητας του παχέος εντέρου
- ενίσχυση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος
- μείωση της συχνότητας και της διάρκειας των εντερικών λοιμώξεων
- συνολική βελτίωση της πέψης

Η επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης και της δραστηριότητας των εντερικών βακτηρίων που ενδεχομένως συνδέονται με την υγεία και ευεξία του ξενιστή είναι ένα από τα κριτήρια των πρεβιοτικών. Τα πρεβιοτικά αναφέρεται πως είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για την προαγωγή

της αύξησης των ευεργετικών και πιθανόν και προβιοτικών βακτηρίων όπως των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* ενώ καταστέλλουν την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών από τα γένη *Clostridium* και *Bacteroides* [4].

Ένα ποσοτικό εργαλείο για τη μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης *in vitro* έχει σχεδιαστεί και ονομάζεται Πρεβιοτικός Δείκτης-Prebiotic Index (Pi). Ο Πρεβιοτικός Δείκτης εμφανίζει θετικό αποτέλεσμα από την αύξηση των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, ενώ αρνητικό αποτέλεσμα εμφανίζεται από την αύξηση των *Bacteroides* και *Clostridium* [4].

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

Όπου Bif: *Bifidobacterium*, Bac: *Bacteroides*, Lac: *Lactobacillus*, Clos: *Clostridium*.

2.6.1 Ινουλίνη

Τα τελευταία χρόνια, καθώς η βιβλιογραφία εστιάζει στα πρεβιοτικά και την σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, η ινουλίνη έχει κερδίσει το ενδιαφέρον ως αναγνωρισμένο πλέον πρεβιοτικό μαζί με τους γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS). Ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα που ονομάζεται ITF- Inulin type fructans που περιέχει τόσο την ινουλίνη όσο και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) καθώς και την ολιγοφρουκτόζη. Η ολιγοφρουκτόζη σχηματίζεται από μερική υδρόλυση της ινουλίνης και περιέχει 2 έως 8 μόρια φρουκτόζης ενώ οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες έχουν παρόμοια δομή με αυτή της ολιγοφρουκτόζης με τη διαφορά ότι περιέχουν 2 έως 4 μόρια φρουκτόζης. Η ινουλίνη παράγεται από διάφορα φυτά στη φύση ενώ δομικά αποτελείται από μία αλυσίδα φρουκτόζης που περιέχει από 2 έως 60 μονάδες φρουκτόζης συνδεδεμένες με β-2,1 δεσμούς και από ένα μόριο γλυκόζης συνδεδεμένο στη θέση C2 της τελικής μονάδας φρουκτόζης. Η ινουλίνη διαφέρει από τους υπόλοιπους σακχαρίτες όπως η λακτόζη, η σουκρόζη, η κυτταρίνη ως προς το μοριακό βάρος που είναι συγκριτικά αυξημένο καθώς και τον τύπο γλυκοζιτικού δεσμού που διαθέτει. Η δράση της ινουλίνης έγκειται στο ότι είναι ανθεκτική στα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού καθώς περιέχει β-(2,1) γλυκοζυτικούς δεσμούς όπου τα πεπτικά ένζυμα δεν μπορούν να επέμβουν και να διασπάσουν. Συγκρατάλεγεται ως εκ τούτου στους άπεπτους ολιγοσακχαρίτες που καταλήγουν στο παχύ έντερο με σκοπό τη ζύμωση τους από τους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα από προβιοτικούς μικροοργανισμούς όπως του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Συγκεκριμένα τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium*

περιέχουν ένα ένζυμο, την β-φρουκτοζιδάση, που μπορεί να υδρολύσει τους δεσμούς. Η ινουλίνη ως πρεβιοτικό αυξάνει επιπλέον και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου και συγκεκριμένα οξικού οξέος ως τελικό προϊόν ζυμώσεως.

Εκτός της πρεβιοτικής της δράσης η ινουλίνη έχει κερδίσει το ενδιαφέρον και ως συστατικό λειτουργικών τροφίμων επιδεικνύοντας σημαντικά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η ινουλίνη συνήθως εκχυλίζεται από ρίζες ραδικιών αλλά υπάρχει και ως φυσικό συστατικό σε κάποια τρόφιμα όπως τα κρεμμύδια, τα σκόρδα, οι μπανάνες, η πικραλίδα, τα πράσα, τα σπαράγγια και είναι πλήρως διαλυτή [2],[4],[23]. Χρησιμοποιείται ευρέως ως υποκατάστατο λίπους καθώς και ως υποκατάστατο γλυκιάς γεύσης [22].

Πολλά φαίνεται πως είναι τα οφέλη της κατανάλωσης ινουλίνης καθώς προσδίδει ευεργετικά αποτελέσματα στον ανθρώπινο οργανισμό. Η κατανάλωση ινουλίνης σε συνδυασμό με μία διατροφή αυξημένων υδατανθράκων και χαμηλών λιπαρών παρέχει ευεργετικά οφέλη στα λιποειδή του πλάσματος μειώνοντας την ηπατική λιπογένεση καθώς και την συγκέντρωση τριακυλογλυκερολών του πλάσματος. Επιπλέον η κατανάλωση συμπληρωμάτων ινουλίνης για δύο μήνες από γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II, κατέδειξε βελτίωση των επιπέδων της γλυκόζης πλάσματος νηστείας, της ινσουλίνης καθώς και της αιμογλοβίνης A1c [23].

2.6.2 Β-γλυκάνες ως υποψήφιο πρεβιοτικό

Τα κύρια αναγνωρισμένα πρεβιοτικά που διατίθενται στο εμπόριο είναι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες, καθώς η μελέτη για τους άπεπτους πολυσακχαρίτες ως πιθανά πρεβιοτικά είναι ακόμα σε εξέλιξη. Εντούτοις, οι β-γλυκάνες κατέχουν μία ισχυρή θέση ως πιθανά πρεβιοτικά καθώς πληρούν αρκετά από τα κριτήρια που χρειάζονται. Όντας άπεπτοι πολυσακχαρίτες παρουσιάζουν αντίσταση στα πεπτικά ένζυμα του ανώτερου γαστρεντερικού συστήματος ενώ υφίστανται ζύμωση στο παχύ έντερο από τους μικροοργανισμούς αποδίδοντας ως κύρια παραπροϊόντα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, τα οποία μειώνουν το pH του εντέρου μέσω της ζύμωσης και αυξάνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών [20]. Έχει παρατηρηθεί αύξηση των ευεργετικών μικροοργανισμών όπως τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* καθώς και *Lactobacillus* [13].

2.7 Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου- SCFA

Σημαντικό ρόλο στην υγεία του ξενιστή φαίνεται πως κατέχουν τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου ως κύρια προϊόντα του μεταβολισμού του εντερικού μικροβιόκοσμου. Η παραγωγή τους είναι αποτέλεσμα ζυμώσεων που πραγματοποιούνται στο παχύ έντερο από τις τροφές που καταλήγουν εκεί άπεπτες. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη, οι ξυλάνες, το ανθεκτικό άμυλο, η ινουλίνη, οι β-γλυκάνες καθώς και άλλα άπεπτα συστατικά που περιέχονται στην τροφή του ανθρώπου, δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ανθρώπινα ένζυμα, με αποτέλεσμα να καταλήγουν να αποδομούνται στον κόλον μετά από ζύμωση από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Μέσω της διαδικασίας αυτής, αποδίδεται ενέργεια για την αύξηση των βακτηριακών πληθυσμών ενώ ταυτόχρονα παράγονται και τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που παράγονται είναι το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ. Υπάρχουν κάποια οφέλη προς τον οργανισμό που φαίνεται πως αποδίδονται στην παραγωγή αυτών των λιπαρών οξέων και είναι η επούλωση των πληγών, η αγγειοδιαστολή καθώς και η κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος, η δράση τους ως ρυθμιστές της φλεγμονής ενώ αποτελούν και πηγή ενέργειας. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και ιδιαίτερα το βουτυρικό οξύ αποτελεί πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη του εντερικού επιθηλίου, αφού επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση καθώς και τη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων [18]. Οι κύριοι παραγωγοί βουτυρικού οξέως είναι στελέχη που ανήκουν στο φύλο Firmicutes [15]. Τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου αντλούν 60-70% της απαιτούμενης ενέργειας που χρειάζονται από τα προϊόντα των μικροβιακών ζυμώσεων που γίνονται στο έντερο [17]. Επιπλέον, το οξικό και το προπιονικό οξύ μεταφέρονται στο ήπαρ και χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την λιπογένεση και την νεογλυκογένεση. Η ποσότητα καθώς και οι τύποι των λιπαρών οξέων που παράγονται είναι ανάλογοι με την ποσότητα, το είδος των υδατανθράκων που καταναλώνεται καθώς και με τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου του ξενιστή.

Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου συμβάλλουν στην ομοιόσταση του ξενιστή μειώνοντας το pH του εντερικού αυλού αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών [17].

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής πρεβιοτικής δράσης των εκχυλισμάτων των πολυσακχαριτών των στελεχών των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*. Παράλληλα αξιολογήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των προϊόντων ζύμωσης των εκχυλισμάτων αυτών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε επιθηλιακά ανθρώπινα εντερικά κύτταρα.

Πειραματικό Μέρος

3.1 Υποστρώματα προς εξέταση πιθανής πρεβιοτικής δράσης

Τα υποστρώματα που εξετάστηκαν για πιθανή πρεβιοτική δράση ήταν εκχυλίσματα πολυσακχαριτών που απομονώθηκαν από τα καρποσώματα των βασιδιομυκήτων του είδους *Pleurotus ostreatus* καθώς και του *Ganoderma lucidum* και παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ως εξής:

Η υδατική εκχύλιση και παραλαβή των πολυσακχαριτών από δείγματα καλλιεργημένων μανιταριών των ειδών *P. ostreatus* και *G. lucidum* βασίστηκε στη μεθοδολογία των Ruthes et al., (2015). Αρχικά 10 g λυοφιλωμένου δείγματος εκχυλίστηκαν με μεθανόλη για την αφαίρεση μη πολικών συστατικών όπως λίπη κ.ά. Ακολούθως προστέθηκαν 400 ml H₂O (1:40 w/v) και θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 ημέρες και έπειτα το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε (10.000 g, 15 min, 2 °C). Το υπερκείμενο συμπυκνώθηκε σε rotary evaporator μέχρι τελικού όγκου 50 ml και στη συνέχεια διατηρήθηκε στους 4 °C για 24 h. Στο μείγμα προστέθηκε παγωμένη αιθανόλη σε αναλογία 1:1 και το μείγμα αναδεύτηκε για 30 min για την κατακρήμνιση των πολυσακχαριτών. Για την παραλαβή του διηθήματος πραγματοποιήθηκε επιπλέον φυγοκέντρηση (10.000 g, 15 min, 2 °C). Το διήθημα στη συνέχεια λυοφιλώθηκε και ακλούθησε προσδιορισμός των ολικών και α-γλουκανών με τη χρήση του “Mushroom and Yeast BetaGlucan assay kit” (Megazyme Int., Ireland) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης. Ο υπολογισμός των β-γλουκανών έγινε με την αφαίρεση των α-γλουκανών από τις ολικές γλουκάνες.

Πριν την διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης τα μανιτάρια καταψύχθηκαν στους -20°C, υπέστησαν λυοφιλίωση καθώς και κονιορτοποίηση. Κατόπιν την ημέρα της διεξαγωγής του πειράματος ζυγίστηκαν προσεκτικά σε ζυγό ακριβείας. Τα υποστρώματα που αξιολογήθηκαν βάσει της *in vitro* ζύμωσης καθώς και ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας αναφέρονται συντομογραφικά στο κάτωθι πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα *in vitro*

Συντομογραφία	Περιγραφή
Αρνητικός μάρτυρας C(-)	Βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα.
Θετικός μάρτυρας (INU 1%)	Control Inulin 1%, Βασικό μέσο καλλιέργειας με Ινουλίνη 1% που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.
WSE	<i>Pleurotus ostreatus</i> extract. Εκχύλισμα καρποφορίας <i>Pleurotus ostreatus</i> IK 1123 που καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου (κλασσικό υπόστρωμα).
BSE	<i>Ganoderma lucidum</i> extract. Εκχύλισμα καρποφορίας <i>Ganoderma lucidum</i> LGAM 9720 που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς (κλασσικό υπόστρωμα).
BSE-50	<i>Ganoderma lucidum</i> extract. Εκχύλισμα καρποφορίας <i>Ganoderma lucidum</i> που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς+ 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (εμπλουτισμένο υπόστρωμα)

3.2 Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων-Προετοιμασία εμβολίου

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε υπόστρωμα, καθώς συνολικά συμμετείχαν τρεις υγιείς ενήλικες εθελοντές (ηλικίας 25-43 ετών), οι οποίοι δεν είχαν ιστορικό γαστρεντερικών διαταραχών και δεν είχαν λάβει αντιβίωση τουλάχιστον δύο μήνες πριν την εισαγωγή τους στην μελέτη.

Αρχικά η πλήρης κένωση του εθελοντή μεταφέρεται στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.) σε μικρό χρονικό διάστημα (≤ 2 ώρες) εντός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας. Η πλήρης κένωση ζυγίζεται (καθαρό- μεικτό βάρος) σε εργαστηριακό ζυγό ακριβείας 0,1g και διαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffet Saline; NaCl 8 g/L, KCL 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L) pH 7,3, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα εμβόλιο κοπράνων συγκέντρωσης 20%w/v.

Ακολουθεί μηχανική ομογενοποίηση του εμβολίου σε κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA) και μέχρι να καταστεί ομοιογενές το εμβόλιο για περίπου 10-15 δευτερόλεπτα. Οι κινήσεις του παραπάνω οργάνου προσομοιάζουν εκείνες του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα και μέχρι να καταστεί ομοιογενές το εμβόλιο για περίπου 10-15 δευτερόλεπτα. Εν συνεχεία το εμβόλιο μοιράζεται σε ειδικά δοχεία *falcons*, τα οποία τοποθετούνται στον αναερόβιο θάλαμο.

3.3 *In vitro* ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Olano-Martin *et al.* (2000) και Rycroft *et al* (2001) με μικρές τροποποιήσεις.

Σε δοχεία Durham των 100ml προστίθενται 30ml από το βασικό μέσο καλλιέργειας (Basal Culture Medium, BCM) το οποίο ρυθμίζεται σε pH 7.0 με HCL 1.0M και αποστειρώνεται στους 121⁰ C για 15 λεπτά. Το BCM περιέχει (g/l): peptone water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 2.0; yeast extract (Merck KGaA), 2; NaCl, 0.10; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄ 0.04; MgSO₄·7H₂O, 0.01; CaCl₂·2H₂O, 0.01; NaHCO₃, 2.0; L-cysteine HCl (Merck KGaA), 0.50; αφυδατωμένη χολή (OxgallTM BD and Company, Sparks, MD, USA), 0.50; αιμίνη (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες NaOH 1.0M) (Fluka, Sigma-Aldrich, Netherlands), 0.05; Tween[®] 80 (Pancræar Quimica SA, Barcelona, Spain), 2ml/l; βιταμίνη K1(Fluka, Sigma-Aldrich, Switzerland), 10μl/l και διάλυμα ρεσαζουρίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0.025% (w/v), 4ml/l (Palframan *et al*, 2002). Με το πέρας της αποστείρωσης, τα δοχεία με το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρονται σε αναερόβιο θάλαμο (BACTRONTM 1.5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB, Cornelius, Oregon) με σκοπό να προαναχθεί για 12 ώρες.

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης στον αναερόβιο θάλαμο περιλαμβάνει την προσθήκη υπό αναερόβιες συνθήκες των στερεών δειγμάτων (εκχυλίσματα μανιταριών) στα δοχεία Durham σε αναλογία 1% w/v (0.30gr) ως μοναδικής πηγής άνθρακα. Επιπλέον, σε ένα δοχείο Durham προστίθεται στο βασικό μέσο καλλιέργειας ινουλίνη (Orafti[®] GR, BENEIO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% w/v, ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση, ενώ στο πείραμα περιλαμβάνεται και ένας αρνητικός μάρτυρας που είναι ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα.

Ακολουθεί ασηπτικός εμβολιασμός όλων των δοχείων Durham με 10% (v/v) με το εμβόλιο κοπράνων και κατόπιν ακολουθεί επώαση υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37⁰ C για 24h.

Στους χρόνους 0h και 24h λαμβάνονται δείγματα των στατικών καλλιεργειών προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι ακόλουθες αναλύσεις.

- Καταμέτρηση συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών με qPCR (real time PCR)

- Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFA) με αέρια χρωματογραφία GC
- Έλεγχος πιθανής κυτταροτοξικής δράσης σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου

3.3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

3.3.1.1 Απομόνωση ολικού μικροβιακού DNA από κόπρανα

Η διαδικασία της απομόνωσης του ολικού μικροβιακού DNA από τις στατικές καλλιέργειες στηρίζεται στη μέθοδο Repeated Bead Beating plus Column (Yu & Morrison, 2004) με κατάλληλες τροποποιήσεις (Salonen *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα η διαδικασία περιλαμβάνει: (α) τη ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών (μηχανική λύση, θερμική λύση) με στόχο την απελευθέρωση του DNA, (β) την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων (οξικό αμμώνιο 10M, ισοπροπανόλη), (γ) την απομάκρυνση του RNA, των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό του δείγματος (επώαση με RNA-άση και πρωτεϊνάση K, χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA (*QIAmp DNA mini kit*, Qiagen, Hilden, Germany).) και (δ) την έκλυση του DNA και τη φωτομέτρηση του. Η φωτομέτρηση για τη ποσοτικοποίηση του μικροβιακού DNA πραγματοποιείται στο μηχάνημα IMPLEN P330 με το πρόγραμμα dsDNA (double-stranded DNA).

3.3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

Η μέθοδος **real-time PCR** (*quantitative PCR*, *qPCR*) χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο πείραμα για την ποσοτικοποίηση μελών του εντερικού μικροβιόκοσμου στα δείγματα από τις στατικές καλλιέργειες, προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις. Η μέθοδος PCR είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, οικονομική και ταχύτερη από οποιαδήποτε άλλη μέθοδο ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων. Με την χρήση της PCR καθώς και κατάλληλων εκκινητών (primers) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός ($\log_{10}$ copies/ml) στο DNA των ολικών βακτηρίων, του γένους *Bifidobacterium*, του *Lactobacillus* group (*Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*), των θειοαναγωγικών κλοστριδίων (*Clostridium perfringens* group) καθώς και του γένους *Bacteroides*. Χρησιμοποιούνται κατάλληλα εκκινητικά μόρια, τα οποία στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA εξειδικευμένες για τον κάθε μικροοργανισμό που θα καταμετρηθεί. Οι συνθήκες PCR καθώς και οι αλληλουχίες της 16S rRNA περιοχής για το κάθε μόριο εκκινητή περιγράφονται στον επόμενο Πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης.

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Αντίγραφα 16S γονιδίου/γονιδίωμα	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT	60°C για 20 sec	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	6	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus</i> group	Forward Reverse	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58°C για 20 sec	341	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	6	Pintilla <i>et al.</i> , 2004
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward Reverse	TGCGGTC(C/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	58°C για 20 sec	243	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM20456	3	Pintilla <i>et al.</i> , 2004
<i>Clostridium perfringens</i> group	CPF CPR	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAAATCTCCCTTT	55°C για 20 sec	120	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	8	Pintilla <i>et al.</i> , 2004 Phong <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacteroides</i> spp.	Bac303F Bfr-Fmrev	GAAGTCCCCACATTG CGCKACTTGCTGGTTCAG	60°C για 20 sec	103	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	6	Bartosch <i>et al.</i> , 2004 Liu <i>et al.</i> , 2003

Είναι μία μέθοδος που βασίζεται στην τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής ουσίας *SYBR Green* που περιλαμβάνεται στα γυάλινα τριχοειδή. Με αυτόν τον τρόπο, μετρώντας την ένταση του φθορισμού της ουσίας μπορεί να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών του κάθε δείγματος.

Η πειραματική διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:

- Εισαγωγή δεδομένων στο όργανο LightCycler[®] 2.0 (*Roche Diagnostics GmbH, Germany*) (συνθήκες qPCR, κωδικοί δειγμάτων)
- Δημιουργία του μίγματος αντιδραστηρίων (Master Mix), με προσθήκη υπο ανάδευση όλων των απαραίτητων αντιδραστηρίων στις κατάλληλες ποσότητες. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω: PCR grade H₂O, KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems) (περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green) , F-primer, R-primer, και αλβουμίνη (BSA: Bovine serum Albumin).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών ανά αντίδραση qPCR

<i>PCR grade H₂O</i>	<i>KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit</i>	<i>F-primer</i>	<i>R-primer</i>	<i>BSA-albumin</i>
3,95μL	10μL	0,4μL	0,4μL	0,25μL

- Το μείγμα των αντιδραστηρίων (master mix) προστίθεται στα ειδικά γυάλινα τριχοειδή (capillaries) σε αναλογία 15μL Master Mix και 5μL από το μικροβιακό DNA σε κατάλληλη αραιώση.
- Τα τριχοειδή προστίθενται στο carousel του οργάνου LightCycler® 2.0 και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το πέρας του σχηματισμού των καμπυλών.

Η διαδικασία περιλαμβάνει ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση), ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι), ανάλυση melting curves και ψύξη του οργάνου (cooling). Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών για κάθε δείγμα υπολογίζεται βάσει της τιμής του Ct (threshold circle), η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων της qPCR, όπου ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης. Έτσι όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για την ανίχνευση δεδομένου επιπέδου φθορισμού, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του DNA- στόχου στο αρχικό δείγμα. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων, χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες αναφοράς στις οποίες δίνεται η γραμμική συσχέτιση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων του γονιδίου του 16S rRNA στον πρότυπο μικροοργανισμό και των αντίστοιχων τιμών Ct. Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων των καμπυλών αναφοράς πραγματοποιείται με τη χρήση του λογισμικού LCSA 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH). Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως “δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S γονιδίου/ml δείγματος” ($\log_{10}$ copies/ ml δείγματος).

3.3.3 Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη

Η ύπαρξη πιθανής πρεβιοτικής δράσης των υποστρωμάτων που μελετούνται, αξιολογείται ποιοτικά βάσει του πρεβιοτικού δείκτη (*Prebiotic Index, PI*). Ο δείκτης αυτός αποτελεί ένα εργαλείο σύγκρισης της πρεβιοτικής δράσης (*Olano-Martin et al., 2002*) και υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση (*Palframan et al., 2003*)

$$PI = (Bif/Total) - (Bac/Total) + (Lac/Total) - (Clos/Total)$$

όπου: **Bif**= η καταμέτρηση *Bifidobacterium* spp., στον χρόνο δειγματοληψίας (24h/ καταμέτρηση *Bifidobacterium* spp. στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Bac**= η καταμέτρηση του *Bacteroides* spp. στο χρόνο δειγματοληψίας (24h)/καταμέτρηση του *Bacteroides* spp. στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Lac**= η καταμέτρηση του *Lactobacillus* group στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση του *Lactobacillus* group στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Clos**= η καταμέτρηση του *Clostridium perfringens* group στο χρόνο δειγματοληψίας (24h/

καταμέτρηση του *Clostridium perfringens* group στο αρχικό εμβόλιο (0h) και **Total**= η καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στο αρχικό εμβόλιο (0h).

Η αύξηση των πληθυσμών *Bifidobacterium* spp. και/ ή του *Lactobacillus* group αξιολογείται ως θετική επίδραση ενώ η αύξηση των *Bacteroides* και των κλωστριδίων ως αρνητική επίδραση.

3.4 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίζεται στη σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στα εξεταζόμενα δείγματα και συγκεκριμένα στις μέσες τιμές των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S γονιδίου/ml δείγματος (copies/ml δείγματος). Πραγματοποιείται έλεγχος κανονικότητας με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov ενώ η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων για τις χρονικές στιγμές 0h και 24h πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated-Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity). Επιπλέον, η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών εντός του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο t για εξαρτημένα δείγματα (paired-samples T test). Για τους πρεβιοτικούς δείκτες δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p < 0,05$) και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 21.

3.5 Κυτταροτοξικότητα

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιείται για την ανίχνευση πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης των εκχυλισμάτων των βασιδιομυκήτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Η δοκιμή της κυτταροτοξικότητας γίνεται σε καρκινικά κύτταρα (αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου) από ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο. Τα κύτταρα, που ανήκουν στην σειρά Caco-2 (ATCC: HTB-37), επωάζονται για 24 ώρες στο υπερκείμενο της στατικής *in vitro* καλλιέργειας σε συγκέντρωση 10%. Τέλος, με την καταμέτρηση των ζωντανών έναντι των νεκρών κυττάρων, δίνεται η πληροφορία που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό πιθανής κυτταροτοξικότητας.

3.5.1 Λυοφιλίωση υπερκειμένων της ζύμωσης *in vitro*

Μετά τη παραλαβή τους τα δείγματα (υπερκείμενο στατικής καλλιέργειας) αποθηκεύονται στους -80°C και στη συνέχεια υπόκεινται σε λυοφιλίωση. Η διαδικασία είναι η παρακάτω:

- Τα υπερκείμενα ξεπαγώνουν από τους -80°C όπου και είχαν αποθηκευτεί και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3220 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο με τη χρήση ειδικής σύριγγας και ακολουθεί διήθηση υγρού μέσω βακτηριολογικού ηθμού (*Cornign 431229 Syringe Filter με διάμετρο 28mm και διάμετρο πόρων 0,2 μm*)
- Λήψη 2,1 mL από το διήθημα και μεταφορά σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια λυοφιλίωσης.
- Κατάψυξη στους -80°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
- Λυοφιλίωση (*Heto LyoLab 3000*) για 24 ώρες.
- Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τα αποξηραμένα δείγματα κλείνονται αεροστεγώς και τοποθετούνται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθούν

3.5.2 Καλλιέργεια ανθρώπινων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης ανήκουν στη σειρά Caco-2 (*ATCC: HTB- 37*) από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και χρησιμοποιούνται σε πειράματα *in vitro* καθώς ομοιάζουν στη συμπεριφορά με τα ανθρώπινα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται σε ειδικά δοχεία καλλιέργειας στην επιφάνεια των οποίων προσκολλώνται και σχηματίζουν στοιβάδα. Εφόσον η επιφάνεια του δοχείου καλυφθεί στο 100% με τη πάροδο του χρόνου, τα κύτταρα διαφοροποιούνται και εμφανίζουν χαρακτηριστικά ανθρώπινων εντεροκυττάρων.

3.5.3 Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

FBS- Fetal Bovine Serum (*Gibco®, REF 10270-106*)

Βόειος εμβρυϊκός ορός που χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη των κυττάρων καθώς τους παρέχει πλήθος θρεπτικών συστατικών όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ορμόνες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες, ιχνοστοιχεία και μέταλλα.

DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (*Biosera, DMEM High Glucose w/o L-Glutamine, w/Sodium Pyruvate, Filter Sterile (LM-D1112/500)*).

Το DMEM χρησιμοποιείται στη πειραματική διαδικασία της καλλιέργειας των κυττάρων ως θρεπτικό υλικό. Το κύριο συστατικό του είναι τα αμινοξέα ενώ περιλαμβάνει επίσης βιταμίνες, άλατα, γλυκόζη και πυροσταφυλικό νάτριο. Πριν τη χρήση του πραγματοποιείται αναθέρμανση έτσι ώστε η θερμοκρασία του από 5° C (*θερμοκρασία συντήρησης*) να φτάσει τους 37° C (*θερμοκρασία των κυττάρων του σώματος*).

Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη (*Gibco*)

Αυτά τα δύο συστατικά χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά στις κυτταροκαλλιέργειες με σκοπό την προφύλαξη από βακτηριακή επιμόλυνση. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στο θρεπτικό υλικό είναι 100U/mL πενικιλίνη και 100μg/mL στρεπτομυκίνη. Τα δύο αντιβιοτικά συντηρούνται στην κατάψυξη στους -20° C σε πυκνό διάλυμα (100x συγκέντρωση).

Γλουταμίνη (*Biosera, 100x, Cat. n° : 25030-81*)

Η L-γλουταμίνη είναι ένα ασταθές θρεπτικό συστατικό (αμινοξύ) που απαιτείται στις κυτταροκαλλιέργειες. Υποστηρίζει την ανάπτυξη των κυττάρων που έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Συνήθως προστίθεται κατά την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού.

Θρυψίνη (*EDTA*)

Η θρυψίνη χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες για την αποκόλληση των κυττάρων από τα δοχεία καλλιέργειας τους. Έχει ενζυμική δράση ενώ η προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε ποσότητα διπλάσια της θρυψίνης σταματάει τη δράση αυτή. Ακόμη κατά τη χρήση πρέπει να τηρούνται συγκεκριμένα χρονικά όρια (5-9min) καθώς παρατεταμένος χρόνος δράσης μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των κυττάρων. Τέλος για τη σωστή χρήση της θρυψίνης και εφόσον βρίσκεται σε συμπυκνωμένη μορφή, πραγματοποιείται αραιώση της σε διάλυμα PBS 1/10.

PBS (*Gilbo, REF 18912-014*)

Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS χρησιμοποιείται ως μέσο για ξέπλυμα ή αναδιάλυση των κυττάρων έτσι ώστε να αποφεύγεται το οσμωτικό σοκ καθώς είναι ισοτονικό διάλυμα.

Πλήρες Θρεπτικό Υλικό

Για τη προετοιμασία του πλήρους θρεπτικού υλικού απαιτούνται τα παρακάτω συστατικά :
(100mL)

- 10mL Fetal Bovine Serum (*FBS*)
- 1mL μη απαραίτητα αμινοξέα
- 1mL Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη
- 1mL L-γλουταμίνη
- 87mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (*DMEM*)

3.5.4 Αναβίωση κυττάρων από το υγρό άζωτο:

Αρχικά τα κύτταρα Caco-2 που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση του πειράματος χρειάζονται αναβίωση από το υγρό άζωτο στο οποίο βρίσκονται. Τα βήματα αυτής της διαδικασίας είναι τα παρακάτω:

- Προετοιμασία του πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM
- Τα καρκινικά κύτταρα Caco-2 παραλαμβάνονται από το ειδικό φιαλίδιο υγρού αζώτου από όπου βρίσκονται και ξεπαγώνουν σε υδατόλουτρο των 37° C.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon των 15mL με θρεπτικό υλικό (αναλογία 1:10)
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί το DMSO (έχει δράση κρυοπροστατευτικού υλικού) το οποίο εάν παραμείνει στα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου έχει τοξικές ιδιότητες
- Τα κύτταρα μετά τη φυγοκέντρηση παραμένουν ως ίζημα στο κάτω μέρος του falcon και το υπερκείμενο απομακρύνεται μέσω αναρρόφησης με αντλία
- Προστίθεται 1-2mL πλήρες θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από τον κάτω μέρος του falcon (επαναδιάλυση ιζήματος)
- Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο καλλιέργειας κυττάρων (*φλάσκα 75cm², Greiner bio-one, Cellstar® Tissue Culture Flasks, Cat n° 658-180*) στο οποίο έχουν προστεθεί 10mL πλήρους θρεπτικού υλικού και κατόπιν πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με τα κύτταρα.
- Το δοχείο καλλιέργειας μεταφέρεται σε ειδικό θάλαμο επώασης που βρίσκεται σε θερμοκρασία 37° C και έχει συγκέντρωση CO₂ 5% (*MMM Group, Model No. 170-200/219MP, Serial No. 16863*)

3.5.5 Πολλαπλασιασμός κυττάρων και διαίρεση της κυτταροκαλλιέργειας

Στον ειδικό επωαστικό θάλαμο τα κύτταρα όντας σε θερμοκρασία σώματος πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν μονή στοιβάδα η οποία βρίσκεται προσκολλημένη στην επιφάνεια της φλάσκας. Εφόσον ο πολλαπλασιασμός φτάσει στο 70%-90% της πληρότητας της επιφάνειας του δοχείου και υπάρξει κορεσμός, πραγματοποιείται διαίρεση των κυττάρων σε δύο νέες φλάσκες έτσι ώστε να συνεχιστεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο, υπάρχει χώρος για την ανάπτυξη των κυττάρων. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (*Leica interphase*) ενώ απαραίτητη είναι και η αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε δεύτερη μέρα. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια:

- Προετοιμασία νέου πλήρους θρεπτικού υλικού
- Απομάκρυνση με αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού που βρίσκεται στη φλάσκα χωρίς την αποκόλληση των κυττάρων
- Προσθήκη διαλύματος PBS (*GILBO, REF 18912-014*) με σκοπό το ξέπλυμα των κυττάρων που βρίσκονται προσκολλημένα στο δοχείο
- Προσθήκη 2-3mL διαλύματος θρυψίνης (*BIOSERA, LM-T1706/100*)
- Επώαση του δοχείου 5-10 λεπτά στους 37⁰ C και συγκέντρωση CO₂ 5% και αναμονή για αποκόλληση των κυττάρων
- Προσθήκη 6-8mL πλήρους θρεπτικού υλικού έτσι ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά εναιωρήματος σε falcon
- Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στα 125g
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- Προσθήκη εκ νέου 2mL πλήρους θρεπτικού υλικού και ήπια ανάδευση για επαναδιάλυση του ιζήματος
- Καταμέτρηση των κυττάρων σε αιματοκυττόμετρο και δημιουργία κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε μετά τον εμβολιασμό σε νέες φλάσκες τα κύτταρα να έχουν συγκέντρωση της τάξης του 1x10⁴ κύτταρα/cm²
- Μεταφορά για επώαση σε θάλαμο με συνθήκες θερμοκρασίας 37⁰ C και συγκέντρωση CO₂ 5%.

3.5.6 Καλλιέργεια κυττάρων σε βοθρία

Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος και τη μελέτη της συμπεριφοράς των κυττάρων στα προϊόντα ζυμώσεως των μανιταριών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, τα κύτταρα μεταφέρονται από τη φλάσκα σε μικρότερα βοθρία καλλιέργειας (6 βοθρία σε κάθε πλακίδιο επιφάνειας $9,15\text{cm}^2$ το καθένα). Σε κάθε βοθρίο μεταφέρονται 2mL εναιωρήματος κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό των οποίων η συγκέντρωση ρυθμίστηκε έτσι ώστε να είναι της τάξης του 1×10^4 κύτταρα/ cm^2 . Τα κύτταρα επώάζονται σε θάλαμο στους 37°C με συγκέντρωση CO_2 5% και όταν καλύψουν το 100% της επιφάνειας συνεχίζεται η καλλιέργεια τους για επιπλέον δύο εβδομάδες. Αυτό συμβαίνει καθώς οι δύο εβδομάδες θεωρούνται αρκετός χρόνος για την διαφοροποίηση των κυττάρων πριν χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας.

3.5.7 Επίδραση υπερκειμένων στις κυτταροκαλλιέργειες

Γίνεται ανασύσταση- διάλυση λυοφιλωμένου υπερκειμένου της στατικής καλλιέργειας:

- Σε κάθε φιαλίδιο στο οποίο λυοφιλώθηκε συγκεκριμένος όγκος από κάθε προϊόν ζύμωσης των βασιδιομυκήτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, προστέθηκε αντίστοιχος όγκος διαλύματος DMEM
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται απαλή ανάδευση έως ότου η λυοφιλωποιημένη μάζα διαλυθεί πλήρως στο υγρό DMEM.

Το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με αναρρόφηση από τα ειδικά βοθρία και προστίθενται:

- 0,2mL από το ανασυσταθέν σε DMEM λυοφιλωμένο προϊόν της ζύμωσης
 - 1,8mL πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM
 - 0,02 mL FBS
 - 0,002mL πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη
 - 0,002mL αμινοξέα
- Τα βοθρία μεταφέρονται σε ειδικό θάλαμο με θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO_2 5% για επώαση για 24 ώρες.

3.5.8 Προσδιορισμός Κυτταροτοξικότητας

Μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων με τα προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών από την εντερική μικροχλωρίδα, τα κύτταρα συλλέγονται με σκοπό την καταμέτρηση τους σε νεκρά και ζωντανά. Η διαδικασία του προσδιορισμού είναι η ακόλουθη:

- Αρχικά απομακρύνεται το υπερκείμενο από τα βοθρία με αναρρόφηση
- Προστίθενται εν συνεχεία 2mL PBS σε κάθε βοθρίο για ξέπλυμα
- Το PBS που χρησιμοποιήθηκε μεταφέρεται σε falcon
- Προστίθεται 1mL διάλυμα θρυψίνης στο κάθε βοθρίο
- Πραγματοποιείται επώαση για 7 λεπτά στους 37⁰ C και συγκέντρωση CO₂ 5%
- Προστίθενται τουλάχιστον 2mL πλήρους θρεπτικού υλικού και πραγματοποιείται ανάδευση σε κάθε βοθρίο με τη χρήση αυτόματης πιπέτας
- Τα αποκολλημένα κύτταρα με το θρεπτικό υλικό μεταφέρονται σε αντίστοιχο falcon για το κάθε βοθρίο
- Τα βοθρία ξεπλένονται ακόμη με 1mL PBS και το υγρό μεταφέρεται επίσης στο αντίστοιχο falcon
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 1500 rpm σε θερμοκρασία 25⁰ C
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο με αναρρόφηση
- Το ίζημα που υπάρχει σε κάθε falcon αναδιαλύεται εκ νέου σε 2mL πλήρες θρεπτικό υλικό
- Μεταφέρονται 80μL από το διάλυμα σε σωληνάριο τύπου erppendorf των 1,5mL και προστίθενται και 80μL χρωστική μπλε τρυπάνης
- Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και μεταφέρεται μία μικρή ποσότητα σε αιματοκυττόμετρο με σκοπό την καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε μικροσκόπιο (παρατήρησε σε 40x).

3.5.9 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την μελέτη της επίδρασης των προϊόντων των ζυμώσεων των λυοφιλιωμένων μανιταριών από βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα του Υπολογιστικού Φύλλου Microsoft Excel 2010 καθώς και το στατιστικό πρόγραμμα SIGMA STAV V3.5.

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

4.Αποτελέσματα

4.1 Ζύμωση (*in vitro*) των εκχυλισμάτων καρποφοριών των στελεχών *Pleurotus ostreatus* IK1123 και *Ganoderma lucidum* LGAM9720 από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.

Στον ΠΙΝΑΚΑ 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοριακού ποσοτικού προσδιορισμού για την διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης σε εκχυλίσματα (άπεπτοι πολυσακχαρίτες) των καρποφοριών των στελεχών *Pleurotus ostreatus* IK1123 και *Ganoderma lucidum* LGAM9720. Για την καλλιέργεια του *Pleurotus ostreatus* χρησιμοποιήθηκε κλασικό υπόστρωμα (άχυρο σίτου) ενώ για το *Ganoderma lucidum* δύο υποστρώματα, ένα κλασικό και ένα εμπλουτισμένο με απόβλητα από ελαιοτριβεία (πριονίδι οξιάς, πριονίδι οξιάς με απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου). Στον ΠΙΝΑΚΑ 3 παρατίθενται επιπλέον και τα αποτελέσματα του θετικού (ινουλίνη, 1%w/v) και του αρνητικού μάρτυρα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Ποσοτικός προσδιορισμός (log₁₀copies/ml) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου

<i>Αρχή ζύμωσης t=0h</i>						<i>24h-ζύμωση (t=24h)</i>					
	<i>C (-)</i>	<i>INU1</i>	<i>WSE</i>	<i>BSE</i>	<i>BSE-50</i>	<i>C (-)</i>	<i>INU1</i>	<i>WSE</i>	<i>BSE</i>	<i>BSE-50</i>	<i>P overall</i>
<i>Ολικά βακτήρια</i>	9.64±0.02	9.68±0.13	10.35±0.11*†	10.25±0.07*†	10.20±0.13*†	9.29±0.36†	9.93±0.17 _a	10.04±0.02*	9.78±0.13 _a *	9.82±0.16 _a *	0.000
<i>Lactobacillus group</i>	6.63±1.90	6.70±1.76	7.79±2.31	7.26±1.85	7.19±1.78	6.47±2.05	6.39±2.13	6.96±2.60	6.55±2.24	6.61±2.19	1.000
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8.23±0.20	8.26±0.22	8.71±0.19*	8.79±0.28*†	8.68±0.30*†	8.02±0.27 _a †	9.48±0.30 _a *	8.44±0.04†	8.92±0.32 _a *†	9.00±0.26 _a *†	0.002
<i>Bacteroides spp.</i>	8.53±0.22	8.54±0.26	9.40±0.24*†	9.25±0.13*†	9.20±0.18*†	8.28±0.13†	9.01±0.35*	9.55±0.28*†	8.93±0.20*	9.03±0.22*	0.000
<i>Clostridium perfringens group</i>	6.22±0.45	6.28±0.50	6.75±0.65	6.95±0.56	6.91±0.63	6.06±0.50	6.47±0.44	7.08±0.67 _a *	6.61±0.30	6.76±0.29	0.244

*:στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα [C(-)] τη δεδομένη χρονική στιγμή (Repeated-Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity)

† στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (INU1) τη δεδομένη χρονική στιγμή (Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity)

a:στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0h) (paired samples t-test)

Αναλυτικά, βάσει των δεδομένων του ΠΙΝΑΚΑ 4, διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων και κυρίως ως προς τα επίπεδα ολικών βακτηρίων, *Bacteroides* spp. και *Bifidobacterium* spp.

Αρχικά στον χρόνο 0 ($t=0$) της ζύμωσης, διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των εμβολίων, δεδομένου ότι τα WSE, BSE και BSE-50 χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερα επίπεδα ολικών βακτηρίων και *Bacteroides* spp. συγκριτικά με τον αρνητικό αλλά και θετικό μάρτυρα. Επιπλέον σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στα εμβόλια WSE, BSE και BSE-50 και ως προς το *Bifidobacterium* spp., το οποίο επέδειξε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ενώ τα BSE και BSE-50 χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερα επίπεδα *Bifidobacterium* spp. και ως προς τον θετικό μάρτυρα.

Μετά την ζύμωση των 24 ωρών ($t=24$) διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα ολικών βακτηρίων στα εμβόλια WSE, BSE και BSE-50 σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Στα εμβόλια BSE και BSE-50 τα τελικά επίπεδα ολικών βακτηρίων ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με την αρχή της ζύμωσης (χρόνος 0). Στο ποσοτικό προσδιορισμό του *Lactobacillus* group δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

Στα επίπεδα του *Bifidobacterium* spp. παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στα εμβόλια BSE και BSE-50 με υψηλότερα επίπεδα ως προς τον αρνητικό μάρτυρα αλλά χαμηλότερα επίπεδα ως προς τον θετικό μάρτυρα. Επιπλέον στα εμβόλια BSE και BSE-50 διαπιστώθηκαν διαφοροποιήσεις στα τελικά επίπεδα του *Bifidobacterium* spp. ($t=24h$) τα οποία ήταν υψηλότερα συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης ($t=0h$). Στην ινουλίνη διαπιστώθηκαν σημαντικά υψηλότερα *Bifidobacterium* spp. σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.000$) μετά την 24ωρη ζύμωση ενώ υπήρξε σημαντική αύξηση και σε σχέση με την ινουλίνη στον χρόνο 0 ($p=0.021$).

Ως προς τα επίπεδα του *Bacteroides* spp. τόσο η ινουλίνη όσο και τα υπόλοιπα εκχυλίσματα WSE, BSE και BSE-50 παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα *Bacteroides* spp. σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ενώ μόνο το WSE παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

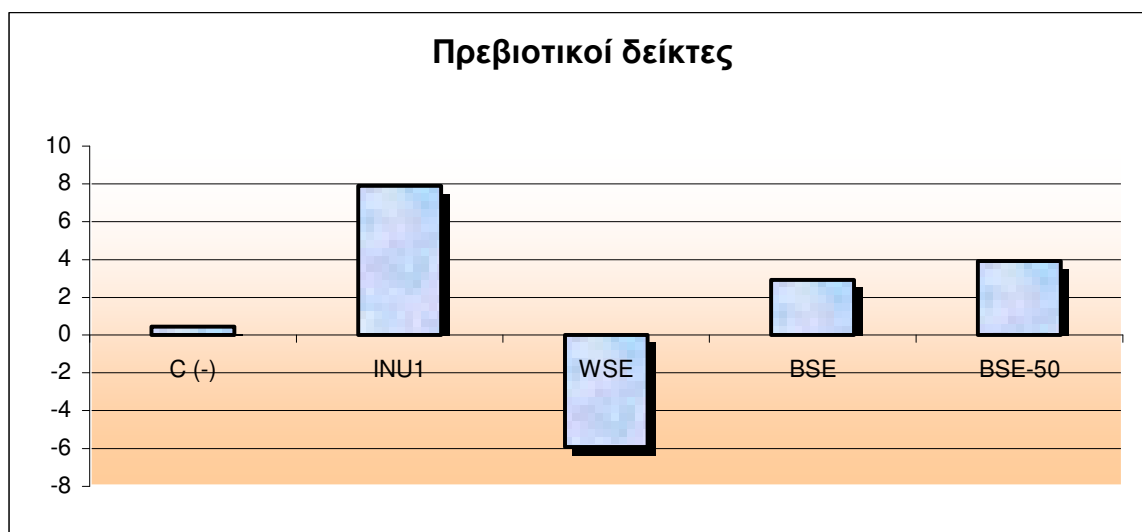
Τέλος, ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό του *Clostridium perfringens* μόνο το εκχύλισμα WSE παρουσιάζει διαφοροποιήσεις με υψηλότερα επίπεδα ως προς τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.000$) μετά την 24ωρη ζύμωση καθώς και ως προς τα αρχικά επίπεδα των κλωστριδίων στο συγκεκριμένο δείγμα στο χρόνο 0 ($p=0.034$).

4.2 Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο πρεβιοτικός δείκτης (*Prebiotic Index, PI*) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον ποιοτικό προσδιορισμό της πιθανής πρεβιοτικής δράσης των υποστρωμάτων μετά από την 24ωρη ζύμωση (Olano-Martin *et al.* 2002). Υπολογίζεται με την ακόλουθη εξίσωση (Palframan *et al.*, 2003):

$$PI = (Bif/Total) - (Bac/Total) + (Lac/Total) - (Clos/Total)$$

όπου: **Bif**= η καταμέτρηση *Bifidobacterium* spp., στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση *Bifidobacterium* spp. στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Bac**= η καταμέτρηση του *Bacteroides* spp. στο χρόνο δειγματοληψίας (24h)/καταμέτρηση του *Bacteroides* spp. στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Lac**= η καταμέτρηση του *Lactobacillus* group στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση του *Lactobacillus* group στο αρχικό εμβόλιο (0h), **Clos**= η καταμέτρηση του *Clostridium perfringens* group στο χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση του *Clostridium perfringens* group στο αρχικό εμβόλιο (0h) και **Total**= η καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)/ καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στο αρχικό εμβόλιο (0h). Η αύξηση των πληθυσμών *Bifidobacterium* spp. και/ ή του *Lactobacillus* group αξιολογείται ως θετική επίδραση ενώ ή αύξηση των *Bacteroides* και των *Clostridium* ως αρνητική επίδραση. Η συγκεκριμένη έκφραση της εξίσωσης του πρεβιοτικού δείκτη έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει να κανονικοποιηθούν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών σε σχέση με τα αρχικά τους επίπεδα, εξομαλύνοντας έτσι τη φυσιολογική μεταβλητότητα που χαρακτηρίζει τη πειραματική διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης (Palframan *et al.*, 2003). Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό στη περίπτωση των πειραματικών μας διαδικασιών, δεδομένων των διαφοροποιήσεων που παρατηρήθηκαν στους πληθυσμούς των αρχικών εμβολίων.



Διάγραμμα 1: Πρεβιοτικοί δείκτες των WSE, BSE, BSE-50, INU1, C(-)

Ο μεγαλύτερος πρεβιοτικός δείκτης συνολικά παρατηρήθηκε στην περίπτωση της ινουλίνης, χαρακτηριστικό της καλά τεκμηριωμένης πρεβιοτικής δράσης του συγκεκριμένου πολυσακχαρίτη. Ως προς τα εκχύλισμα, στις περιπτώσεις των BSE-50 και BSE διαπιστώθηκαν θετικοί πρεβιοτικοί δείκτες κατά φθίνουσα σειρά, ενώ στο εκχύλισμα WSE ο πρεβιοτικός δείκτης ήταν αρνητικός. Η ζύμωση των BSE-50 και BSE οδήγησε σε παρόμοια συμπεριφορά ως προς τις αλλαγές των επιπέδων μικροοργανισμών με μείωση των ολικών βακτηρίων, αύξηση των επιπέδων μπιφιδοβακτηρίων και περιορισμό των επιπέδων λακτοβακίλλων, *Bacteroides* spp. και *Clostridium perfringens*.

4.3 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Caco-2) μετά από επώαση με τα υπερκείμενα της ζύμωσης των εκχύλισμάτων των καρποφοριών των στελεχών *Pleurotus ostreatus* IK1123 και *Ganoderma lucidum* LGAM9720 από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε, σε σκοπό να μελετηθεί η βιωσιμότητα επιθηλιακών κυττάρων του παχέως εντέρου μετά από επώαση τους στα υπερκείμενα της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών. Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίστηκε με το ποσοστό βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων. Τα κύτταρα είχαν παραμείνει για 24 ώρες σε καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε 10% από το υπερκείμενο της ζύμωσης του κάθε χειρισμού των βασιδιομυκήτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε χρόνους 0 και 24 ώρες μετά τη ζύμωση. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από την καρποφορία δύο στελεχών βασιδιομυκήτων, του *Pleurotus ostreatus* και του *Ganoderma lucidum*. Αναλυτικά μελετήθηκαν οι εξής χειρισμοί:

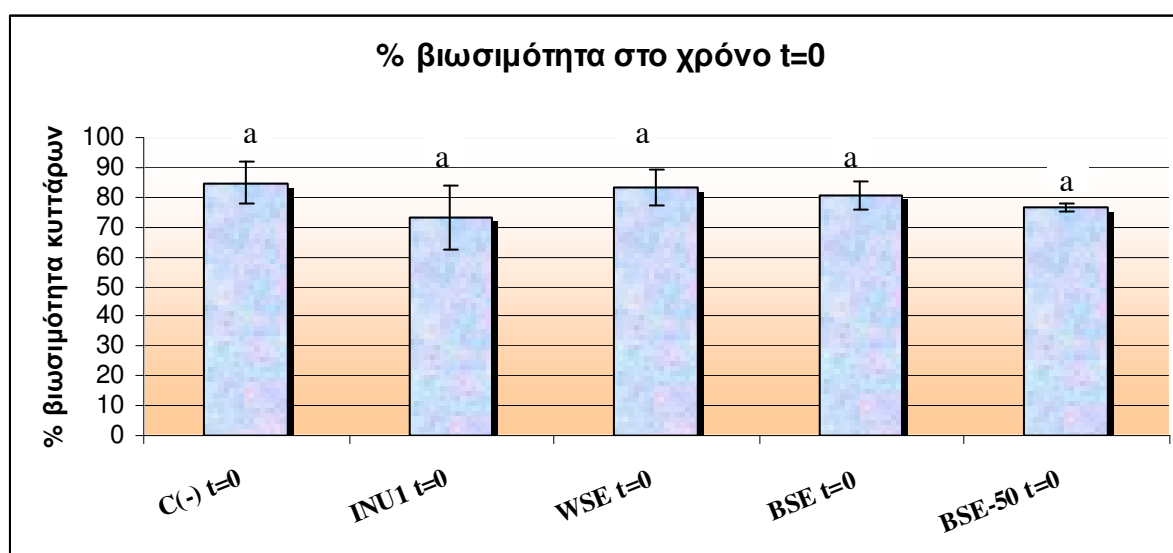
- **WSE t=0 και WSE t=24:** Εκχύλισμα από την καρποφορία *Pleurotus ostreatus* IK1123 που καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου (κλασσικό υπόστρωμα), ζυμώθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο δύο υγιών εθελοντών (n=2) και η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε σε χρόνο t=0 και t=24h.
- **BSE t=0 και BSE t=24:** Εκχύλισμα από την καρποφορία *Ganoderma lucidum* LGAM9720 που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς (κλασσικό υπόστρωμα), ζυμώθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών (n=3) εθελοντών και η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε σε χρόνο t=0 και t=24h.
- **BSE-50 t=0 και BSE-50 t=24:** Εκχύλισμα από την καρποφορία *Ganoderma lucidum* LGAM9720, που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς με διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου, ζυμώθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών εθελοντών (n=3) και η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε σε χρόνο t=0 και t=24h.
- **INU1 t=0 και t=24:** Καθαρή ινουλίνη σε συγκέντρωση 1% η οποία ζυμώθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών εθελοντών (n=3) και η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε σε χρόνο t=0 και t=24h.
- **Control (-) t=0 και t=24:** Καμία προσθήκη υλικού στη διαδικασία της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών εθελοντών (n=3) και έλεγχος της κυτταροτοξικότητας σε χρόνο t=0 και t=24h.

- **Control:** Αφορά κάποια συγκεκριμένα βοθρία στα οποία δεν έγινε καμία παρέμβαση με υλικά ζύμωσης, προστέθηκε μόνο το θρεπτικό υλικό και για τον λόγο αυτό δεν συμμετέχει στη στατιστική ανάλυση. Σκοπός της χρήσης του τρίτου μάρτυρα είναι ο έλεγχος της διαδικασίας των χειρισμών, στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Παρακάτω παρατίθενται τα εξής διαγράμματα: δύο διαγράμματα που περιλαμβάνουν και τους πέντε χειρισμούς στο χρόνο $t=0$ (δηλαδή στην έναρξη της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο), και στον χρόνο $t=24$.

4.3.1 Επίδραση του υπερκειμένου από τη ζύμωση των εκχυλισμάτων των καρποσωματίων των βασιδιομυκήτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2.

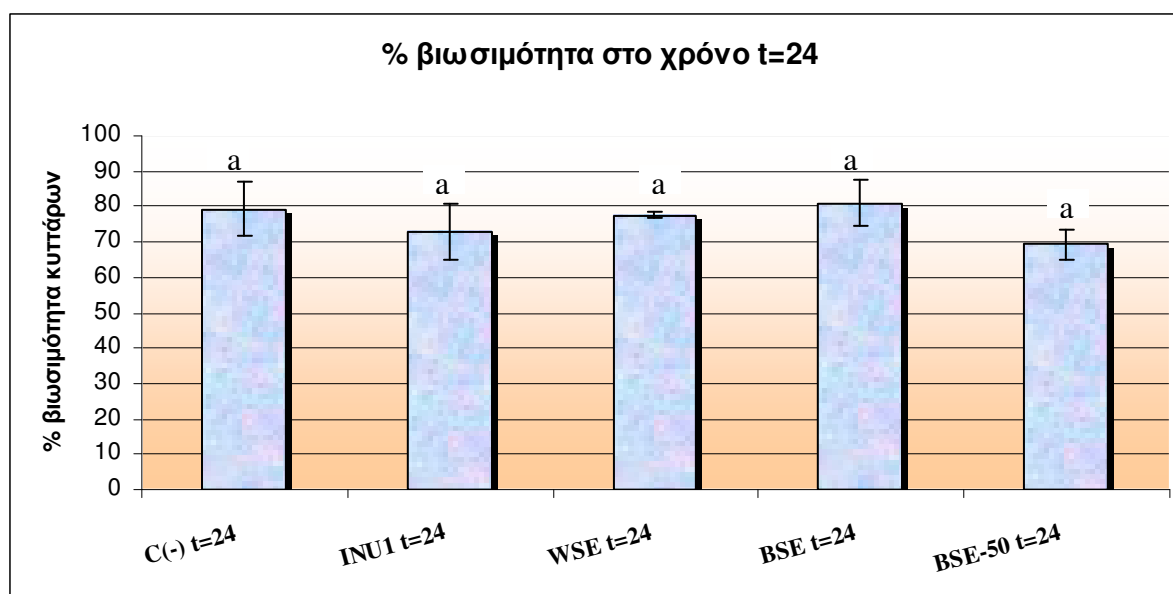
Στο διάγραμμα 4.3.1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της επί της εκατό (%) βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων για το εκχύλισμα της καρποφορίας *Pleurotus ostreatus* στο κλασσικό υπόστρωμα (άχυρο σίτου- WSE), το εκχύλισμα της καρποφορίας του *Ganoderma lucidum* τόσο σε κλασσικό υπόστρωμα (πριονίδι οξιάς- BSE) όσο και σε διφασικό υπόστρωμα (πριονίδι οξιάς με διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου BSE-50) καθώς και οι δύο μάρτυρες (θετικός και αρνητικός) στο χρόνο $t=0$, δηλαδή κατά την έναρξη της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβίοκοσμο υγιών εθελοντών.



Διάγραμμα 4.3.1: % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχτηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβίοκοσμου με τα υποστρώματα Control (-), INU1, WSE, BSE, BSE-50 σε χρόνο $t=0$. Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών ($n=3$). Για την μέση τιμή του WSE ($n=2$).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές (ANOVA, $p<0,05$).

Στο διάγραμμα 4.3.2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της % βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων για το εκχύλισμα της καρποφορίας του *Pleurotus ostreatus* στο κλασσικό υπόστρωμα (άχυρο σίτου- WSE), το εκχύλισμα της καρποφορίας του *Ganoderma lucidum* τόσο σε κλασσικό υπόστρωμα (πριονίδι οξιιάς- BSE) όσο και σε διφασικό υπόστρωμα (πριονίδι οξιιάς με διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου- BSE-50) καθώς και οι δύο μάρτυρες (θετικός και αρνητικός) στο χρόνο t=24, δηλαδή μετά το πέρας 24 ωρών ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.



Διάγραμμα 4.3.2: % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων που δέχτηκαν υπερκείμενα ζύμωσης εντερικού μικροβιόκοσμου με τα υποστρώματα Control (-), INU1, WSE, BSE, BSE-50 σε χρόνο t=24. Οι κάθετες μπάρες είναι η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών (n=3). Για την μέση τιμή του WSE (n=2).

Ίδια γράμματα στις στήλες υποδηλώνουν μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων, ενώ διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές (ANOVA, $p < 0,05$).

Στα παραπάνω δύο διαγράμματα 4.3.1 και 4.3.2 δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων χειρισμών, δηλαδή η επώαση των Caco-2 κυττάρων με την υπερκείμενη φάση των κοπράνων παρουσία ινουλίνης και εκχυλισμάτων των καρποφοριών των βασιδιομυκήτων δεν προκαλούν κάποια κυτταροτοξικότητα στη συγκέντρωση 10% που μελετήθηκαν. (ANOVA, $p > 0,05$)

Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια η ερευνητική δραστηριότητα γύρω από τον εντερικό μικροβίοκοσμο του ανθρώπου έχει επιφέρει πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Με την πρόοδο των βιοτεχνολογικών μέσων και των ταχύτερων αναλύσεων, ο χαρακτηρισμός της σύνθετης βιοποικιλότητας του ανθρώπινου οργανισμού έχει καταστεί εφικτός. Ο εντερικός μικροβίοκοσμος επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την υγεία του ξενιστή και γι αυτόν τον λόγο η προσπάθεια τροποποίησης του προς πιο «υγιή» σύσταση με τη χρήση συμπληρωμάτων διατροφής (πρεβιοτικών-προβιοτικών) παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Τα πρεβιοτικά είναι άπεπτα συστατικά που προέρχονται από τα τρόφιμα, τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην αλλαγή της σύστασης του εντερικού μικροβίοκοσμου καθώς ευνοούν την εκλεκτική αύξηση ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων όπως των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Τα βιβλιογραφικά τεκμηριωμένα πρεβιοτικά έως σήμερα είναι τα ITF (Inulin type fructans) και τα GOS (γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες) [13]. Μεγάλο ενδιαφέρον υπάρχει και για τις β-γλυκάνες ως υποψήφια πρεβιοτικά, οι οποίες αποτελούν άπεπτους πολυσακχαρίτες και βρίσκονται σε πολλά είδη τροφίμων.

Οι βασιδιομύκητες από τα αρχαία χρόνια αποτελούν πηγή ενδιαφέροντος και καταγράφονται σε πολλούς πολιτισμούς ως φαρμακευτικά προϊόντα. Το γεγονός αυτό έρχεται να επιβεβαιωθεί τα τελευταία χρόνια με την αύξηση των ερευνητικών δεδομένων που αποδίδουν πληθώρα ευεργετικών αποτελεσμάτων στα μανιτάρια. Αποτελούν πλούσιες πηγές β-γλυκανών (καθώς και άλλων σημαντικών συστατικών) και αυτό τα καθιστά ωφέλιμα για την διατροφή του ανθρώπου [4] [6].

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η πιθανή πρεβιοτική δράση εκχυλισμάτων πολυσακχαριτών από τα καλλιεργημένα μανιτάρια των ειδών *Pleurotus ostreatus* IK1123 και *Ganoderma lucidum* LGAM9720. Το *Pleurotus ostreatus* καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου (WSE), ενώ το *Ganoderma lucidum* σε δύο διαφορετικά υποστρώματα: σε πριονίδι οξιάς (BSE) και πριονίδι οξιάς με 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου (BSE-50).

Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *Pleurotus ostreatus* που καλλιεργήθηκε σε άχυρο σίτου (WSE), μετά το πέρας 24 ωρών ζύμωσης, δεν προκάλεσε κάποια σημαντική αύξηση των *Bifidobacterium* ενώ αντιθέτως οι πληθυσμοί των *Bacteroides* και *Clostridium* αυξήθηκαν. Για τον λόγο αυτό, ο πρεβιοτικός δείκτης του *Pleurotus ostreatus* έχει αρνητικό πρόσημο και δεν φαίνεται να εμφανίζει κάποια πρεβιοτική δράση. Ωστόσο οι Synytsya *et al.* έδειξαν πως το εκχύλισμα του *P.ostreatus* και του *P.eryngii* μπορούσε να διεγείρει την

αύξηση των προβιοτικών μικροοργανισμών όπως είναι τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* και του γένους *Lactobacillus*. Το εκχύλισμα του *P.eryngii* ωστόσο έδειξε μεγαλύτερη αύξηση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* από το *P.ostreatus* [4]. Πρέπει να σημειώσουμε ότι κατά την έναρξη της ζύμωσης ($t=0$) οι μικροβιακοί πληθυσμοί των *Bifidobacterium spp.* και *Bacteroides spp.* από την *in vitro* καλλιέργεια του *Pleurotus ostreatus* είναι μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους του αρνητικού μάρτυρα και του θετικού μάρτυρα. Επίσης τα ολικά βακτήρια είναι σημαντικά μεγαλύτερα από τον αρνητικό μάρτυρα ($t=0$). Το γεγονός αυτό πιθανά να υποδεικνύει κάποιο πειραματικό σφάλμα (μη-επαρκή ανάδευση), με αποτέλεσμα να μην έχει επαρκώς ομογενοποιηθεί το εμβόλιο με το υπόστρωμα και να ανιχνεύονται σημαντικές διαφοροποιήσεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς κατά την έναρξη της ζύμωσης, ενώ το εμβόλιο ήταν κοινό για όλους τους χειρισμούς. Επειδή όμως για τον υπολογισμό του πρεβιοτικού δείκτη υπολογίζεται η διαφορά των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών, πιθανότατα δεν έχει επηρεαστεί ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη.

Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *Ganoderma lucidum* που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς (BSE) εμφανίζει αύξηση του πληθυσμού *Bifidobacterium spp.* συγκριτικά με την έναρξη της ζύμωσης ($t=0$). Επίσης, το υπόστρωμα των πολυσακχαριτών του *G.lucidum* εμφάνισε υψηλότερους πληθυσμούς του *Bifidobacterium spp.* σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, την ίδια χρονική στιγμή. Παρόλα αυτά τα επίπεδα του πληθυσμού παρέμειναν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα του θετικού μάρτυρα (ινουλίνη, 24h). Τα *Bacteroides spp.* καθώς και τα ολικά βακτήρια εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα κατά το τέλος της ζύμωσης ($t=24$). Ο Πρεβιοτικός δείκτης του εκχυλίσματος του *Ganoderma lucidum* είχε θετικό πρόσημο και αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση των *Bifidobacterium* (μετά από 24-ωρη ζύμωση).

Επίσης και σε αυτή την καλλιέργεια παρατηρήθηκε κατά την έναρξη της ζύμωσης ($t=0$) οι μικροβιακοί πληθυσμοί των *Bifidobacterium spp.* και *Bacteroides spp.* και τα ολικά βακτήρια να είναι μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους του αρνητικού μάρτυρα και του θετικού μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει αντίστοιχο σφάλμα.

Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *Ganoderma lucidum* που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς εμπλουτισμένο με 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου παρουσίασε τον υψηλότερο πρεβιοτικό δείκτη. Ο πληθυσμός του *Bifidobacterium spp.* αυξήθηκε σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης, αλλά εμφανίστηκε και σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο του αρνητικού μάρτυρα για τον ίδιο χρόνο ($t=24$). Ωστόσο, την ίδια χρονική στιγμή ($t=24$) παρατηρήθηκαν πιο υψηλοί πληθυσμοί του *Bacteroides spp.* σε σχέση με τους αντίστοιχους

του αρνητικού μάρτυρα. Μεγαλύτεροι ήταν και οι πληθυσμοί των ολικών βακτηρίων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, τα οποία αυξήθηκαν και σε σχέση με τον πληθυσμό τους κατά την έναρξη της ζύμωσης ($t=0$). Ο Πρεβιοτικός δείκτης του *Ganoderma lucidum* που καλλιεργήθηκε σε πριονίδι οξιάς με 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου ήταν ο υψηλότερος δείκτης που παρατηρήθηκε ανάμεσα στα τρία εμβόλια. Αυτό ίσως να οφείλεται στην σύσταση του υποστρώματος που καλλιεργήθηκε το μανιτάρι, με το απόβλητο ελαιοτριβείου να προσδίδει πιθανόν διαφορετική σύσταση στα μανιτάρια, η οποία ευνοεί την διαφορετική ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα συστατικά του μανιταριού που βοηθούν στην αύξηση των ευεργετικών μικροοργανισμών όπως είναι οι β-γλυκάνες, πιθανά να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στο μανιτάρι που καλλιεργήθηκε σε απόβλητο ελαιοτριβείου. Οι Reverberi *et al.* σε μελέτη τους εξέτασαν αρκετούς βασιδιομύκητες (συμπεριλαμβανομένου και του *Pleurotus ostreatus*) και παρατήρησαν πως η παρουσία απόβλητου ελαιοτριβείου προωθεί τη σύνθεση των β-γλυκανών. Αυτό ίσως εξηγεί εν μέρει τη μεγαλύτερη αύξηση του *Bifidobacterium* spp. συγκριτικά με το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *G. lucidum* που καλλιεργήθηκε σε σκέτο πριονίδι οξιάς, καθώς οι β-γλυκάνες προωθούν την αύξηση των ευεργετικών μικροοργανισμών του εντέρου.

Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών που μελετήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία (β-γλυκάνες), έχει μελετηθεί και από άλλους ερευνητές για την πιθανή πρεβιοτική δράση του στον οργανισμό αλλά κυρίως από άλλες πηγές όπως οι β-γλυκάνες που προέρχονται από κριθάρι. Οι β-γλυκάνες αναφέρονται ως δυνητικά πρεβιοτικά, τα οποία προάγουν την εκλεκτική αύξηση ευεργετικών μικροοργανισμών όπως των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* σύμφωνα με *in vitro* μελέτες. Στην περίπτωση κατανάλωσης β-γλυκανών από κριθάρι, παρατηρήθηκε αύξηση του εντερικού πληθυσμού *Bifidobacterium* spp. σε υγιείς εθελοντές [20]. Ωστόσο, μία από τις σημαντικότερες πηγές είναι οι β-γλυκάνες που προέρχονται από το μανιτάρι *Pleurotus* (με το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* να κατέχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες-38g/100 ξηρής μάζας) καθώς και από άλλα είδη μανιταριών όπως το *Lentinus edodes*. Η περιεκτικότητα των β-γλυκανών μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες που αναπτύσσεται ο μύκητας και κυρίως από την σύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας. Για το *Pleurotus ostreatus* το ιδανικό pH του υποστρώματος είναι 5.5 ενώ τα υποστρώματα καλλιέργειας πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις αυξάνουν την περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες, καθώς επιφέρουν αύξηση της σύνθεσης της συνθετάσης της β-1,3-γλυκάνης στα καρποσώματα των μυκήτων. Για τον λόγο αυτό, συνίσταται η προσθήκη μικρής ποσότητας πυρηνελαίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας καθώς το συστατικό

αυτό διαθέτει πολυφαινολικές ενώσεις και ως εκ τούτου βοηθάει στην περαιτέρω αύξηση των β-γλυκανών [7].

Η κύρια διαφορά που θα μπορούσε να διαφοροποιήσει τις β-γλυκάνες των δύο βασιδιομυκήτων ως προς την πρεβιοτική τους δράση είναι η δομή τους. Το μοριακό βάρος, η χημική σύσταση, ο αριθμός των διακλαδισμένων αλυσίδων καθώς και η συνολική διαμόρφωση καθορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των β-γλυκανών των μανιταριών και τη βιολογική τους δράση [5]. Τόσο οι β-γλυκάνες του γένους *Pleurotus* όσο και του *Ganoderma* έχουν ως κύρια δομή β-(1,3)-γλυκάνες με το *Pleurotus* να διαθέτει και μόρια D-γλυκοκυττανόζης ενώ το *Ganoderma lucidum* περιέχει και 4% πρωτεΐνες FIMs (fungal immunomodulatory proteins) καθώς και πεπτίδια πολυσακχαριτών [13]. Αναφέρεται ότι οι β-(1,4) γλυκάνες μπορούν να διασπαστούν με πιο αργό ρυθμό από την β-γλυκοζιδάση του *B. bifidum* συγκριτικά με τις β-(1,3)- και β-(1,6)-γλυκάνες. Επιπλέον, οι β-(1,3)- και οι β-(1,6)-γλυκάνες υδρολύονται πιο επιλεκτικά από τα ενζυμικά συστήματα των πληθυσμών του *Bifidobacterium* spp. [13]. Με τα σημερινά ερευνητικά δεδομένα, τα πρεβιοτικά υποστρώματα με χαμηλού μοριακού βάρους ολιγοσακχαρίτες υπόκεινται σε αυξημένη εκλεκτική ζύμωση από τους πληθυσμούς του *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* από ότι τα αντίστοιχα μόρια υψηλού μοριακού βάρους. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για να συγκριθεί η δυνατότητα ζύμωσης των β-γλυκανών (από διάφορες πηγές) από πληθυσμούς του γένους *Bifidobacterium*, έδειξε πως ανεξαρτήτως από την διαφορετική πηγή που προέρχονταν οι β-γλυκάνες, υπήρξε αύξηση όλων των στελεχών του γένους *Bifidobacterium* [13].

Ως προς τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας για την πιθανή κυτταροτοξικότητα των υπερκειμένων της *in vitro* καλλιέργειας, δεν παρατηρήθηκε κάποια τοξική δράση στα διαφοροποιημένα Caco-2 επιθηλιακά κύτταρα των εκχυλισμάτων πολυσακχαριτών των μανιταριών, συγκρινόμενα με τον μάρτυρα (θετικό και αρνητικό).

Υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πιθανή πρεβιοτική δράση που παρουσιάζουν οι βασιδιομύκητες και κυρίως οι β-γλυκάνες που βρίσκονται σε αυτούς. Επιπλέον η σύσταση των υποστρωμάτων καλλιέργειας των βασιδιομυκήτων είναι ένα θέμα που παρουσιάζει και θα παρουσιάσει τα επόμενα χρόνια επίσης μεγάλο ενδιαφέρον. Οι περισσότερες έρευνες για πιθανή πρεβιοτική δράση εστιάζουν στους ολιγοσακχαρίτες, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν ακόμη πολλά ερευνητικά δεδομένα για τους πολυσακχαρίτες και τα ευεργετικά τους οφέλη στον εντερικό μικροβίοκοσμο. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη πιθανή πρεβιοτική δράση είναι με πειράματα *in vitro* τα οποία έχουν το μειονέκτημα να εξετάζουν την πρεβιοτική δράση ανεξάρτητα από την διέλευση τους

διαμέσου των άνω τμημάτων του γαστρεντερικού συστήματος. Σε αυτές τις μελέτες δεν παρατηρείται δηλαδή η συμβολή της αλληλεπίδρασης των εξεταζόμενων συστατικών με το γαστρεντερικό σύστημα. Έτσι τα μοντέλα αυτά είναι ενδεικτικά μίας ενδεχόμενης πρεβιοτικής δράσης και δεν αποδεικνύουν το πρεβιοτικό χαρακτηριστικό ενός συγκεκριμένου προϊόντος όπως οι μελέτες που προσομοιάζουν τις λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος [29]. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντική η περαιτέρω έρευνα. Εν κατακλείδι, στην παρούσα πτυχιακή μελέτη διαφαίνεται η πρεβιοτική δράση που ασκεί το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών από μανιτάρια του *G.lucidum* το οποίο καλλιεργήθηκε τόσο στο κλασσικό υπόστρωμα (BSE) αλλά και σε εμπλουτισμένο με 50% διφασικό απόβλητο ελαιοτριβείου.

Συμπεράσματα

Βάσει της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής μελέτης, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Το εκχύλισμα των πολυσακχαριτών του *Pleurotus ostreatus* δεν επέδειξε κάποια πρεβιοτική δράση. Αντίθετα τα εκχυλίσματα των πολυσακχαριτών του *Ganoderma lucidum* που είχαν καλλιεργηθεί τόσο σε κλασσικό υπόστρωμα όσο και σε εμπλουτισμένο με 50% απόβλητο διφασικού ελαιοτριβείου διαπιστώθηκαν θετικοί πρεβιοτικοί δείκτες.
2. Τα εκχυλίσματα των πολυσακχαριτών των βασιδιομυκήτων *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* δεν παρουσιάζουν κάποια τοξική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μετά από ζύμωση 24 ωρών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αντίθετα προωθούν τη βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου σε ίσο βαθμό σε σύγκριση με την ινουλίνη τόσο κατά την αρχική παρουσία τους στο έντερο όσο και μετά τη ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

Βιβλιογραφία

1. Δημήτρης Μ. Δήμου, Γ., Μυκητολόγος, ΜΥΚΗΤΕΣ-MANITAPIA. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΜΥΚΗΤΩΝ
2. Ulrike Lindequist et al., The pharmacological potential of mushrooms. Institute of pharmacy, 2005; 2(3) 285-299
3. Valverde M. Elena, T.P et al. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. International Journal of Microbiology, (2015) pages: 14
4. F.M.N.A. Aida, M.S., Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends in Food Science & Technology, 2009. 20(11-12): p. 567-575
5. Barbara Stachowiak, J. R., Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. Eur Food Res Technol (2012), 234: 369-380
6. Andriy Synytsyaa, K.M., Alla Synytsyab, Ivan Jablonskya et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers, 2009. 76(4): p.548-556
7. Rop, O., J. Mlcek, and T. Jurikova, Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutr Rev, 2009. 67 (11): 624-631.
8. Phillipp H. Fesel, Alga Zuccaro, β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. Fungal Genetics and Biology (2016) p. 53-60
9. Ha Thi Hoa, Chun-Li Wang. The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). Mycobiology 2015, 43(1): 14-23
10. Ha Thi Hoa, Chun-Li Wang, Chong-Ho Wang. The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*) Mycobiology 2015, 43(4) p.423-434
11. NOSAL'OVA, V., et al., Effects of Pleuran (β -Glucan Isolated from *Pleurotus ostreatus*) on Experimental Colitis in Rats. Physiol. Res, 2001. 50(6): p. 575-81
12. Dandamudi Rajesh Babu, M. Pandey et al., Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. And their sporeless/low sporing mutants. J Food Sci Technol. 2014 51(11), 3317-3324
13. Ka-Lung Lam, P.C-K.C., Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013. 2(1): p. 45-64
14. Bishop K, K.C., Xu Y, Glucina MP, Paterson RR, Ferguson LR, From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. Phytochemistry, 2015 p.56-65

15. Α.-Φ.Α. Μεντής, Ανθρώπινο Μικροβίωμα του εντέρου – Ο ρόλος στην υγεία και στη νόσο Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής 2013: p.30(3):272-288
16. A. Vrieze, F. Holleman et al. The environment within : how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetesologia* (2010) 53: 606-613
17. Virginia R. Alonso, F. Guarner, Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition* (2013) 109, 21-26
18. Tremanoli Valentina, F. Bäckhed, Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012. 489(7415): p. 242-9
19. Salazar, N., et al., Inulin-type fructans modulate intestinal *Bifidobacterium* species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical Nutrition*, 2014. p: 1-7
20. Turunen. K., et al., Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: A pilot study. *Anaerobe* 2011. p: 1-4
21. Rios-Covian David, S. Arboleya et al., Interactions between *Bifidobacterium* and *Bacteroides* Species in Cofermentations Are Affected by Carbon Sources, Including Exopolysaccharides Produced by *Bifidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, (2013) volume 79: p.7518-7524
22. Maarten A. Mensink, Henderik W. F. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers* (2015) Volume 130: p. 405-419
23. Mie Nishimura, T. Ohkawara et al., Effects of the extract from roasted chicory (*Cichorium intybus* L.) root containing inulin-type fructans on blood glucose, lipid metabolism, and fecal properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. (2015) 5(3) : 161-167
24. Masashi Mizuno, Y. Nishitani, Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, (2013), 52(3): 202-207
25. Akramiene D., Kondrotas A. et al., Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* (2007), 43(8): p. 597-606
26. Mohamed Ali Abol Hassan, R. Rouf, et al. Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, (2015), 16(4): 7802-7838
27. Ellie J. C. Goldstei, et al. *Lactobacillus* Species, Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Oxford Journals*
28. Michael T. Madigan, John M. Martinko, J. P. Βιολογία των μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2005
29. Roderfroid Marcel, G. R. Gibon, et al. Prebiotic effects : metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* (2012) volume 104: p.1-63

30. Dutton J. Rachel, Tutnbaugh P.J., Taking a metagenomic view of human nutrition, Current Opinion, (2012) volume 15
31. Xiao-Qiang Han, G. Yue, et al. Structure Elucidation and Immunomodulatory Activity of a Beta Glucan from the Fruiting Bodies of *Ganoderma sinense*. Plos one 9(7) 2014
32. Gibson, G.R., Roderfroid, M.B. Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition (1995) 125, 1401-1412
33. Olano-Martin, E., Moutzouris K.C. Gibson. G.R. Rastall, R.A., In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. British Journal of Nutrition (2000) 83, 247-255
34. Palframan, R., Gibson, G.R., Rastall, R.A., Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37: p. 281-284
35. Rycroft, C.E., Jones, M.R. Gibson, G.R. Rastall, R.A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology 2001, 91, 878-887
36. Yu, Z. Morrison, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques (2004) 36, 808-812
37. Rinttilä, T., Kassinen, A. Malinen, E., Krogus, L., Palva, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenics and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology (2004), 97: p. 1166-1177
38. Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N., Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 2002 148, 257-266
39. Phong, S.F, Shanmugavelu, S., Thayalini, K., Noraini, S., Wong, H.K. Detection of *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Clostridium perfringens* in the gastrointestinal contents of chicken fed different diets by real-time PCR. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 2010, 38, 81-87
40. Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., McMurdo, M.E. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. Applied and Environmental Microbiology 2004, 70, 3575-3581
41. Liu, C., Song, Y., McTeague, M., Vu, A.W., Wexler, H., Finegold, S.M. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group-and species-specific primers. FEMS Microbiology Letters 2003, 222, 9-16