ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ : ΔΙΑΤΡΟΦΗ , ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ

ΒΑΛΚΑΝΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ

2022

HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCE AND EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETICS

POSTGRADUATE PROGRAMME APPLIED NUTRITION AND DIETICS

DIRECTION: DIETICS, FOOD AND CONSUMER

RESEARCH ABOUT PREBIOTIC ACTIVITY IN STRAINS OF BASIDIOMYCOTA FROM GREEK REGION

VALKANAS IOANNIS

MASTER THESIS

ATHENS

2022

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ : ΔΙΑΤΡΟΦΗ , ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βακτηριολογίας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής , Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΛΕΤΣΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Κύρια Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΖΕΡΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ο Βαλκανάς Ιωάννης δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου , να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από την ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή / και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια ***Αδαμαντίνη Κυριακού***, την κ. ***Ευδοκία Μήτσου*** και την κ. ***Γεωργία Σαξάμη*** από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Η εργασία αποτέλεσε μέρος του προγράμματος ***FUNglucan*** «Ανάπτυξη καινοτόμου λειτουργικού τροφίμου εμπλουτισμένου με β-γλυκάνες από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων», Τ1ΕΔΚ-03404, «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» ΕΣΠΑ 2014-2020 ΕΠΑνΕΚ

Αφιέρωση

Στην γυναίκα μου και τον γιο μας!!!

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη 4

Abstract 6

Κατάλογος Εικόνων 7

Κατάλογος Πινάκων 7

Κατάλογος Γραφημάτων 8

Κεφάλαιο 1

1.1 Μανιτάρια 10
1.2 Ιστορία 12
1.3 Μορφολογία και Βιολογία Μυκήτων 13
1.4 Τα μανιτάρια ως τρόφιμα 15
1.4.1 Υδατάνθρακες 15
1.4.2 Πρωτείνες 16
1.4.3 Αμινοξέα 17
1.4.4 Λιποειδή 17
1.4.5 Βιταμίνες 18
1.4.6 Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία 18
1.5 Υποστρώματα για την καλλιέργεια των μανιταριών 19
1.6 Cyclocybe cylindracea 21
1.7 Μανιτάρια στον Ελλαδικό χώρο 24

Κεφάλαιο 2

2.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος 26

2.2 Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Ξενιστής 30

2.3 Λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου – SCFA 32

2.4 Διαιτητικές ίνες 33

2.5 Πρεβιοτικά 34

2.6 Πρεβιοτικά και ξενιστής 36

2.7 Οφέλη για την υγεία- ευεργετικές δράσεις 38

2.8 Ινουλίνη ως πρεβιοτικό 39

3.2 Β-γλυκάνες (ευεργετικά αποτελέσματα – πρεβιοτική δράση) 40

Κεφάλαιο 3

3.1 Σκοπός της έρευνας 44

3.2 Μεθοδολογία 44

3.2.1 *In vitro* ζύμωση των πιθανών πρεβιοτικών υποστρωμάτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο 44

3.3 Χαρακτηριστικά εθελοντών (Ανθρωπομετρικά – Διατροφικά) 45

3.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία εμβολίου 46

3.5 Υποστρώματα που εξετάστηκαν 47

3.6 Πρωτόκολλο in vitro ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations) 48

3.6.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από δείγμα κοπράνων 50

3.6.2 Προετοιμασία των δειγμάτων – λύση κυττάρων 51

3.6.3 Καταβύθιση του DNA 51

3.6.4 Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών 52

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR) 53

3.8 Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη 55

3.9 Στατιστική επεξεργασία 56

Κεφάλαιο 4

Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών 58

4.2 Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών 59

4.3 Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών μετά τη ζύμωση 68

4.4 Συζήτηση 70

4.5 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα 74

Βιβλιογραφία 75

Παράρτημα 84

Περίληψη

Το είδος *Cyclocybe cylindracea* ανήκει στο φύλο των Βασιδιομυκήτων. Παράγει εδώδιμα μανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες και καλλιεργείται εντατικά κυρίως στην Κίνα. Τα διαπιστωμένα οφέλη για την υγεία και η υψηλή γαστρονομική του αξία έχουν ωθήσει την έρευνα στη μελέτη των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην *in vitro* ζύμωση του *C. cylindracea* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο επτά υγιών ηλικιωμένων ατόμων (≥65 ετών) και στη διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης του μανιταριού αυτού.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την *in vitro* ζύμωση ήταν δύο στελέχη του μανιταριού *C. cylindracea* (CC2 και CC505) καλλιεργημένα σε υπόστρωμα άχυρου σίτου, η ινουλίνη ως θετικός μάρτυρας και ο αρνητικός μάρτυρας ο οποίος δεν περιείχε πηγή άνθρακα.

Απομονώθηκε το ολικό DNA των μικροοργανισμών και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών βακτηρίων, των *Bacteroides* spp*., Bifidobacterium* spp*., Lactobacillus* group*, C. perfringens, Roseburia* spp – *Eubacterium rectale, Faecalibacterium prausnitzii*, έγινε με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR (qPCR). Στη συνέχεια έγινε ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη για κάθε υπόστρωμα.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την *in vitro* ζύμωση υποδεικνύουν ότι και τα δυο στελέχη του *C. cylindracea* επέδρασαν ευεργετικά σε συγκεκριμένους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου των ηλικιωμένων ατόμων.

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στους πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων, των *Bifidobacterium* spp., και του *F. prausnitzii* στις 24 ώρες συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης και για τα δύο στελέχη μανιταριών.

Οι τιμές για το βουτυρικοπαραγωγό βακτήριο *F. prausnitzii* ήταν υψηλότερες από τον αρνητικό μάρτυρα στις 24 ώρες και για τα δύο στελέχη μανιταριών. Επίσης και τα δύο στελέχη παρουσίασαν μειωμένους πληθυσμούς των *Bacteroides* spp στις 24 ώρες, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (t=0), αλλά και σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (INU2). Το στέλεχος CC505 εμφάνισε στις 24 ώρες υψηλότερα τα ολικά βακτήρια σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το στέλεχος CC2 παρουσίασε στις 24 ώρες υψηλότερους πληθυσμούς από την ομάδα των *Lactobacillus*, το *C. perfringens* και μειωμένους για την ομάδα *Roseburia* spp- *Eubacterium rectale*, σε σχέση με την

έναρξη της ζύμωσης. Όσον αφορά τον πρεβιοτικό δείκτη και τα δύο μανιτάρια είχαν θετικούς πρεβιοτικούς δείκτες μετά το πέρας της ζύμωσης.

Λέξεις κλειδιά: Εντερικός Μικροβιόκοσμος, Πρεβιοτικά, Μανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες, *C. cylindracea*

Abstract

Cyclocybe cylindracea belongs to phylum Basidiomycota and produces edible mushrooms rich in beta- glucans. The mushrooms of *C.cylindracea* are known worldwide for their potential health benefits and particularly in China, where it is commercially cultivated. Recently, it has been the subject of intensive research.

The aim of the present study was the *in vitro* investigation of the potential prebiotic activity of *C. cylindracea* mushrooms. For this reason, lyophilized mushrooms of the two species of *C. cylindracea* (CC2 and CC505), cultivated in wheat straw, were fermented, after being inoculated with the gut microbiota of seven healthy elderly individuals (≥65 years old), in an *in vitro* static fermentation model. Inulin served as a positive control, while the same Basal Medium that was used for all the substrates without carbon source was used for negative control.

Total DNA of microorganisms was isolated and the quantification of *total bacteria, Bacteroides* spp*., Bifidobacterium* spp*., Lactobacillus* group*, C. perfringens, Roseburia* spp – *Eubacterium rectale, F. prausnitzii* was performed with quantitative PCR (qPCR). The prebiotic index for each substrate was also calculated.

The results from the *in vitro* fermentation suggest that both strains of *C. cylindracea* had a beneficial effect on selected microorganisms of the gut microbiota of elderly. A significant increase in total bacteria, *Bifidobacterium* spp. and *F. prausnitzii* has been observed after 24 hours of fermentation, compared to the start of fermentation, for both strains of mushrooms. Also, both strains of mushrooms exhibited higher population of *F. prausnitzii* compared to the negative control after 24 hours of fermentation. *Bacteroides* spp population decreased after 24 hours of fermentation compared to the begging of the fermentation (t=0) and to inulin (INU2). At 24 hours, the total bacteria associated with the use of CC505 strain were significantly higher compared to the negative control. The CC2 strain increased the population of *Lactobacillus* group and *C. perfringens* while it decreased the population of *Roseburia* spp – *Eubacterium rectale* compared to the beginning of the fermentation. Regarding the prebiotic index, both species of *C. cylindracea* had positive scores after the fermentation

Key words: Gut microbiota, Prebiotics, Mushrooms rich in beta- glucans *C. cylindracea*

Κατάλογος εικόνων, πινάκων και γραφημάτων

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των βασιδιομυκήτων

Εικόνα 2. Καρποφορία σε πλήρη ανάπτυξη του είδους C. cylindracea ανεπτυγμένη σε υπόστρωματα αποτελούμενα απο παραπροιόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας

Εικόνα 3. Κατανομή των βακτηρίων κατά μήκους του γαστρεντερικού σωλήνα

Εικόνα 4. Στάδια αποικισμού του εντέρου σε βρέφη και παιδιά

Εικόνα 5. Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο

Εικόνα 6. Ο μηχανισμός δράσης των πρεβιοτικών

Εικόνα 7. Β- γλυκάνες μανιταριών με γραμμικούς β(1,3) σκελετούς συνδεδεμένοι με από τον β (1,6) πλευρικές αλυσίδες

Πίνακας 1. Σύσταση των κυριότερων, από άποψη παραγόμενης ποσότητας, λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Πίνακας 2. Βασική σύσταση μανιταριών C. cylindracea που έχουν παραχθεί σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις 21 ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια C. cylindracea τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα

Πίνακας 4. Κωδικοί υποστρωμάτων για την in vitro ζύμωση και μάρτυρες

Πίνακας 5. Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπο εξέταση μικροοργανισμών.

Πίνακας 6. Γενικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης

Πίνακας 7. Διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά Φυσικής Δραστηριότητας των εθελοντών της μελέτης

Πίνακας 9. Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log10copies/ml) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά την αρχή της *in vitro* ζύμωσης (t=0h)

Πίνακας 10. Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log10copies/ml) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από 24 ώρες *in vitro* ζύμωσης (t=24h)

Γράφημα 1. Επίπεδα των ολικών βακτηρίων, των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24).

Γράφημα 2. Επίπεδα της ομάδας *Lactobacillus,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24).

Γράφημα 3. Επίπεδα της ομάδας των *Bifidobacterium,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24)

Γράφημα 4. Επίπεδα της ομάδας των *Bacteroides,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24).

Γράφημα 5. Επίπεδα της ομάδας των *C. Perfringens,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24)

Γράφημα 6. Επίπεδα της ομάδας των *Roseburia,*spp- *Eubacterium rectale* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24).

Γράφημα 7. Επίπεδα της ομάδας των *Faecalibacterium prausnitzi* ,των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24).

Γράφημα 8. Οι πρεβιοτικοί δείκτες των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων μετά από 24 ώρες ζύμωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Μανιτάρια
1.2 Ιστορία Μανιταριών
1.3 Μορφολογία και Βιολογία Μυκήτων

1.4 Τα μανιτάρια ως τρόφιμα
1.4.1 Υδατάνθρακες
1.4.2 Πρωτείνες
1.4.3 Αμινοξέα
1.4.4 Λιποειδή
1.4.5 Βιταμίνες
1.4.6 Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία
1.5 Υποστρώματα
1.6 Cyclocybe Cylindracea
1.7 Μανιτάρια στον Ελλαδικό χώρο

1.1 ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ

Τα μανιτάρια είναι ετερότροφοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που κατατάσσονται στο βασίλειο των μυκήτων (Blackwell 2011). Από διαιτολογική σκοπιά αποτελούν ένα αναπόσπαστο κομμάτι του καθημερινού διαιτολογίου του ανθρώπου (Feeney et al., 2014). Η κοινή ονομασία μανιτάρια αναφέρεται στους μυκηλιακούς Βασιδιομύκητες οι οποίοι σχηματίζουν μεγάλα καρποσώματα. Η ανάπτυξη των καρποσωμάτων εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν. Ευνοϊκές θεωρούνται οι συνθήκες που ακολουθούν μετά από περιόδους υγρών και ψυχρών καιρικών συνθηκών. Τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής σχηματίζονται συνήθως στο κάτω μέρος των καρποσωμάτων (πίλων) πάνω σε πτυχοειδείς δομές που ονομάζονται ελάσματα. Τα ελάσματα αυτά στηρίζονται στον πήλο του μανιταριού (Feeney et al., 2014), (Guillamon et al.,2010).

Ο ορισμός μανιτάρι προτάθηκε από τους Chang και Miles το 1992 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». Μανιτάρια λοιπόν είναι τα καρποσώματα των περισσότερων Βασιδιομυκήτων καθώς και κάποιων είδων Ασκομυκήτων (Ulrike et al., 2005) . Τα μανιτάρια αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο, παρ' όλα αυτά το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους οι μύκητες που τα σχηματίζουν το περνούν με τη μορφή μυκηλίου που αναπτύσσεται στο έδαφος, στα δέντρα, στα φύλλα και σε διάφορα άλλα υποστρώματα. Καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο για τα διατροφικά οφέλη αλλά και τις ευεργετικές ιδιότητες που παρέχουν στο ανθρώπινο οργανισμό (Aida et al., 2009). Τα συναντάμε σε διάφορους πολιτισμούς λόγω της ιδιαίτερης γεύσης και του αρώματος. Τα μανιτάρια έχουν χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο, περιέχοντας περίπου 90% νερό. Παρ' όλα αυτά είναι πλούσια σε πρωτεϊνες, διαιτητικές ίνες, βιταμίνες και μέταλλα (Valverde et al., 2015). Η περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα είναι ισοδύναμη με αυτή των ζωικών πηγών (Guillamon et al.,2010). Στα μανιτάρια αποδίδονται αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιυπερχοληστερολαιμικές, αντιφλεγμονώδεις, καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται σε βιοδραστικά συστατικά όπως φαινολικά συστατικά, πολυπεπτίδια, τερπένια, στεροειδή, πολυσακχαρίτες όπως οι β-γλυκάνες (Mattila et al.,2001, Reis et al., 2012).

Η σταδιακά αυξανόμενη ζήτηση των μανιταριών οδήγησε στην αύξηση και στην παραγωγή αυτών ώστε να καλυφθεί η ζήτηση. Το 1978 η παραγωγή παγκοσμίως ήταν 1 δισεκατομμύριο κιλά και το 2013 ήταν 34 δισεκατομμύρια κιλά. Θεωρείται ένα τεράστιο επίτευγμα λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο πληθυσμός της γης αυξήθηκε από 4,2

δισεκατομμύρια το 1978 σε 7,1 δισεκατομμύρια το 2013. Το 2013 σχεδόν όλη η κατανάλωση στην Κίνα, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ινδία καλύπτεται από τις ίδιες τις χώρες. Σε χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο Καναδάς, η Ιαπωνία και η Αυστραλία οι ανάγκες καλύπτονται σχεδόν από τις ίδιες τις χώρες αλλά και από εισαγωγές. Η Κίνα είναι ο βασικός παραγωγός εδώδιμων μανιταριών. Πάνω από 30 δισεκατομμύρια κιλά μανιταριών παράχθηκαν στην Κίνα το 2013 το οποίο αντιστοιχεί στο 87% της συνολικής παραγωγής (Royse, et al. 2017). Έρευνες δείχνουν ότι υπάρχουν περίπου 5,1 εκατομμύρια είδη μυκήτων σε όλο τον κόσμο. Στην Ευρώπη αναφέρονται τουλάχιστον 75.000 είδη (Blackwell, 2011). Έχουν καταγραφεί περί τα 20000 είδη μανιταριών και θεωρείται πως αυτός ο αριθμός αντιστοιχεί στο 10% περίπου των συνολικών υπαρχόντων (Ulrike et al, 2005, Senn Irlet et al.,2007).

Από αυτά περί τα 3.000 θεωρούνται εδώδιμα, εκ των οποίων τα 20 είναι τα πιο δημοφιλή και ευρέως καλλιεργούμενα. Ανάμεσα στα πιο δημοφιλή είναι τα “Shiitake” (“Λεντινούλα”, *Lentinoula edodes*), τα αγαρικά (“buttom mushrooms”π.χ. *Agaricus bisporus*), τα πλευρώτους (“oyster mushrooms”, *Pleurotus ostreatus*) και τα “Enoki” (*Flammulina velutipes*) (Lam and Okello, 2015).

1.2 ΙΣΤΟΡΙΑ

Τα μανιτάρια αναφέρονται ήδη από τα αρχαία χρόνια (Chatterjee et al., 2016).

Η χρήση τους στη διακόσμηση των τάφων των Φαραώ στην αρχαία Αίγυπτο και οι γραπτές πληροφορίες για τη συλλογή και τη βρώση μανιταριών στους κλασικούς χρόνους είναι κάποιες ιστορικές αναφορές χρήσης μανιταριών (Διαμάντης , 1992).

Η πρώτη γραπτή αναφορά για τη χρήση μανιταριών ως τροφή έγινε από τον Ευριπίδη τον 3ο αιώνα π.Χ. ο οποίος ανέφερε την κατανάλωση μανιταριών από αρχαίους Έλληνες και Ρωμαίους. Οι Ρωμαίοι το χαρακτήριζαν ως «τροφή των Θεών» ενώ οι Αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι δίνει δύναμη στους πολεμιστές(Valverde et al., 2015). Τα μανιτάρια από τους Κινέζους χαρακτηρίζονται ως ελιξήριο της ζωής, οι αυτοκράτορες της Ιαπωνίας το θεωρούσαν αφροδισιακό και το καλλιεργούσαν σε μυστικά καταφύγια καλά φυλαγμένα (Παντίδου, 1991). Οι Ινδιάνοι χρησιμοποιούσαν στις τελετές τους μανιτάρια με παραισθησιογόνες επιδράσεις όμοιες με εκείνες των ναρκωτικών, όπως για παράδειγμα είδη του γένους *Psilocybe* (Ζερβάκης, 1998). Ο Albert Magnus (1196-1280) χαρακτήριζε τα μανιτάρια ως τον αφρό της γης (Διαμάντης , 1992). Παρ'όλα αυτά υπάρχουν και αρκετές πηγές που σημειώνουν και τραγικές συνέπειες από την κατανάλωση δηλητηριωδών μανιταριών (Διαμάντης , 1992, Παντίδου, 1991). Το 405 π.Χ όταν ο Ευριπίδης επισκέφθηκε την Ικαρία είδε μια μητέρα με τους δύο γιούς της και την κόρη της να πεθαίνουν μετά από κατανάλωση δηλητηριωδών μανιταριών. Πρώτος ο Διοσκουρίδης τον 1ο αιώνα μ.Χ έκανε τη διάκριση μεταξύ εδώδιμων και δηλητηριωδών μανιταριών. Οι ουσίες που προκαλούν τις δηλητηριάσεις από την κατανάλωση μανιταριών αποτελούν προϊόντα του ίδιου τους του μεταβολισμού. (Παντίδου, 1991). Το χειμώνα του 1991 ορειβάτες των Ιταλικών Άλπεων βρήκαν μανιτάρια κυρίως του είδους *Piptoporus betulinus* και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το άναμμα της φωτιάς, φάρμακο για τη θεραπεία των πληγών και ως αφέψημα κατά ασθενειών και κυρίως κρυολογημάτων (Stamets, 1993). Η πρώτη καλλιέργεια μανιταριών στην Ευρώπη αναφέρεται στη Γαλλία στα τέλη του 17ου αιώνα. Η καλλιέργεια διαδόθηκε σε Αγγλία, Ιταλία,Γερμανία. Αρχικά η καλλιέργεια γινόταν στην ύπαιθρο και αργότερα σε σπηλιές, στάβλους και πλέον σε ειδικά κατασκευασμένους- διαμορφωμένους θαλάμους (Φραντζεσκάκης, 1990, Ζερβάκης, 1998). Συστηματική καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα με την παραγωγή του ενδεδειγμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Μέχρι τα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας τα πιο δημοφιλή εδώδιμα μανιτάρια ήταν το *Agaricus bisporus* και το *Lentinula edodes* . Η καλλιέργεια των μανιταριών του γένους *Pleurotus* είναι σχετικά πιο πρόσφατη (Donsky, 2000).

1.3 Μορφολογία και Βιολογία Μυκήτων

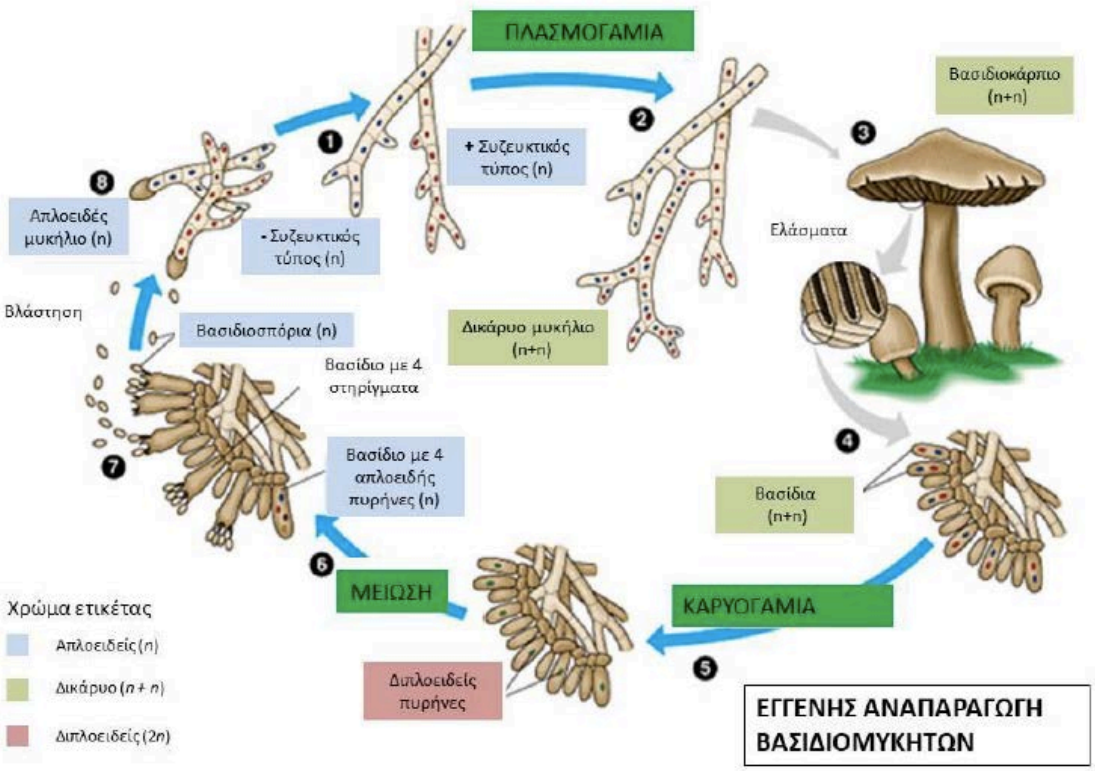
Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με κύτταρα που περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη και τοίχωμα. Οι μύκητες αντέχουν σε υψηλή ωσμωτική πίεση γι' αυτό μπορούν και αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται συνήθως από χιτίνη, κυτταρίνη και πολυσακχαρίτες (γλουκάνες). Η κυτταροπλασματική μεμβράνη δεν διαφέρει από τη μεμβράνη των άλλων ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι περισσότεροι μύκητες είναι νηματοειδείς πολυκύτταροι ενώ άλλοι είναι μονοκύτταροι (Καλκάνη, Ε., 2001).

Θαλλός ονομάζεται το κύριο σώμα ενός πολυκύτταρου μύκητα και αποτελείται από λεπτά σωληνοειδή νημάτια που ονομάζονται υφές, οι οποίες διακλαδίζονται σχηματίζοντας το μυκήλιο. Στις περιπτώσεις των Ασκομυκήτων και Βασιδιομυκήτων οι υφές είναι πολυκύτταρες και να φέρουν εγκάρσια διαφράγματα ή αλλιώς σέπτα.

Οι συνήθεις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούν οι μύκητες για την ανάπτυξή τους είναι η γλυκόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη. Με βάση τις τροφικές τους απαιτήσεις χωρίζονται σε σαπροτροφικούς, παρασιτικούς και συμβιωτικούς (Ζερβάκης, 2011). Ο πολλαπλασιασμός των μυκήτων γίνεται μέσω εγγενούς ή και αγενούς αναπαραγωγής. Η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει τα στάδια της πλασμογαμίας, καρυογαμίας και μείωσης και τα σπόρια που παράγονται φέρουν το όνομα της κατηγορίας των μυκήτων στην οποία ανήκουν όπως βασιδιοσπόρια για τους βασιδιομύκητες και ασκοσπόρια για τους ασκομύκητες. Το συντριπτικά μεγαλύτερο μέρος των καταγεγραμμένων μυκήτων ανήκει στους βασιδιομύκητες και τους ασκομύκητες και περιλαμβάνει είδη που σχηματίζουν εδώδιμα μανιτάρια (Deacon, 2006). Κάποια είδη από τις συγκεκριμένες ταξινομικές ομάδες αξιοποιούνται σε μεγάλος εύρος εφαρμογών όπως για παράδειγμα τη διατροφή του ανθρώπου, την αποτοξικοποίηση αποβλήτων, τη λεύκανση χαρτιού, την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών κ.ά (Ζερβάκης, 2011).

Το κοινό τους γνώρισμα των βασιδιομυκήτων (υλικό από καρποφορίες των οποίων εξετάστηκε στην παρούσα εργασία) είναι ο σχηματισμός βασιδίων (γαμεταγγείων) πάνω στα οποία σχηματίζονται τα σπόρια (βασιδιοσπόρια) εγγενούς αναπαραγωγής. Ένα άλλο κοινό χαρακτηριστικό είναι τα δικάρυα μυκήλια που αποτελούνται από υφές με δύο πυρήνες διαφορετικού συζευκτικού τύπου (Deacon, 2006). Στους περισσότερους βασιδιομύκητες κατά το στάδιο της επάκρια αύξησης, εμφανίζεται ένα χαρακτηριστικό εξόγκωμα των υφών, ο κρίκος (Ζερβάκης, 2011). Για την αποφυγή μετακίνησης των πυρήνων στα διάφορα μέρη των υφών, οι βασιδιομύκητες διαθέτουν δολίπορα εγκάρσια διαφράγματα. Τα στάδια του βιολογικού κύκλου περιλαμβάνουν το στάδιο της καρυογαμίας στο δικάρυο μυκήλιο κατά το οποίο

πραγματοποιείται η σύντηξη των πυρήνων, το στάδιο της μειωτικής διαίρεσης και η μεταφορά των πυρήνων στα βασιδιοσπόρια τα οποία σχηματίζονται πάνω στο βασίδιο. Στη συνέχεια ακολουθεί η πλασμογαμία, στο οποίο αντίθετα συζευκτικού τύπου υφές έρχονται σε επαφή σχηματίζοντας νέο μυκήλιο με δικάρυες υφές. Οι μύκητες μπορεί να αναπτύσσουν ένα πολύπλοκο δίκτυο δικάρυων υφών για μεγάλο χρονικό διάστημα έως ότου βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να δοθεί το σήμα για να σχηματιστούν οι καρποφορίες (Ζερβάκης, 2011, Deacon, 2006).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου των βασιδιομυκήτων (Pearson education).

1.4 Τα μανιτάρια ως τρόφιμα

Η χρήση των μανιταριών ενδείκνυται για δίαιτες χαμηλών θερμίδων σε μία ισορροπημένη δίαιτα ή σε μία χορτοφαγική δίαιτα (Stachowiak. B., 2012). Αυτό συμβαίνει γιατί τα μανιτάρια έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και μειωμένη περιεκτικότητα σε λίπη. Η χημική τους σύσταση και η περιεκτικότητά τους σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά μεταβάλλεται αναλόγως της σύστασης του εδάφους, των περιβαλλοντικών συνθηκών και το είδος του μανιταριού (Stachowiak, 2012).

Η σύσταση του μανιταριού που θα φτάσει στον καταναλωτή επηρεάζεται και από την επεξεργασία της μαγειρικής παρασκευής που θα υποστεί (Valverde et al., 2015).

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πρωτεΐνη είναι υψηλή σε σχέση με άλλα τρόφιμα και κυμαίνεται από 200 – 250gr/kg (ξ.β.). Τα αμινοξέα λευκίνη, βαλίνη, γλουταμίνη, γλουταμινικό οξύ και ασπαρτικό οξύ βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία (Valverde et al., 2015).

Κύριο συστατικό των μανιταριών είναι οι υδατάνθρακες οι οποίοι αποτελούν το 20% έως και το 70% επί ξηρής μάζας. Αυτή η μεγάλη διακύμανση οφείλεται στο είδος του μανιταριού, στο υπόστρωμα καλλιέργειας, στις συνθήκες θερμοκρασίας που επικρατούν στην καλλιέργεια.

Η περιεκτικότητά τους σε λίπη περιορίζεται σε 20 – 30gr/kg δηλαδή (2% έως 6% επί ξηρής μάζας). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα είναι το πολυακόρεστο λινολεικό οξύ, το μονοακόρεστο ολεικό οξύ και το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (Valverde et al., 2015).

Το (5% - 12% επί ξηρής μάζας) καταλαμβάνει η τέφρα δηλαδή περίπου 80 – 120gr/kg. Επίσης τα μανιτάρια περιέχουν βιταμίνες όπως ριβοφλαβίνη, νιασίνη και φυλλικό οξύ όπως και ίχνη βιταμινών C, B1, B12, D, E (Enshay et al., 2013, Stachowiak, 2012).

1.4.1 Υδατάνθρακες

Τα μανιτάρια αποτελούν μια εξαιρετική πηγή υδατανθράκων. Η σύσταση των υδατανθράκων των μανιταριών αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεϊνες που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα και κυμαίνεται μεταξύ 50% - 90%. Κύριοι εκπρόσωποι των μονοσακχαριτών είναι η γλυκόζη, η μανιτόλη και η α-τρεαλόζη. Πολυσακχαρίτες που βρίσκονται σε αφθονία είναι η χιτίνη, α- και β- γλυκάνες και ημικυτταρίνες (π.χ. μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες) (Khan et al., 2012), (Lavelli et al., 2018), (Manzi et al., 2000).

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε πολυσακχαρίτες κυμαίνεται μεταξύ 36 – 60g/100g ξηρού τροφίμου *(Khan et al., 2012).* Οι πολυσακχαρίτες στα μανιτάρια βρίσκονται ως επί το πλείστον με τη μορφή γλυκανών και όχι αμύλου όπως στα περισσότερα λαχανικά *(Enshasy et al., 2013)*. Με διαφορετικούς τύπους γλυκοζιτικών δεσμών όπως για παράδειγμα διακλαδισμένες (1 → 3), (1 → 6) β-γλυκάνες και γραμμικές (1 → 3) α-γλυκάνες *(*Wasser, 2002*).*

Η σύνθεση των πολυσακχαριτών εξαρτάται από την προέλευση, το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης, καθώς και τις συνθήκες καλλιέργειας.

Παρατηρείται χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη και τρεαλόζη, ενώ η συγκέντρωση της μανιτόλης η οποία συμμετέχει στην αύξηση του μανιταριού εμφανίζει αρκετές διακυμάνσεις. Κύριος αποθεματικός πολυσακχαρίτης των μανιταριών θεωρείται το γλυκογόνο σε περιεκτικότητα 5% - 10% επί ξηρού βάρους, ενώ η χιτίνη αντιπροσωπεύει το 80% - 90% της ξηράς ύλης στα κυτταρικά τοιχώματα των μανιταριών (Kalac, 2009)*,* (Synytsya et al., 2008*).* Τέλος, φαίνεται από τη βιβλιογραφία ότι σημαντικό ρόλο στην ποσότητα των διαιτητικών ινών παίζει και το υπόστρωμα ανάπτυξης. Η καλλιέργεια σε υπόστρωμα σίτου και άχυρου φαίνεται να αυξάνει την ποσότητά τους, ενώ υπόστρωμα από υποπροϊόντα ελαιοκομίας εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά διαιτητικών ινών (Lavelli et al., 2018).

1.4.2 Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα των μανιταριών κυμαίνεται μεταξύ 10% - 30% και σε κάποιες περιπτώσεις φτάνει έως το 40% (ξ.β) *(*Valverde et al., 2015*).* Η πρωτεΐνη των μανιταριών παρουσιάζει υψηλότερη βιολογική αξία από την αντίστοιχη ποσότητα που περιέχεται στα λαχανικά. Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι 3,31g/100g νωπού τροφίμου (USDA, 2018*).* Από δημοσιεύσεις που αφορούν στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη τεσσάρων δημοφιλών εδώδιμων μανιταριών (*Agaricus bisporus, Lentinula edodes, Pleurotus* spp*, Volvariella volvacea*) τα οποία καλλιεργούνται σε διάφορες χώρες, φαίνεται ότι η περιεκτικότητα των εδώδιμων μανιταριών σε πρωτεΐνη είναι σε γενικές γραμμές περίπου διπλάσια από λαχανικά όπως τα σπαράγγια και το λάχανο, 4 φορές περισσότερη από τα πορτοκάλια και 12 φορές υψηλότερη από τα μήλα.

Τα μανιτάρια περιέχουν περισσότερη πρωτεΐνη επί ξηρού βάρους σε σχέση με το ρύζι που περιέχει 7,3%, το σιτάρι με 13,2%, τη σόγια με 39,1% και το γάλα με 25,2%. Σε σχέση με την περιεκτικότητα ολικής πρωτεΐνης κατατάσσονται χαμηλότερα από το

κρέας των ζώων, αλλά υψηλότερα από τα περισσότερα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος που είναι και αυτό ζωικής προέλευσης. Αυτό τα καθιστά πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, ειδικά γι' αυτούς που ακολουθούν χορτοφαγική δίαιτα *(Kahn, 2012), (Lavelli et al., 2018).* Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαφέρει ανάλογα με το είδος, το στέλεχος, το στάδιο ωρίμανσης, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του υποστρώματος, τη γενετική δομή των διαφόρων ειδών, το μέγεθος του πίλου και το χρόνο συγκομιδής (Kahn , 2012) (Bano et al., 1988).

1.4.3 Αμινοξέα

Στα μανιτάρια υπάρχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο. Τα σημαντικότερα που συναντάμε στα μανιτάρια είναι η βαλίνη, η λευκίνη, η γλουταμίνη, το ασπαρτικό οξύ και το γλουταμινικό οξύ (Stachowiak, et al., 2012).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα αμινοξέα των μανιταριών χωρίζονται σε 4 κατηγορίες ανάλογα με τη γεύση που προσδίδουν.

Γλυκιά γεύση προσδίδουν: Αλανίνη, γλυκίνη, θρεονίνη, σερίνη

Πικρή γεύση προσδίδουν: (Αργινίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, βαλίνη)

Άγευστα θεωρούνται: (Λυσίνη, τυροσίνη) και

Umani: (ασπαραγινικό οξύ, γλουταμίνη) (Lavelli et al., 2018).

Σημαντικό ρόλο στην πέψη, στην απορρόφηση θρεπτικών ουσιών, στην ενεργειακή ομοιόσταση αλλά και την έκκριση ινσουλίνης διαδραματίζει το γλουταμινικό οξύ (Torii et al., 2013).

Τέλος, τα μανιτάρια περιέχουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και ορνιθίνη τα οποία έχουν νευροδιαβιβαστικές ιδιότητες και λειτουργούν και ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση της αργινίνης (Gyillamon et al., 2011).

1.4.4 Λιποειδή

Η παρουσία λιπαρών οξέων στα μανιτάρια είναι καθοριστική για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν συστατικά των μυκητιακών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν στην αποθήκευση (τριγλυκερίδια) και ως μεμβρανικά συστατικά (φωσφολιποειδή). Η σύσταση αυτών των λιπαρών οξέων εξαρτάται από το υπόστρωμα καλλιέργειας, το διαθέσιμο οξυγόνο και τη θερμοκρασία (Khan et al., 2012, Pedneaylt et al., 2007).

Τα μανιτάρια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα λιποειδών. Η περιεκτικότητα αυτή περιορίζεται σε 20 – 30 gr / kg επί ξηρής μάζας όπου αντιστοιχεί περίπου στο 2% - 6%. Τα λιπαρά οξέα που συναντάμε στα μανιτάρια είναι τρία:

Το πολυακόρεστο λινολεϊκό οξύ (C 18:2), το μονοακόρεστο ολεϊκό οξύ (C 18:1) και το κορεσμένο παλμιτικό οξύ (C 16:0). Φαίνεται ότι δεν υπάρχουν trans – ισομερή των ακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία έχουν κατηγορηθεί για αθηρογένεση και επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα (Stachowiak, et al., 2012).

Το λιπιδικό κλάσμα των μανιταριών περιλαμβάνει ενώσεις από όλες τις τάξεις των λιποειδών όπως ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες, εστέρες στερολών, φωσφολιποειδή, μονό – δι – τριγλικερίδια.

Τέλος ανιχνεύονται σκουαλένιο, εργοστερόλη (ελεύθερη και εστεροποιημένη), ουβικινόνη σε μικρότερες ποσότητες (Bano et al., 1988, Koutrotsios et al., 2017).

1.4.5 Βιταμίνες

Σημαντικό ρόλο στην τελική σύσταση των βιταμινών στα μανιτάρια παίζει το υπόστρωμα αλλά και τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας των μανιταριών όπως και οι συνθήκες συλλογής τους. Η τελική σύσταση επηρεάζεται από τον τρόπο μαγειρέματος. Γενικός κανόνας είναι πως τα μανιτάρια είναι πηγή βιταμινών Ε, Β1, Β12, C, D, φυλλικού οξέως, ριβοφλαβίνης (Β2) και νιασίνης. Η μόνη τροφή φυτικής προέλευσης στην οποία περιέχεται βιταμίνη D είναι τα μανιτάρια. Η βιταμίνη D2 υπάρχει σε αυτοφυή μανιτάρια καθώς τα περισσότερα καλλιεργούμενα μανιτάρια δεν εκτίθενται στο ηλιακό φως, καθώς είναι γνωστό πως απαιτείται υπεριώδης ακτινοβολία για την παραγωγή της συγκεκριμένης βιταμίνης (Stachowiak, et al., 2012).

1.4.6 Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία

Το περιεχόμενο των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων διαφέρει ανάμεσα στα είδη των μανιταριών. Παράγοντες που επίσης επιδρούν στο περιεχόμενο των καλλιεργούμενων μανιταριών είναι το υπόστρωμα ανάπτυξης και η μέθοδος καλλιέργειας. (Khan et al., 2012, Da Silia et al., 2012).

Τα μανιτάρια αποτελούν σημαντικές πηγές μετάλλων και ιχνοστοιχείων. Χαρακτηρίζονται ως απαραίτητες πηγές θρεπτικών υλών για την εκπλήρωση των

καθημερινών μεταβολικών αντιδράσεων του οργανισμού όπως η μετάδοση νευρικών σημάτων, ο σχηματισμός οστίτη ιστού και η ρύθμιση του ισοζυγίου νερού και άλατος, παρ' όλο που ανευρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες (Khan et al., Kalac, 2012).

Τα κυριότερα μέταλλα είναι το Κάλιο (K), Νάτριο (Na), Φώσφορος (P), Ασβέστιο (Ca), Μαγνήσιο (Mg), Μαγγάνιο (Mn), Σίδηρος (Fe), Ψευδάργυρος (Zn) και Χαλκός (Cn).

1.5 Υποστρώματα για την καλλιέργεια των μανιταριών

Τεράστιες ποσότητες φυτικών υπολειμμάτων και αγροβιομηχανικών παραπροϊόντων παραμένουν ανεκμετάλλευτες κάθε χρόνο, προκαλώντας σε πολλές περιπτώσεις, σημαντικά προβλήματα διαχείρισης, ακόμα και ρύπανσης. Στερεά απόβλητα και υποπροϊόντα δημιουργούνται τόσο από τον πρωτογενή τομέα (αγροβιομηχανίες), όσο και από το δευτερογενή τομέα (μεταποιητικές βιομηχανίες, οινοποιία, ελαιουργία, επεξεργασία δημητριακών, ζαχαροκάλαμου, απορριμμάτων χαρτιού, υπολειμμάτων καρύδας κ.ά.) (Akpinar et al., 2013, Philippoussis, 2009). Η βιομετατροπή αυτών των ανεκμετάλλευτων υποπροϊόντων, τα οποία αποτελούν μία άφθονη και ανανεώσιμη πηγή βιομάζας, είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς έτσι παρέχεται η δυνατότητα της περιβαλλοντικής διαχείρισης και ταυτόχρονα η δημιουργία νέων προϊόντων με προστιθέμενη βιολογική αξία (Koutrotsios et al., 2014, Philippou

ssis, 2009).

Το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτικών υπολειμμάτων και αποβλήτων αποτελείται από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, η οποία παράγεται από τη φωτοσύνθεση και αντιπροσωπεύει τον πιο άφθονο και ανανεώσιμο οργανικό πόρο στο έδαφος. Αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη και σε μικρότερες ποσότητες από ανόργανα συστατικά, πρωτεΐνες και πηκτίνη (Dashtban et al., 2009).

Τα κύρια γεωργικά υποπροϊόντα στην Ευρωπαϊκή Ένωση αποτελούν το άχυρο σίτου (wheat straw), όπου η ετήσια παραγωγή είναι περίπου 70 εκατομμύρια τόνοι, το καλαμπόκι, όπου η ετήσια παραγωγή είναι περίπου 11 εκατομμύρια τόνοι, τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων και τα φύλλα ελιάς, με ετήσια παραγωγή περίπου 5 εκατομμύρια τόνους, τα στέμφυλα, με ετήσια παραγωγή περίπου 4 εκατομμύρια τόνους (http://www.internationaloliveoil.org).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση των κυριότερων, από άποψη παραγόμενης ποσότητας, λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.

Πίνακας 1: Σύσταση των κυριότερων, από άποψη παραγόμενης ποσότητας, λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων (Κουτρώτσιος, 2019)

Λιγνοκυτταρινούχο υλικό	Ημικυτταρίνη	Κυτταρίνη	Λιγνίνη	C	N	C/N	Τέφρα	Πηγή
Άχυρο σίτου	21,2–35,5	29–50	5,6–21,0	36,4–46,7	0,40–1,48	48,8–86,0	5,6–11,0	Chandra et al. (2012), Hills and Roberts (1981), Menon and Rao 2012, Saini et al. (2015), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Sánchez (2009), Ward and nee'Nigam (2009)
Άχυρο ρυζιού	17,7–28,6	22,8–47,0	6,4–24,0	33,6–41,8	0,39–1,15	74,2	8,37–17,80	Chandra et al. (2012), Menon and Rao (2012), Obodai et al. (2003), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Richard et al. (1996), and Saini et al. (2015)
Σπάδικες καλαμποκιού	31,9–43,0	28,0–45,6	6,1–17,0	57,1	0,48–1,10	64,2–72,0	1,36–4,80	Anwar et al. (2014), Carneiro et al. (2013), Menon and Rao (2012), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Sánchez (2009), Richard et al. (1996), and Zych (2008)
Στελέχη βαμβακιού	11,0–14,4	31,0-58,5	21,5–30,0	41,23	2,63	15,67	13,3	Ioannidou and Zabaniotou (2007), Menon and Rao (2012), and nee'Nigam et al. (2009)
Κελύφη βαμβακιού	5–22	49–90	4–24	47,37	0,3-1,4	40–59	2,6–8,4	Adenipekun and Dada (2013), Philippoussis (2009), Richard et al. (1996), and Ward and nee'Nigam (2009)
Κελύφη καφέ	15,1–47,5	23,0-36,9	13,0–26,0	50,8	0,9–1,9	40,02–59,40	1,0–6,3	Dzung et al. (2013), Menon and Rao (2012), Philippoussis (2009), and Sánchez (2009)
Υπολείμματα ζαχαροκάλαμου	19,0–37,5	25-45	10–25	65,20	0,2–0,8	120-190	1,5–9	Anwar et al. (2014), Guan et al. (2013), Menon and Rao (2012), nee'Nigam et al. (2009), Philippoussis (2009), Saini et al. (2015), and Sánchez (2009)
Σκληρά ξύλα	22–40	40–55	18–26	45–50	0,1–0,2	150–450	0,2–0,3	Anwar et al. (2014) and Philippoussis (2009)
Μαλακά ξύλα	10,7–35,0	37,5–50,0	25–35	45–50	0,1	310–520	0,4–0,5	Anwar et al. (2014) and Philippoussis (2009)
Αγριόχορτα (ζιζάνια)	13–50	25–40	6,4–30,0	40,8	0,81-3,25	11,8–42,0	4,2–8,5	Hills and Roberts (1981), Menon and Rao (2012), Philippoussis (2009), and Taylor et al. (1989)
Κελύφη ξηρών καρπών	22-30	25–30	30–40	60–62	0,60-0,75	39,2	1,6	Κεφάλαιο 3.1., Menon and Rao (2012), and Sánchez (2009)
Στελέχη ηλίανθου	29,7	42,1	13,44	52,9	1,38	38,3	3	Ioannidou and Zabaniotou (2007) and nee'Nigam et al. (2009)
Κελύφη ηλιόσπορου	24,0–28,6	24,1–49,5	19,0–29,5	42	0,6–0,9	60,0–72,4	3,0–3,3	nee'Nigam et al. (2009) and Philippoussis (2009)
Απόβλητα ελαιοτριβείου δύο φάσεων	6,6	14,54	8,54	49	1,31	37,7	1,4–4,0	Dermeche et al. (2013)a
Φύλλα ελιάς	5,4	8,5	39,8	47,5	1,3	35,9	14,2	Garcia-Maraver et al. (2013)
Φύλλα μπανανιάς	14,8–21,8	13,2–29,5	14–15,7	44,4–47,8	0,94	23–43	14,2	Anwar et al. (2014) and Obodai et al. (2003)
Υπολείμματα κλαδέματος αμπέλου	17.0–21.0	34.0–60.8	20.0–22.9	47.6	1.8	26.44	3.8	Ioannidou and Zabaniotou (2007) and Philippoussis (2009)
Στέμφυλα οινοποιίας	10,3	14,5	17,2	46,1	1,49	31,04	4,65	Bayrak (2013)
Πίτουρο σίτου	35,5–39,2	10,5–14,8	3,0–12,5	60,3	2,02–2,74	29,8	7	Carneiro et al. (2013), Menon and Rao (2012) and Richard et al. (1996)
Άλευρο ρυζιού	11	10,7	3,3	48,3	2,08–2,44	20	8,1–10,0	Nakagawa et al. (2003)
Φλοιός ρυζιού	17,4–29,3	28,0-43,0	18,3-22,5	32,9-44,6	0,30-0,76	32,8–136,0	14,6–21,4	Chandra et al. (2012), Hills and Roberts (1981) and Nakagawa et al. (2003)
Κοπριά πουλερικών	87,8	10,4	1,4–3,4	26,47	4,51–6,87	4,4–13,0	0,4	Bernal et al. (2009), Hills and Roberts (1981) and Richard et al. (1996)

1.6 *Cylocybe cylindracea*

Το είδος *C. cylindracea* γνωστό και ως *Agrocybe cylindracea* ή *Agrocybe aegerita* σχηματίζει εδώδιμα μανιτάρια. Είναι γνωστό για την ευχάριστη γεύση και το έντονο άρωμα. Αναφορές για την παρουσία του *C. cylindracea* έχουμε απ' όλες τις ηπείρους συμπεριλαμβανομένης της Αμερικής όπου θεωρείται σχετικά σπάνιο (Uhart and Alberto, 2007).

Για πρώτη φορά περιγράφεται το 1876 από τον Augustus Pyramis De Candolle με το όνομα *Pholiota cylindracea*. Η μεταφορά του στο γένος *Agrocybe* έγινε το 1938 μετά από πρόταση του Γάλλου μυκητολόγου Rene Charles Joseph Enrest Maire. Το 2014 και βασισμένοι σε αναλύσεις DNA, οι Vissini and Angelini το κατατάσσουν στο γένος *Cyclocybe* ενώ καθιέρωσαν το επιστημονικά αποδεκτό όνομα *Cyclocybe cylindracea*.

Το μέγεθος των καρποφοριών είναι μεσαίο με ευδιάκριτο πίλο (διαμέτρου 3 – 10 cm). Αρχικά ο πίλος είναι ημισφαιρικός ενώ κατά την ωρίμανσή του γίνεται κυρτός έως και επίπεδος με κυματιστή περιφέρεια. Σε υγρό περιβάλλον είναι λείος ενώ σε ξηρές συνθήκες συχνά εμφανίζονται σχισμές (ραγάδες) στην επιφάνειά του.

Το χρώμα ποικίλει από ανοιχτό εκρού στην περιφέρεια έως σκούρο καφέ στο κέντρο του πίλου, το οποίο σκουραίνει κατά την ωρίμανση των μανιταριών. Ο στύπος έχει ύψος (5 – 10 cm μήκος και έως 1,5 cm πλάτος). Ο στύπος είναι σκληρός, εύθραυστος, λευκός έως εκρού χρώματος και σκουραίνει με την ωρίμανση λόγω της απελευθέρωσης των σπορίων. Φέρει μεμβρανώδες, επίμονο, κρεμαστό δακτύλιο με καφέ την πάνω μεριά του. Τα ελάσματα είναι πυκνά, εφαπτόμενα έως ελαφρώς κατερχόμενα, αρχικά υπόλευκου χρώματος (κρεμ), στη συνέχεια ανοιχτό καφέ και καθώς ωριμάζουν τα σπόρια το χρώμα γίνεται σκούρο καφέ. Τα σπόρια του είναι ελλειψοειδή, λεία, σκούρου καφέ χρώματος. Το *C. cylindracea* είναι σαπροφυτικό είδος, το οποίο απαντάται κυρίως σε νεκρό ξύλο δένδρων του γένους *Populus* και σπανιότερα σε δένδρα των γενών *Salix* και *Platanus* (Κουτρώτσιος, 2019).

Τα διαπιστωμένα οφέλη για την υγεία και η υψηλή γαστρονομική του αξία έχουν ωθήσει την έρευνα στη μελέτη των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του, τη βελτίωση των καλλιεργητικών πρακτικών και της εύρεσης εναλλακτικών υποστρωμάτων. Εντατική εμπορική καλλιέργεια παρατηρείται κυρίως στην Κίνα. Στην Ευρώπη, η Ιταλία αποτελεί τη χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή. Για την καλλιέργειά του χρησιμοποιείται αποστειρωμένο ξύλο πλατύφυλλων δένδρων ή αποστειρωμένο άχυρο σίτου. Έχει αναφερθεί και η χρήση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους όπως άχυρο κριθαριού, φλοιούς πορτοκαλιού, μίσχους σταφυλιών, καλάμια, φλοιός ρυζιού, υπολείμματα

ηλίανθου και ξύλα λεύκας ή ιτιάς (Isikhuemhen et al., 2009, Philippousis et al., 2001, Uhart et al., 2007).

Σε ό,τι αφορά τη χρήση υποστρωμάτων που είναι πλούσια σε άζωτο όπως το άχυρο εμπλουτισμένο με αλεύρι σόγιας, χωνεμένη κοπριά πουλερικών ή απόβλητο ελαιοτριβείου δύο φάσεων προέκυψαν πολύ υψηλές τιμές βιολογικής αποδοτικότητας (Isikhuemhen et al., 2009, Uhart et al., 2007, Zervakis et al., 2013). Χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται σε μείγματα ξύλου ιτιάς με άχυρο (Uhart et al., 2007) ή σε άχυρο σίτου εμπλουτισμένο με μικρή ποσότητα άλευρου σίτου (Philippoussis et al., 2001).

Οι επιστήμονες μελετώντας την επίδραση των συστατικών του *C. cylindracea* στην υγεία του ανθρώπου αναφέρουν πως εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντιμεταλλαξιογόνο και αντικαρκινική δράση (Shon and Nam, 2001, Yang et al., 2005, Zhang et al., 2003).

Σε μελέτη αποδεικνύεται η κατασταλτική δράση των μεθανολικών εκχυλισμάτων έναντι της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Τέλος, μελετώντας τους έξωπολυσακχαρίτες που παράγονται κατά την καλλιέργεια του μυκηλίου σε υγρές καλλιέργειες διαπιστώθηκε η δυνατότητα ρύθμισης του σακχαρώδους διαβήτη καθώς είχαν υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικούς αρουραίους (Jong – Wonyum et al., 2001).

Εικόνα 2: Καρποφορία σε πλήρη ανάπτυξη του είδους C. cylindracea ανεπτυγμένη σε υπόστρωματα αποτελούμενα από παραπροιόντα ελαιοκομίας και ελαιουργίας (Κουτρώτσιος, 2019)

Πίνακας 2: Βασική σύσταση μανιταριών *C.cylindracea* που έχουν παραχθεί σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (Κουτρώτσιος, 2019).

Υπόστρωμα	Ολικές πρωτεΐνες	Ολικά λιπίδια	Ινώδη συστατικά	Ολικοί υδατάνθρακες	Τέφρα	K	Na	P	Ενέργεια
AN	22,37 ± 2,10^{a}	2,86 ± 0,28^{a}	12,68 ± 1,68^{a}	62,87 ± 3,50^{bc}	10,71 ± 0,80^{a}	346 ± 2^{d}	86 ± 3^{def}	1210 ± 86^{bc}	371,5 ± 1,18^{a}
BS	18,36 ± 0,87^{abc}	3,42 ± 0,69^{a}	15,05 ± 1,49^{a}	70,26 ± 2,91^{ab}	8,16 ± 1,41^{a}	359 ± 12^{d}	94 ± 1^{cd}	1113 ± 2^{c}	384,5 ± 2,24^{a}
CC	14,76 ± 1,50^{c}	2,87 ± 0,58^{a}	17,02 ± 1,07^{a}	72,42 ± 2,15^{a}	10,11 ± 2,08^{a}	308 ± 12^{de}	85 ± 1^{def}	1343 ± 12^{b}	373,9 ± 6,43^{a}
GM	17,70 ± 1,51^{abc}	2,56 ± 0,45^{a}	12,75 ± 4,06^{a}	70,68 ± 1,50^{ab}	9,25 ± 2,02^{a}	242 ± 4^{f}	74 ± 0^{f}	1576 ± 78^{a}	375,8 ± 6,01^{a}
OL	20,45 ± 0,46^{ab}	2,47 ± 0,36^{a}	12,92 ± 1,24^{a}	68,48 ± 0,76^{ab}	8,83 ± 0,75^{a}	278 ± 5^{ef}	77 ± 1^{ef}	1317 ± 8^{bc}	377,0 ± 3,85^{a}
OS	13,93 ± 2,39^{c}	2,89 ± 0,45^{a}	18,00 ± 1,56^{a}	74,25 ± 3,58^{a}	9,09 ± 0,84^{a}	345 ± 9^{d}	91 ± 0^{cde}	283 ± 12^{e}	378,1 ± 1,12^{a}
PL	17,32 ± 0,13^{abc}	3,70 ± 0,54^{a}	19,38 ± 3,35^{a}	69,28 ± 1,97^{ab}	9,90 ± 1,66^{a}	418 ± 13^{c}	104 ± 3^{bc}	1176 ± 8^{bc}	378,9 ± 5,27^{a}
PN	21,56 ± 1,24^{a}	3,24 ± 0,41^{a}	13,38 ± 2,95^{a}	57,02 ± 3,98^{c}	8,16 ± 1,41^{a}	487 ± 3^{b}	117 ± 6^{ab}	761 ± 18^{d}	371,6 ± 5,75^{a}
WS	15,87 ± 3,32^{bc}	3,82 ± 0,47^{a}	14,63 ± 0,09^{a}	68,56 ± 3,76^{ab}	11,94 ± 0,30^{a}	551 ± 19^{a}	125 ± 5^{a}	1213 ± 43^{bc}	371,3 ± 1,21^{a}

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις 21 ιχνοστοιχείων σε μανιτάρια *C. cylindracea* τα οποία καλλιεργήθηκαν σε επτά διαφορετικά υποστρώματα (Κουτρώτσιος, 2019).

Ιχνοστοιχεία	AN	CC	GM	OL	OS	PL	PN
As	1,95±0,19c^{a}	1,84±0,06^{a}	1,84±0,14^{a}	1,56±0,36^{a}	1,69±0,05^{a}	1,72±0,05^{a}	1,84±0,01^{a}
Be	5,70±2,12^{d}	4,66±0,06^{d}	18,35±4,00^{abc}	23,15±0,01^{ab}	14,14±0,17^{bcd}	27,09±5,55^{a}	7,80±1,70^{cd}
Ca	1076,36±10,26^{a}	562,83±67,78^{b}	686,59±245,72^{ab}	648,36±62,51^{ab}	432,15±62,03^{b}	397,30±9,65^{b}	817,82±90,55^{ab}
Cd	0,33±0,03^{b}	0,41±0,03^{b}	0,35±0,06^{b}	0,34±0,02^{b}	0,34±0,11^{b}	0,33±0,01^{b}	0,66±0,03^{a}
Co	22,67±2,52^{b}	27,33±4,62^{ab}	37,00±3,00^{a}	27,50±2,12^{ab}	25,50±6,36^{ab}	21,00±1,73^{b}	39,67±7,37^{a}
Cr	1,24±0,10^{a}	1,33±0,13^{a}	1,38±0,18^{a}	1,26±0,10^{a}	1,31±0,35^{a}	1,12±0,01^{a}	1,30±0,17^{a}
Cu	24,80±2,31^{b}	19,79±1,77^{b}	25,03±2,73^{b}	34,51±1,93^{a}	26,39±0,59^{b}	19,99±2,12^{b}	33,75±2,89^{a}
Fe	70,25±10,28^{ab}	86,21±4,07^{ab}	64,20±2,24^{ab}	69,90±0,98^{ab}	56,39±9,83^{b}	62,53±1,22^{ab}	119,34±30,51^{a}
Li	1,11±0,08^{ab}	0,49±0,18^{bc}	1,32±0,13^{a}	1,09±0,26^{ab}	1,21±0,16^{ab}	0,46±0,09^{a}	0,95±0,36^{c}
Mg	2388,44±490,61^{a}	1734,73±223,61^{ab}	2276,71±69,48^{a}	1596,16±29,03^{ab}	1212,27±126,09^{b}	1905,72±271,92^{ab}	2070,73±345,85^{ab}
Mn	5,28±0,53^{a}	3,73±0,08^{a}	4,80±0,95^{a}	5,94±1,22^{a}	4,87±0,14^{a}	3,66±0,06^{a}	4,52±0,29^{a}
Mo	0,52±0,27^{a}	0,16±0,07^{a}	0,42±0,03^{a}	0,53±0,24^{a}	0,38±0,15^{a}	0,11±0,05^{a}	0,11±0,04^{a}
Ni	0,42±0,12^{a}	0,49±0,09^{a}	0,63±0,06^{a}	0,79±0,05^{a}	0,73±0,31^{a}	0,58±0,07^{a}	0,67±0,16^{a}
Pb	0,16±0,04^{b}	0,20±0,02^{b}	0,17±0,03^{b}	0,29±0,06^{ab}	0,16±0,04^{b}	0,16±0,02^{b}	0,42±0,13^{a}
Sb*	1,66±0,13^{a}	1,51±0,23^{a}	2,07±0,35^{a}	1,8±0,68^{a}	1,77±0,38^{a}	1,91±0,34^{a}	1,66±0,30^{a}
Se	0,05±0,01^{a}	0,03±0,02^{a}	nd	nd	nd	nd	0,09±0,06^{a}
Sr	3,90±0,08^{a}	2,26±0,25^{a}	2,18±0,17^{a}	2,08±1,00^{a}	1,48±0,23^{a}	1,38±0,10^{a}	3,69±1,41^{a}
Ti	35,21±2,28^{a}	24,98±6,80^{ab}	28,35±3,65^{ab}	28,97±0,47^{ab}	19,13±1,95^{b}	30,51±3,80^{a}	30,75±3,57^{a}
Tl*	5,50±0,10^{a}	6,37±0,31^{a}	6,83±0,31^{a}	8,50±0,14^{a}	6,10±0,57^{a}	8,53±2,63^{a}	6,67±0,23^{a}
V	1,65±0,06^{a}	1,65±0,06^{a}	1,58±0,07^{ab}	1,52±0,04^{ab}	1,47±0,03^{b}	1,49±0,03^{ab}	1,51±0,02^{ab}
Zn	101,39±1,20^{a}	53,51±0,42^{d}	76,95±10,07^{bc}	75,09±4,24^{bcd}	56,82±12,16^{cd}	73,33±1,78^{cd}	97,20±4,34^{ab}

1.7 Μανιτάρια στον Ελλαδικό χώρο

Σε όλο τον Ελλαδικό χώρο, παρατηρούμε ποικιλομορφία εδαφοκλιματικών περιβαλλοντικών και οικολογικών συνθηκών οι οποίες δημιουργούν πλήθος διαφορετικών βιότοπων, ιδανικών για την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού μυκήτων.

Στον Ελλαδικό χώρο έχουν καταγραφεί περί τα 2800 είδη (Polemis and Zervakis, 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος

2.2 Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Ξενιστής

2.3 Λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου – SCFA

2.4 Διαιτητικές ίνες

2.5 Πρεβιοτικά

2.6 Πρεβιοτικά και ξενιστής

2.7 Οφέλη για την υγεία – Ευεργετικές δράσεις

2.8 Ινουλίνη ως πρεβιοτικό

2.9 Β-γλυκάνες (Ευεργετικά αποτελέσματα – Πρεβιοτική δράση)

2.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος

Το έντερο του ανθρώπου αποτελεί το φυσικό περιβάλλον ενός πολύπλοκου μικροβιακού οικοσυστήματος (Alonso and Guarner, 2013). Το σύνολο των μικροβιακών πληθυσμών οι οποίοι εποικίζουν το έντερο χαρακτηρίζεται ως εντερικός μικροβιόκοσμος (Jandhyala et al., 2015). Στον εντερικό μικροβιόκοσμο συναντάμε διάφορα γένη συμβιωτικών μικροοργανισμών οι οποίοι καθορίζοντα από διαδικασίες επιλογής και ανταγωνισμού (Angelakis et al,2012), (Shen et al., 2012). Οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου και εμπλέκονται σε διάφορους μηχανισμούς του μεταβολισμού (Xu and Knight, 2015). Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή. Οι μικροοργανισμοί επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (Xu and Knight, 2015).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος θεωρείται πως λειτουργεί ως ένα ανεξάρτητο μεταβολικό όργανο καθώς τα μέλη του πραγματοποιούν μια σειρά από βιολογικές λειτουργίες, σημαντικές για την ομοιόσταση του ανθρώπου (Jeffery and O' Toole, 2013). Ο ξενιστής παρέχει στους μικροοργανισμούς το κατάλληλο περιβάλλον αλλά και τα θρεπτικά συστατικά ενώ ταυτόχρονα οφελείται από τις υπηρεσίες τους καθώς οι μικροοργανισμοί συνεισφέρουν σε μεταβολικές, ανοσολογικές και τροφικές λειτουργίες (Alonso and Guarner,2013). Οι λειτουργίες που αποδίδονται στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο είναι ο κατοβολισμός των άπεπτων φυτικών ινών, ο μεταβολισμός των χολικών αλάτων, η σύνθεση βιταμινών και κυρίως της βιταμίνης Κ και B_{12}, ο καταβολισμός λιπαρών οξέων, η ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων, καθώς και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού (Μεντής, 2013).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα στο συγκεκριμένο τομέα είναι έντονη. Η θεαματική πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχισης του γενετικού υλικού έχει σημαντικά συμβάλλει στην προσπάθεια αυτή. Έτσι καθίσταται εφικτός ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του εντερικού μικροβιόκοσμου, η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροβίων, αλλά και του ρόλου του εντερικού μικροβιόκοσμου στη διατήρηση ή την απορρύθμιση της ομοιόστασης στον οργανισμό.

Μεταβολές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου από έναν φυσιολογικό φαινότυπο (κατάσταση δυσβίωσης) επιφέρει μεταβολή και στη σχέση μεταξύ του ξενιστή και του εντερικού μικροβιόκοσμου με αποτέλεσμα την πρόκληση νοσημάτων όπως η παχυσαρκία, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (ελκώδης κολίτιδα, νόσος Crohn κ.ά.), ορθοκολικός καρκίνος, αλλεργίες, διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και νευρικές διαταραχές (Μεντής, 2013, Quince et al., 2015, Karimi et al., 2015).

Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαφέρει μεταξύ των ανθρώπων. Περίπου 600.000 μικροβιακά γονίδια πιστεύεται ότι εκφράζονται στο οικοσύστημα αυτό. (Virginia et al., 2013). Οι μικροοργανισμοί που είναι προαιρετικά αερόβιοι κατοικούν κοντά στα τοιχώματα του εντέρου, ενώ οι αναερόβιοι προτιμούν τον αυλό του εντέρου (Ravcheev and Thiele, 2014). Η πλειονότητα των μικροοργανισμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι βακτηριακής προέλευσης. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν επίσης μύκητες, ζύμες, ιοί, αρχαία και πρωτόζωα. (Jandhyala et al., 2015).

Οι βακτηριακοί πληθυσμοί στην πλειοψηφία τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες, τους εντερότυπους, που καθορίζονται από την παρουσία ενός βακτηριακού γένους : *a) Bacteroides, b) Prevotella, c) Ruminococcus* και υπάρχει συσχέτιση της κάθε ομάδας με συγκεκριμένους διαιτητικούς παράγονες (Μεντής, 2015).

Από τα γνωστά βακτηριακά Φύλα φαίνεται ότι επικρατούν κυρίως δύο, τα Firmicutes (gram +) και τα Bacteroidetes (gram -). Επίσης ανιχνεύονται και τα Actinobacteria ενώ τα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, βρίσκονται σε μικρότερη αναλογία. (Vrieze et al., 2010).

Το μεγαλύτερο φύλο όπου αριθμεί πάνω από 200 γένη είναι το Firmicutes. Γένη όπως *Lactobacillus, Mycoplasma, Bacillus και Clostridium* ανήκουν στο φύλο *Firmicutes* (Vrieze et al., 2010).

Ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηριακών κυττάρων εντοπίζεται στο παχύ έντερο και ως εκ τούτου το ανθρώπινο μικροβίωμα καθίσταται πυκνότερο και πολυπλοκότερο στη συγκεκριμένη περιοχή. Οι εκτιμήσεις αναφέρουν ότι το παχύ έντερο φιλοξενεί μικροβιακά κύτταρα της τάξης του 10^{14} (Alonso and Guarner,2013).

Οι κύριες λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι να προστατεύουν το έντερο από τους παθογόνους μικροοργανισμούς, να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, να ρυθμίζουν την κινητικότητα του εντέρου και να συμβάλλουν στο μεταβολισμό (Ianiro et al., 2014). Το 80% της παραγωγής των αντισωμάτων λαμβάνει χώρα τοπικά στο έντερο παρέχοντας κυρίως ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) (Alonso and Guarner,2013).

Κάποιοι από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι οι εξής:

α) Το γένος *Bacteroides* περιλαμβάνει βάκιλους υποχρεωτικά αναερόβιους, *Gram (-),* οι οποίοι δεν παράγουν ενδοσπόρια, διαθέτουν την ικανότητα ζύμωσης σακχάρων κυρίως προς οξικό και ηλεκτρικό οξύ.

Είναι κυρίαρχα βακτήρια του παχέος εντέρου μαζί με τα βακτήρια που ανήκουν στο φύλο Firmicutes. Αποικίζουν το έντερο από τα πρώτα στάδια της ζωής, καθώς μεταφέρονται στο νεογνό μέσω του φυσιολογικού τοκετού (Madigan, 2012).

β) Το γένος *Bifidobacterium* είναι *Gram (+)* αναερόβια βακτήρια με σχήμα δισχιδούς ή ασύμμετρου βακίλου, δεν σχηματίζουν ενδοσπόριο, ανήκουν στην οικογένεια *Bifidobacteriaceae* και στο φύλο *Actinobacteria* (Bottacini et al., 2014). Οι πληθυσμοί των bifidobacteria είναι ιδιαίτερα αυξημένοι στα νεογνά κατά το θηλασμό (Turroni et al., 2012). Πολλά στελέχη τους έχουν χαρακτηρισθεί ως προβιοτικά και χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής μόνα τους ή σε συνδυασμό με πρεβιοτικά).

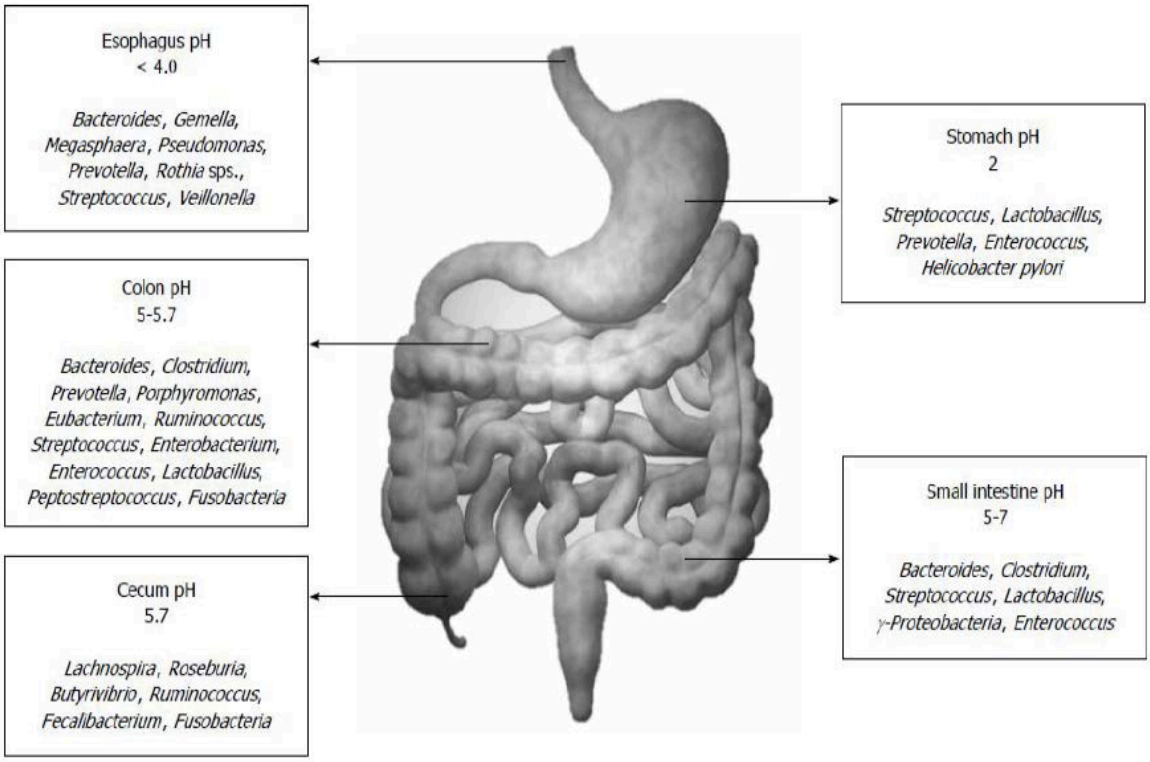
γ) Το γένος *Clostridium Gram (+)* βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι βάκιλοι που εκτελούν ζυμώσεις. Η παραγωγή ενδοσπορίων τους κάνει πιο ανθεκτικούς στη θερμότητα και την ξηρασία *(Madigan, 2012)*. Τους συναντάμε στο επιθήλιο του εντέρου. Κάποια από τα είδη που συναντάμε στο έντερο είναι παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα όπως το *C. difficile* και το *C. perfringens* (Madigan, 2012), (Serikov et al., 2010).

δ) Το γένος *Lactobacillus Gram (+)* βακτήρια, δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια. Είναι ραβδόμορφα βακτήρια, τα περισσότερα ομοζυγωτικά και μερικά ετεροζυγωτκά. Ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια μεταβολίζοντας τις εξόζες για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και αντιστοιχούν σε λιγότερο από 1% του εντερικού μικροβιόκοσμου (Madigan, 2012).

ε) Η οικογένεια *Enterobacteriaceae Gram (-)* μη σπορογίνα, ραβδόμορφα και προαιρετικώς αερόβια. Πιο διαδεδομένο εντεροβακτήριο είναι η *Escherichia coli*, η οποία συμμετέχει στην παραγωγή βιταμινών όπως η βιταμίνη Κ (Agus et al., 2016).

στ) Το γένος *Staphylococcus Gram (+)* βακτήρια, μη σπορογόνα, προαιρετικά αερόβιοι. Το κυριότερο είδος στον άνθρωπο είναι το *A. aureus*, το οποίο σχετίζεται με εξανθήματα, γαστρεντερίτιδα (σταφυλοκοκκική δηλητηρίαση), πνευμονία, μηνιγγίτιδα).

Ζ) Το γένος *Candida* ζύμες οι οποίες κατατάσσονται στους Ασκομύκητες.



Εικόνα 3: Κατανομή των βακτηρίων κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα

(Jandhyala et al., 2015)

2.2 Εντερικός μικροβιόκοσμος και ξενιστής

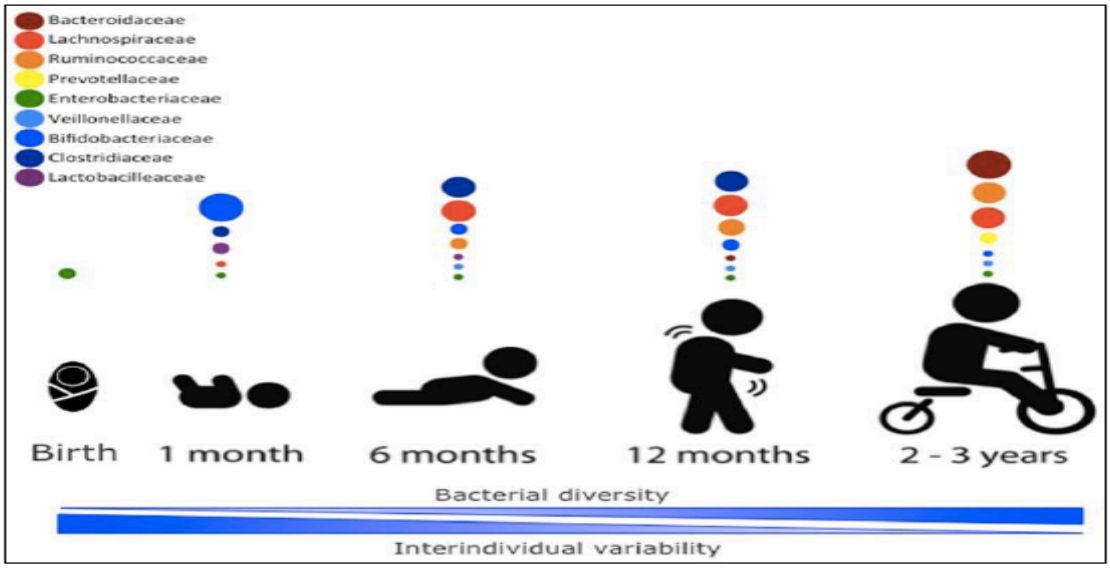
Ο ανθρώπινος οργανισμός προσφέρει στους μικροοργανισμούς το κατάλληλο περιβάλλον και τροφή που τους είναι απαραίτητα για να επιβιώσουν και οι μικροοργανισμοί με τη σειρά τους βοηθούν στη λειτουργία του οργανισμού. Η σχέση των δύο δηλαδή, μικροοργανισμών και ανθρώπινου οργανισμού, ονομάζεται συμβιωτική. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Βοηθάει στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, στη λειτουργία της πέψης, στο μεταβολισμό των φαρμάκων, στην αποτοξίνωση, στην παραγωγή βιταμινών και στην πρόληψη εγκατάστασης παθογόνων βακτηρίων. Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου ωριμάζει κατά την μετεμβρυική ηλικία *(Μεντής, 2013), (Robles et al., 2013).*

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος μεταβάλλεται κατά την πάροδο του χρόνου στα διάφορα στάδια της ηλικίας. Οι κυριότεροι παράγοντες επίδρασης να αναφέρονται η ηλικία, το φύλο, η παρουσία νόσου, η διατροφή, η κατανάλωση αντιβιοτικών και ο γενικός τρόπος ζωής. *(Healey,et al., 2017)*. Το νεογνό κατά τη μεταγεννητική περίοδο, από ένα στείρο μικροβίων περιβάλλον όπως είναι η μήτρα, μεταφέρεται σε ένα περιβάλλον με μικροβιακό φορτίο και αρχίζει σταδιακά η εποίκισή του από μικροοργανισμούς. Υπάρχουν αναφορές για ύπαρξη βακτηρίων στον πλακούντα, με πρόσφατες ενδείξεις να υποστηρίζουν τον εποικισμό του εντερικού αυλού καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης μέσα στη μήτρα της μέλλουσας μητέρας, η οποία μέχρι σήμερα θεωρούταν μικροβιακά στείρο περιβάλλον (Perez-Munoz, et al., 2017). Φαίνεται πως η διαδικασία του τοκετού επηρεάζει την ανάπτυξη του εντερικού μικροβιόκοσμου καθώς το νεογνό έρχεται σε επαφή με τα μικρόβια του γεννητικού σωλήνα της μητέρας ενώ τα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή προσλαμβάνουν κυρίως μικροοργανισμούς από το νοσοκομειακό περιβάλλον. *(Dutton et al., 2012, Healey,et al., 2017*). Η ανάπτυξη του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά τη βρεφική ηλικία θεωρείται ότι συνεισφέρει καταλυτικά στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού και μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην μετέπειτα εμφάνιση ατοπικών, αυτοάνοσων και φλεγμονωδών ασθενειών. *(Healey,et al., 2017)*

Σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαδραματίζει το μητρικό γάλα καθώς οι εκκρίσεις του μαστού περιέχουν αντισώματα IgA, καζεϊνη και λακτοφερίνη, τα οποία θωρακίζουν τα νεογνά.

Ο πρώτος χρόνος ζωής ενός παιδιού είναι ιδιαίτερα σημαντικός ως προς τη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου ενώ μετά το πέρας του χρόνου ο εντερικός μικροβιόκοσμος πλέον μοιάζει περισσότερο με αυτόν των ενηλίκων και διαδραματίζει

ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στην ηλικία των τεσσάρων ετών έχει ωριμάσει πλήρως. Η τελική σύσταση εξαρτάται από τη φυσιολογία του ξενιστή, το γονότυπο, το ιστορικό και το περιβάλλον (Vrieze et al., 2010).



Εικόνα 4 : Στάδια αποικισμού του εντέρου σε βρέφη και παιδιά (Arrieta ,et al., 2014).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ενηλίκων παραμένει σταθερός. Αυτός διαταράσσεται από την 7η δεκαετία και μετά. Οι αναλογίες των *Bifidobacteria, Firmicutes* και *F. prausnitzii* τείνουν να μειώνονται ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση των *E.coli, Proteobacteria* και *Staphylococcus* (Jandhyala et.al., 2015). Η αύξηση αυτών των πληθυσμών συσχετίζεται με την εμφάνιση νοσογόνων καταστάσεων, οι οποίες συνοδεύονται από χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονώδη απόκριση και έκκριση κυτταροκινών, οι οποίες σε συνδυασμό με διατροφικά προβλήματα που παρουσιάζονται συνήθως σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, οδηγούν σε δυσβιωτική κατάσταση του εντερικού αυλού (Keenan et al.,2015). Γενικότερα η γήρανση σχετίζεται με μία αναπόφευκτη χρονοεξαρτώμενη μείωση της φυσιολογικής λειτουργικότητας και ομοιστατικής ικανότητας του ανθρώπινου οργανισμού με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (An et. al., 2018). Η διατήρηση της ομοιόστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη της υγιούς γήρανσης και επομένως η αποκατάσταση αυτής της ομοιόστασης μπορεί να είναι υποστηρικτικό μέσο για την ανθρώπινη μακροζωία (Nagpal, et. al., 2018).

Εικόνα 5: Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο (Μεντής , 2013).

2.3 Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου – SCFA

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA – Short Chain Fatty Acids) είναι τα σημαντικότερα προϊόντα του εντερικού μικροβιόκοσμου και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ξενιστή. Παράγονται από τις ζυμώσεις των άπεπτων συστατικών που πραγματοποιούνται από τους μικροοργανισμούς. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα και αυτά που μελετώνται για τις ευεργετικές τους ιδιότητες είναι κυρίως το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ. Τα βακτήρια του γένους Bifidobacterium μέσω ζύμωσης παράγουν γαλακτικό οξύ, το οποίο στη συνέχει μεταβολίζεται και προκύπτει το βουτυρικό οξύ (Scott et al., 2014), (Slavin et al., 2013). Τη μεγαλύτερη ευεργετική δράση στον οργανισμό φαίνεται να την έχει το βουτυρικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου ως πηγή ενέργειας, ακόμα κι αν υπάρχουν διαθέσιμα η γλυκόζη ή η γλουταμίνη. Τα SCFA μεταβολίζονται στους μύες και στον εγκέφαλο και το προπιονικό οξύ μεταβολίζεται στο ήπαρ, κάτι που συμβάλλει στη μείωση της ηπατικής παραγωγής χοληστερόλης (Slavin et al., 2013), (Tremaroli et al., 2012). Άπεπτοι υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη, οι ξυλάνες, το ανθεκτικό άμυλο, η ινουλίνη, οι β-γλυκάνες, δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ένζυμα του ανθρώπου

και καταλήγουν να αποδομούνται στο κόλον μετά από ζύμωση από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Μέσω αυτής της διαδικασίας έχουμε παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFA) και αύξηση των βακτηριακών πληθυσμών.

Τα οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό από την παραγωγή των λιπαρών οξέων είναι η επούλωση των πληγών, η αγγειοδιαστολή, καθώς και η κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος, η δράση τους ως ρυθμιστές της φλεγμονής, ενώ παράλληλα αποτελούν και πηγή ενέργειας (Tremanoli et al., 2012). Τέλος, συμβάλλον στην ομοιόσταση του ξενιστή μειώνοντας το PH του εντερικού αυλού αποτρέποντας την αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών (Virginia et al., 2013).

2.4 Διαιτητικές Ίνες

Στα μέσα της δεκαετίας του 1970 αναγνωρίστηκαν οι διαιτητικές ίνες ή φυτικές ίνες, ως ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα τελευταία χρόνια και μετά από σειρά μελετών, τεκμηριώθηκε η συνεισφορά των διαιτητικών ινών στην καλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς και στην πρόληψη κάποιων ασθενειών.

Σύμφωνα με τον CODEX Alimentarius οι διαιτητικές ίνες ορίζονται ως πολυμερή υδατανθράκων που απαρτίζονται από 10 ή περισσότερα μονομερή, τα οποία δεν υδρολύονται από ενδογενή ένζυμα στο λεπτό έντερο. Παρ' όλα αυτά, είναι δύσκολο να υπάρξει ένας ενιαίος ορισμός των διαιτητικών ινών, καθώς αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά. Βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα ενός φυτικού κυττάρου, το οποίο περιέχει πάνω από 95% φυτικές ίνες όπως, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνες και πολυσακχαρίτες (Jones, 2014).

Οι διαιτητικές ίνες μπορούν να ομαδοποιηθούν βάσει της διαλυτότητας των ινών στο νερό καθώς κάποιες είναι υδατοδιαλυτές, αλλά κάποιες δεν είναι. Στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών ανήκουν κάποιες ημικυτταρίνες, η πηκτίνη, τα κόμμεα, καθώς και οι β-γλυκάνες, ενώ στις αδιάλυτες ανήκουν η κυτταρίνη, η λιγνίνη και κάποιες ημικυτταρίνες.

Ένας δεύτερος τρόπος ταξινόμησης είναι η ικανότητά τους να υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια του παχέος εντέρου.

Παράγωγα της ζύμωσης των φυτικών ινών είναι, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, το γαλακτικό οξύ, το υδρογόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το μεθάνιο.

Τα πλεονεκτήματα της ζύμωσης των ινών για το γαστρεντερικό σύστημα είναι:

α) Η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος στον αυλό του εντέρου, με αποτέλεσμα τη μείωση του pH του εντέρου,

β) Η αύξηση της απορρόφησης νερού και νατρίου στο κόλον,

γ) Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του βλεννογόνου και τέλος

δ) Η παροχή ενέργειας, καθώς τα SCFAs αποτελούν ενεργειακή πηγή για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου.

Οι διαιτητικές ίνες ταξινομούνται και βάσει της ικανότητάς τους να κατακρατούν νερό και το ιξώδες.

Οι ευεργετικές ιδιότητες των διαιτητικών ινών στον άνθρωπο αποτελούν σημαντικό ερευνητικό τομέα για τις επιστήμες υγείας. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η πρόσληψη διαιτητικών ινών: α) συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ασθενών μέσω της μειωμένης απορρόφησης υδατανθράκων, β) συμβάλλει στη μείωση της χοληστερόλης η οποία συνδέεται με καρδιαγγειακά νοσήματα, γ) οι αδιάλυτες διαιτητικές ίνες συμβάλλουν στην αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών, δ) αποτελούν προστασία έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου, ε) ωφελούν τα άτομα που επιθυμούν να χάσουν βάρος, καθώς παρατηρούμε αύξηση της αίσθησης του κορεσμού (Slavin, 2013), (Fuller, S., et.al., 2016).

2.5 Πρεβιοτικά

Ως πρεβιοτικά ορίστηκαν αρχικά τα μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων τα οποία επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό ή και τη δράση ενός ή περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών του εντέρου, επιφέροντας θετικά αποτελέσματα για την υγεία του ξενιστή (Gibson et al., 1995). Ο ορισμός των πρεβιοτικών τροποποιήθηκε λόγω της μονομερούς εξέτασής τους μέσω της μικροβιακής αλλαγής στο οικοσύστημα του παχέος εντέρου του ανθρώπου. Αυτό που επικράτησε ως πρεβιοτικό μέχρι σήμερα, είναι ένα επιλεκτικά ζυμώσιμο συστατικό, το οποίο επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές στη σύνθεση ή και τη δράση του γαστρεντερικού μικροβιόκοσμου επιφέροντας θετικά αποτελέσματα για την υγεία του ξενιστή (Gibson et al., 2004).

Αποτέλεσμα της πρόσληψης πρεβιοτικών είναι η αύξηση ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων, όπως είναι τα στελέχη των γενών *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia, Faecalibacterium, Roseburia* και *Prevotella* τα οποία παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη για την υγεία του ξενιστή. Παράλληλα καταστέλλεται η ανάπτυξη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη Clostridium και Bacteroides (Yang, et. al., 2020).

Τα πιο αναγνωρισμένα είναι οι φρουκτο – ολιγοσακχαρίτες, η ινουλίνη, οι γαλακτο – ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη, η ραφινόζη, οι αραβυνοξυλάνες (Swanson et. al., 2020). Ορισμένοι σύνθετοι υδατάνθρακες μακράς αλύσου που βρίσκονται σε τρόφιμα, όπως το σιτάρι, η βρώμη, τα μανιτάρια, το σκόρδο, το κρεμμύδι, τα σπαράγγια, η σόγια και η μπανάνα (Mitsou, et. al., 2011), η πατάτα (Baxter, et. al., 2019), η γλυκοπατάτα (Liu et. al., 2020) έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές πηγές πρεβιοτικών.

Οι διαφορετικές επιδράσεις της κάθε ουσίας στους μικροβιακούς πληθυσμούς, καθιστά δύσκολη τη σύγκριση μεταξύ των ουσιών, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ενδεχόμενη πρεβιοτική τους δράση. Αυτό το γεγονός οδήγησε στη δημιουργία ενός εργαλείου ποσοτικοποίησης για την μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης ουσιών *in vitro.*

Η μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης γίνεται χρησιμοποιώντας ένα ποσοτικό εργαλείο που ονομάζεται Πρεβιοτικός Δείκτης (Prebiotic Index [Pi]).

Ο Πρεβιοτικός Δείκτης εμφανίζει θετικό αποτέλεσμα με την αύξηση των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, ενώ αρνητικό αποτέλεσμα με την αύξηση των γενών *Bacteroides* και *Clostridium* (Aida, 2009).

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

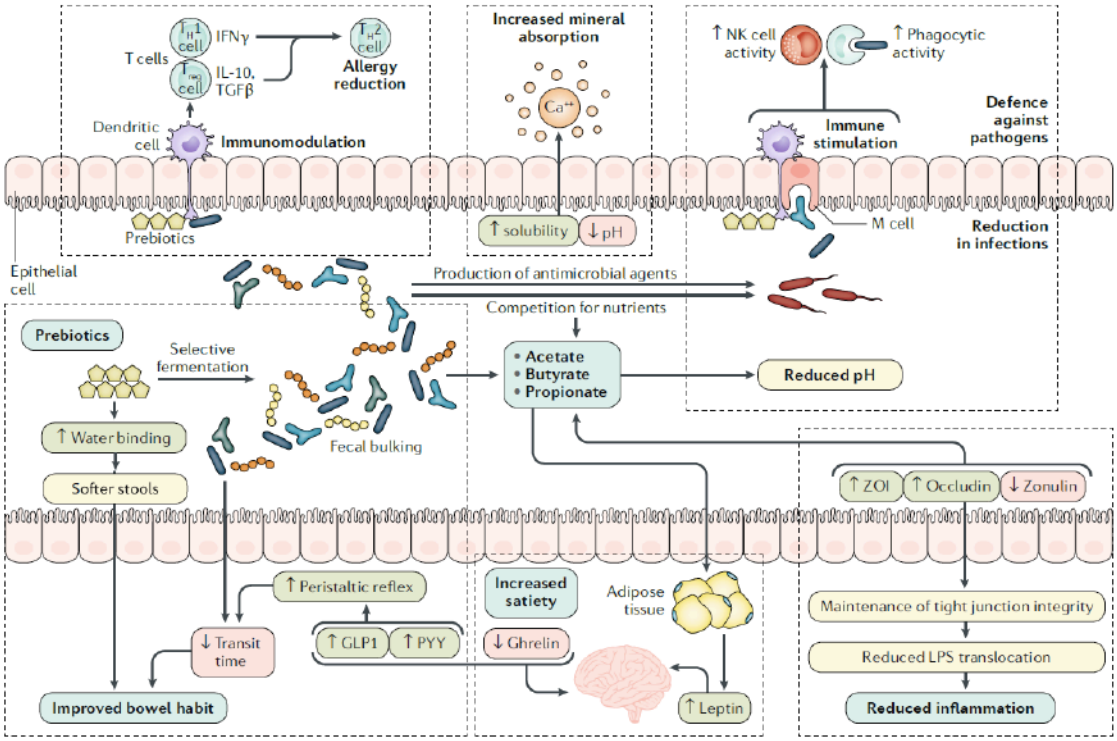
Όπου: *Bif: Bifidobacterium*

Bac: Bacteroides

Lac: Lactobacillus

Clos: Clostridium

Total: Ο συνολικός αριθμός βακτηρίων κατά τη στιγμή του δείγματος



Εικόνα 6 : Ο μηχανισμός δράσης των πρεβιοτικών είναι ο εξής: Έχουμε είσοδο των πρεβιοτικών στο έντερο τα οποία χρησιμοποιούνται εκλεκτικά. Σε αυτό το στάδιο έχουμε αύξηση της βακτηριακής ανάπτυξης και τη λειτουργικότητα συγκεκριμένων γενών ή ειδών βακτηρίων. Ως αποτέλεσμα αυτών, προκύπτουν οφέλη για την υγεία.

GLP1: πεπτίδιο γλυκαγόνης 1, M cell: microfold cell: εξειδικευμένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, NK cell: κύτταρο φυσικός φονιάς, PYY: πεπτίδιο YY, TGFβ: transforming growth factor – β: πολυπεπτίδιο μέλος της οικογένειας των μεταμορφωτικών αυξητικών παραγόντων β των κυτταροκινών , TH1 cell : βοηθητικό κύτταρο τύπου 1 , TH2 cell : βοηθητικό κύτταρο τύπου 2, Treg cell : ρυθμιστικό T κύτταρο , ZO1 : zonula occludens 1 : στενής συνδέσεως πρωτείνη – 1 (Sanders, et al., 2019).

2.6 Πρεβιοτικά και ξενιστής

Μέσω της συστηματικής κατανάλωσης πρεβιοτικών, ο ξενιστής αποκομίζει οφέλη για την υγεία του. Οφέλη που σχετίζονται άμεσα με την εκλεκτική ανάπτυξη ή και ενεργότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου (Roberfroid, 2010).

Πολλοί είναι οι σύνθετοι υδατάνθρακες μακράς αλύσου που περιέχονται σε τρόφιμα που έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές πηγές πρεβιοτικών, όπως είναι τα δημητριακά, τα μανιτάρια, τα βότανα, οι ρίζες ραδικιών, η σόγια και οι πατάτες (Aidaa, 2009).

Τα οφέλη του ξενιστή από την κατανάλωση πρεβιοτικών είναι τα εξής:

α) Βελτίωση ή σταθεροποίηση της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου

β) Βελτίωση της εντερικής λειτουργίας (σταθεροποίηση, τακτικότητα, συνοχή κοπράνων)

γ) Μείωση κινδύνου εντερικών λοιμώξεων

δ) Αύξηση της απορρόφησης μεταλλικών στοιχείων

ε) Βελτίωση υγείας του ερειστικού συστήματος

στ) Ρύθμιση της γαστρεντερικής παραγωγής πεπτιδίων

ζ) Ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας μέσω του μεταβολισμού

η) Ρύθμιση του αισθήματος κορεσμού

θ) Ρύθμιση ανοσολογικών μηχανισμών

ι) Μείωση κινδύνου εμφάνισης παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου και σακχαρώδους διαβήτη τύπου ΙΙ, καρκίνου του εντέρου (Roberfroid, 2010).

Παρ' όλο που η χρήση πρεβιοτικών έχει δείξει γενικά θετικά αποτελέσματα στην υγεία, παραμένουν κάποιες ασάφειες και περιορισμοί σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους. Τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα τα αναμενόμενα και οι επιδράσεις διαρκούν πολλές φορές όσο λαμβάνεται το εν λόγω πρεβιοτικό χωρίς να υπάρχει μακροπρόθεσμη επίδραση (Conlon et al., 2014), (Jayachandran et al., 2017).

Τέλος, καίριο ζήτημα στην όλη δράση των πρεβιοτικών είναι η εύρεση της ιδανικής αναλογίας μικροοργανισμών με πιθανώς θετική επίδραση και η στόχευσή τους ανάμεσα σε άλλους που υπάρχουν στο μικροβιόκοσμο πέραν των ομάδων *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* που μέχρι τώρα αποτελούν τους κλασικούς στόχους πρεβιοτικών παρεμβάσεων (Conlon et al., 2014), (Jayachandran et al., 2017).

2.7 Οφέλη για την υγεία

Τα οφέλη για την υγεία, όπως φαίνεται από εκτεταμένη έρευνα, από την κατανάλωση μανιταριών είναι πολλαπλά. Τα μανιτάρια κατατάσσονται στα λειτουργικά τρόφιμα λόγω των προληπτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων (Khan et al., 2012), (Kalac, 2009).

Οι ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία είναι οι εξής:

α) Ανοσορύθμιση

β) Αποτοξίνωση

γ) Αντικαρκινική δράση: Καταγράφεται σε μελέτες πως η διατροφική πρόσληψη μανιταριών υπό μορφή συμπληρώματος διατροφής βελτιώνει τις συνθήκες και την πρόγνωση ασθενών με καρκίνο λόγω της επίδρασης στα ερυθροκύτταρα και το ανοσοποιητικό. Δράση, η οποία οφείλεται στην παρουσία β-γλυκανών σε συνδυασμό με πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να αποδειχθεί η αντικαρκινική δράση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του αίματος, της λέμφου, του μαστού, της ουροδόχου κύστεως, του προστάτη, του ήπατος, των πνευμόνων και του μυελού των οστών.

Οι μηχανισμού που καταγράφηκαν ήταν οι εξής:

1.- Ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης του οργανισμού

2.- Κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα

3.- Αναστολή της αγγειογένεσης που σχηματίστηκε από τα καρκινικά κύτταρα του όγκου

4.- Αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και της μεταστατικής τους συμπεριφοράς

5.- Απενεργοποίηση καρκινογένεσης μέσω κυτταροπροστασίας

6.- Προστασία σε μολύνσεις και ενίσχυση του ανοσοποιητικού κατά την αποθεραπεία μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία (Feenen et al., 2014), (Schneider et al., 2011), (Chatterjee et al, 2011), (Valverde et al., 2015)

7.-Αντιφλεγμονώδη δράση: Κυρίως λόγω της περιεκτικότητας σε φαινολικούς παράγοντες *(Moro et al., 2012)*

8.-Αναλγητική δράση

9.-Αντιοξειδωτική δράση: Οφείλεται στις βιοδραστικές εργοστερόλες και τις πολυφαινολικές ενώσεις. Δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες δέσμευσης των ελευθέρων ριζών που βρίσκονται στον οργανισμό, εμποδίζοντας την περαιτέρω οξείδωση και καταστροφή των κυττάρων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε δυσχερή αναδόμηση κυττάρων

10.- Αντιδιαβητική δράση

11.- Αντιμικροβιακή δράση

12.- Αντιαλλεργική δράση

13.- Ηπατοπροστατευτική

14.- Καρδιοπροστατευτική δράση: Η κατανάλωση βρώσιμων μανιταριών φαίνεται να είναι ιδανική για την πρόσληψη της αθηροσκλήρυνσης και η διατήρηση ενός υποχοληστερολαιμικού προφίλ, λόγω του χαμηλού λιπιδαιμικού περιεχομένου τους και ταυτόχρονα του αυξημένου περιεχομένου σε φυτικές ίνες (Schneider et al., 2011), (Giullamon et al., 2010)

15.- Ρύθμιση λιπιδαιμικού προφίλ: Υπάρχει πιθανή συσχέτιση των β-γλυκανών με τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα. Της ορμόνης που εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα και δρα στον υποθάλαμο προωθώντας τον έλεγχο της όρεξης και του κορεσμού (Rop et al., 2009)

16.- Πιθανή πρεβιοτική δράση

17.- Καλλυντική χρήση

2.8 Ινουλίνη ως πρεβιοτικό

Μέχρι σήμερα δύο συστατικά έχουν κατοχυρωθεί και μπορούν να χαρακτηρισθούν ως πρεβιοτικά. Το πρώτο είναι οι φρουκτάνες και το δεύτερο οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (Ka – Lung Lam, 2013).

Η ινουλίνη είναι ένας φυσικός υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης που ανήκει στις φρουκτάνες που είναι μία ομάδα υδατανθράκων που δεν πέπτονται στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Η ινουλίνη χρησιμοποιείται από ορισμένα φυτά ως μέσο αποθήκευσης ενέργειας. Συνήθως βρίσκεται στις ρίζες των φυτών. Όταν ένα φυτό συνθέτει και αποθηκεύει ινουλίνη, δεν αποθηκεύει άλλες μορφές υδατανθράκων όπως το άμυλο (Micke et al., 2016), (Roberfroid, 2007).

Η ινουλίνη ανακαλύφθηκε στις αρχές του 19ου αιώνα στο φυτό Inula helenium από το οποίο πήρε το όνομά της (Shoaib et al., 2016). Η σύνθεση της ινουλίνης γίνεται από γραμμικές αλυσίδες αποτελούμενες από μονομερή φρουκτόζης συνδεδεμένα με β (2 ➔1) γλυκοζυτικούς δεσμούς και ένα τελικό μόριο γλυκόζης (Shoaib et al., 2016). Αυτή η δομή την καθιστά άπεπτη σε μεγάλο βαθμό από το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα, καθώς είναι ανθεκτική στην υδρόλυση από τα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπου. Παρ' όλα αυτά ζυμώνεται στο παχύ έντερο όπου η ζύμωση πραγματοποιείται από βακτήρια του παχέος εντέρου. Έτσι θεωρείται διαιτητική ίνα με καθορισμένη πρεβιοτική δράση (Milla et al., 2016). Αυξάνει τα βακτήρια των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Scott et al., 2014), (Noack et al., 2013).

Η ινουλίνη ως πρεβιοτικό αυξάνει επιπλέον και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFA) και συγκεκριμένα του οξικού οξέος ως τελικό προϊόν της ζύμωσης. Μέσω της παραγωγής των SCFA έχουμε και μείωση του pH του εντερικού αυλού κάτι που συνεπάγεται την αναστολή ανάπτυξης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Αποτελεί ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, κάποιες φορές για να βελτιώσει τη γεύση και την υφή και άλλες φορές σαν γλυκαντικό. Τη συναντάμε σε φυτά όπως το κιχώριο (ραδίκι), η αγκινάρα Ιερουσαλήμ, η ντάλια, το γιακον (Yacon), το σπαράγγι, το πράσο, το κρεμμύδι, η μπανάνα, το σκόρδο, το σιτάρι κ.ά. (Shoaib et al., 2016)

Τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου από φρουκτάνες τύπου ινουλίνης περιλαμβάνουν τη θετική επίδραση στην τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου, τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, τις επιδράσεις στο αίσθημα κορεσμού με αποτέλεσμα τη ρύθμιση του σωματικού βάρους, την απορρόφηση των μετάλλων και την υγεία των οστών (Gibson et al., 1995), (Abrams et al., 2005), (Ponell, 2009), (Vogt et al., 2014).

2.9 Β-γλυκάνες (Ευεργετικά αποτελέσματα – Πρεβιοτική δράση)

Οι β-γλυκάνες ανήκουν στο κλάσμα των φυτικών ινών (Lavelli et al., 2018). Οι β-γλυκάνες είναι πολυμερή γλυκόζης που υπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα κάποιων μυκήτων (βασιδιομυκήτων), ζυμών, δημητριακών, βακτηρίων και σε φύκη. *(Zhu et al., 2015)*. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηρίων και μυκήτων όπου συναντάμε β-γλυκάνες είναι τα Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Saccharomyces cerevisiae και Candida albicans (Jayachandran et al., 2018). Οι β-γλυκάνες προέρχονται από το καρποφόρο μέρος των μανιταριών και εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες από αυτές που προέρχονται από τη βρώμη και το κριθάρι (Zhu et al., 2015). Η διακλάδωση, το είδος των δεσμών και το μοριακό βάρος ποικίλουν ανάλογα με την

προέλευσή τους. Οι β-γλυκάνες των μανιταριών έχουν βραχείς β (1, 6) δεσμούς με διακλαδώσεις από τον β (1, 3) σκελετό. Οι β-γλυκάνες της βρώμης και του κριθαριού έχουν γραμμικούς β (1, 4) δεσμούς που διαχωρίζουν τη βραχύτερη αλυσίδα του β (1, 3) σκελετού.

Οι β-γλυκάνες διαφορετικής προέλευσης έχουν κατά συνέπεια, διαφορετικό μοριακό βάρος, διαλυτότητα, πρότυπο διακλάδωσης, με αποτέλεσμα να έχουν συσχετιστεί με διάφορες βιολογικές δράσεις στον άνθρωπο, όπως ογκοκατασταλτική δράση, ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού και μεταβολική ρύθμιση (Zhu et al., 2015), (Hughes et al., 2008).

Η αυξημένη κατανάλωση των β-γλκανών προωθεί την αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης. Ως αποτέλεσμα, οι β-γλυκάνες μπορούν να συμβάλλουν στη θεραπεία του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου ΙΙ. Φαίνεται επίσης, να προωθείται και η δραστικότητα των μακροφάγων, με αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής IL-1, IL-6, IL-8 και IL-10, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή άλλων λευκοκυττάρων, περιλαμβάνοντας μόρια όπως ο υποδοχές της Dectin – 1, η κινάση MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) και μεταγραφικούς παράγονες όπως NF – kB και AP – 1 (Vetvicka et al., 2019), (Ali et al., 2015).

Η κατανάλωση των β-γλυκανών που προέρχονται από μύκητες μειώνουν την ολική χοληστερόλη την LDL χοληστερόλη ,τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ παράλληλα αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στο αίμα. Τα χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης πιθανώς σχετίζονται με την αυξημένη ποσότητα λεπτίνης, η οποία παράγεται από τον λιπώδη ιστό. Αναφέρεται ότι η λεπτίνη παράγεται αποκλειστικά λόγω της συμπληρωματικής χορήγησης β-γλυκανών. Επομένως, οι β-γλυκάνες προωθούν εμμέσως τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ (Rop et al., 2009). Ορισμένες β-γλυκάνες που προέρχονται από βασιδιομύκητες όπως η λεντινάνη (Pentinan), η κρεστίνη (Krestin) και το PSP (πολυσακχαροπεπτίδιο) χρησιμοποιούνται και ως φαρμακευτικά σκευάσματα (Sobieralski et al.., 2012).

Η λεντινάνη παρουσιάζει ανοσορυθμιστικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς φαίνεται να ενισχύει τη δραστηριότητα των δενδριτικών κυττάρων που εμπλέκονται στην αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων (Gupta et al., 2018).

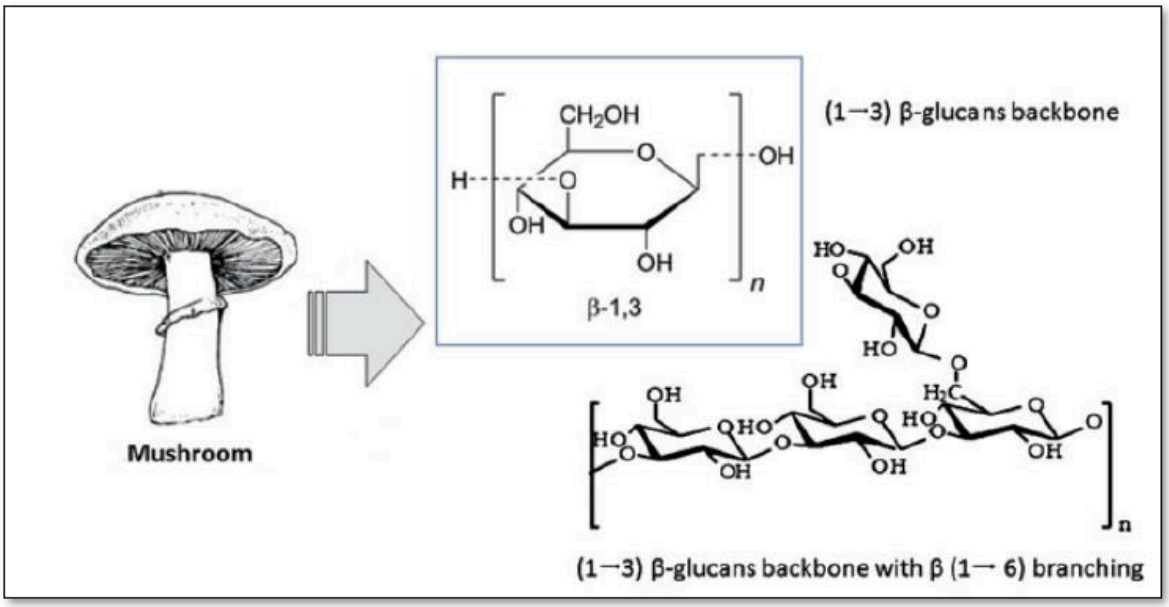
Κάποιες σημαντικές δράσεις των β-γλυκανών είναι αντικαρκινική και ογκοκατασταλτική δράση, μέσω κινητοποίησης κυττάρων του ανοσοποιητικού και συνεργαστική δράση με φυσικά αντισώματα κατά καρκινικών κυττάρων όσο και με μονοκλωνικά αντισώματα σε αντικαρκινικές θεραπείες. Αντιγονοτοξική δράση σε άτομα με ιστορικό πολυπόδων

του εντέρου και χρήση β-γλυκανών προερχόμενων από δημητριακά (Fortin et al., 2018), Malyorenko et al., 2019), (Xu et al., 2017), (Turunen et al., 2016).

Οι β-γλυκάνες κατέχουν μια ισχυρή θέση ως πιθανά πρεβιοτικά, καθώς πληρούν κάποια κριτήρια που χρειάζονται. Ως 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 (SCFA), τα οποία μειώνουν το pH του εντέρου μέσω της ζύμωσης και αυξάνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Turunen et al., 2011). Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση των ευεργετικών μικροοργανισμών όπως στελέχη των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Ka-Lung et al., 2013).

Η προσθήκη β-γλυκανών σε γιαούρτι με προβιοτικούς παράγοντες οδήγησε σε αυξημένη επιβίωση και ζωτικότητα των μπιφιδοβακτηρίων (Vasilijevic et al., 2007).

Οι β-γλυκάνες έχουν προταθεί ως πιθανά πρεβιοτικά συστατικά των τροφίμων. Η έρευνα μέχρι τώρα έχει δείξει ότι οι προϋποθέσεις κατάταξής τους σε συστατικά τροφίμων με πρεβιοτική δράση, πληρούνται. Τέλος, οι β-γλυκάνες έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν τη δομή τους κατά τη μαγειρική παρασκευή των τροφίμων που τις περιέχουν. (Ka-Lung et al., 2013).



Εικόνα 7 : Β- γλυκάνες μανιταριών με γραμμικούς β(1,3) σκελετούς συνδεδεμένοι με από τον β (1,6) πλευρικές αλυσίδες (Phan, et al., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Σκοπός της έρευνας

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 *In vitro* ζύμωση των πιθανών πρεβιοτικών υποστρωμάτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

3.3 Χαρακτηριστικά εθελοντών (Ανθρωπομετρικά – Διατροφικά)

3.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία εμβολίου

3.5 Υποστρώματα που εξετάστηκαν

3.6 Πρωτόκολλο in vitro ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)

3.6.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από δείγμα κοπράνων

3.6.2 Προετοιμασία των δειγμάτων – λύση κυττάρων

3.6.3 Καταβύθιση του DNA

3.6.4 Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)

3.8 Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη

3.9 Στατιστική επεξεργασία

3.11 Χαρακτηριστικά εθελοντών

3.12 Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών

3.13 Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών μετά τη ζύμωση

3.14 Συζήτηση

3.15 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα

3.1 Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της μελέτης είναι η *in vitro* ζύμωση σκόνης λυοφιλιωμένων μανιταριών του *Cyclocybe cylindracea*, μύκητα που θεωρείται πλούσιος σε β-γλυκάνες από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ηλικιωμένων ατόμων (≥65 ετών) και η διερεύνηση της πιθανής πρεβιοτικής δράσης του μανιταριού αυτού.

3.2 Μεθοδολογία

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και πρόκειται για μία εργαστηριακή *in vitro* έρευνα. Η περίοδος που πραγματοποιήθηκε η έρευνα ήταν από 01/2019 έως 07/2019. Για την μελέτη αυτή, αν και δεν χορηγήθηκε κάποιο σκεύασμα στους εθελοντές που πήραν μέρος, υπήρξε άδεια από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (62-03/07/2018).

3.2.1 *In vitro* ζύμωση των πιθανών πρεβιοτικών υποστρωμάτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Για την *in vitro* ζύμωση των λυοφιλιωμένων μανιταριών και της ινουλίνης (πρεβιοτικό) από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Olano-martin et al. (2000) και Rycroft et al. (2001) με μερικές τροποποιήσεις.

Τα υποστρώματα τοποθετούνται σε αναερόβιες συνθήκες σε Βασικό Μέσο της ζύμωσης και στη συνέχεια εμβολιάζονται με φρέσκο εμβόλιο κοπράνων από έναν εθελοντή κάθε φορά. Στη συνέχεια ακολουθεί η ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες σε αναερόβιες συνθήκες στους 37oC για 24 ώρες. Δείγματα για την καταμέτρηση επιλεγμένων μικροβιακών πληθυσμών και των μικροβιακών μεταβολιτών απομακρύνονται στις 0,8 και 24 ώρες

Τα κριτήρια εισαγωγής των εθελοντών στη μελέτη ήταν τα εξής:

- Οι εθελοντές να είναι ηλικίας άνω των 65 ετών και υγιείς.
- Το σωματικό τους βάρος να είναι σταθερό εντός του τελευταίου έτους και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) μεταξύ των τιμών 19,5kg/m^2 και 27,5kg/m^2.
- Να μην παρουσιάζουν νόσους του εντέρου όπως: ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου –Ι.Φ.Ν.Ε.-, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, χρόνια ή οξεία διάρροια, χρόνια δυσκοιλιότητα.
- Να μην έχουν ιστορικό νεφρικής νόσου, ηπατικής νόσου, στεφανιαίας νόσου, καρκίνου, υποθυρεοϊδισμού, υπερπαραθυρεοϊδισμού και αυτοάνοσων νοσημάτων.
- Να μην ακολουθούν ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές, όπως για παράδειγμα, χορτοφαγία.
- Να μην παρουσιάζουν μεταβολή του σωματικού βάρους, όπως για παράδειγμα, απώλεια βάρους τον τελευταίο χρόνο πριν από τη δειγματοληψία.
- Να μην έχει γίνει λήψη αντιβίωσης τους τελευταίους δύο μήνες πριν τη δειγματοληψία.
- Να μην έχει γίνει λήψη συμπληρωμάτων διατροφής που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντέρου, όπως, προβιοτικά, πρεβιοτικά, φυτικές ίνες, τις τελευταίες δύο εβδομάδες πριν τη δειγματοληψία.
- Να μην έχουν παρουσιαστεί επιληπτικές κρίσεις, νοσηλεία για περισσότερες από τέσσερις εβδομάδες και παρουσία λοίμωξης τον τελευταίο μήνα.

3.3 Χαρακτηριστικά εθελοντών (Ανθρωπομετρικά – Διατροφικά)

Με τον κάθε εθελοντή πραγματοποιήθηκε μία δια ζώσης συνέντευξη, ώστε να ενημερωθεί για τη μελέτη και τους στόχους της. Τους ζητήθηκε να υπογράψουν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής. Τους ζητήθηκε να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες και να διατηρήσουν σταθερό σωματικό βάρος.

Οι εθελοντές συμπλήρωσαν τα ερωτηματολόγια της μελέτης, στα οποία περιγράφονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, πληροφορίες ιατρικού περιεχομένου και γαστρεντερικών χαρακτηριστικών.

Στους εθελοντές έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις (σωματικό βάρος, ύψος, Δ.Μ.Σ.), εκτιμήθηκε η σωματική τους δραστηριότητα μέσω της χρησιμοποίησης του ερωτηματολογίου (IPAQ – SF). Από κάθε εθελοντή, την ημέρα της δειγματοληψίας λήφθηκε το σύνολο της πρωινής κένωσης.

Τους δόθηκαν οδηγίες για τον τρόπο συμπλήρωσης του τριήμερου ερωτηματολογίου καταγραφής τροφίμων. Τέλος, έγινε αιμοληψία των εθελοντών στο χώρο του Πανεπιστημίου, ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMCs).

3.4 Δειγματοληψία και προετοιμασία εμβολίου

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης πραγματοποιήθηκε επτά φορές, μία για κάθε εθελοντή. Στους εθελοντές, την ημέρα που πραγματοποιήθηκε η συνάντηση μαζί τους, εκτός από τη συμπλήρωση του ερωτηματολογίου, δόθηκε στον καθένα τους και ένας προζυγισμένος πλαστικός ειδικός συλλέκτης κοπράνων για τη συλλογή και τη μεταφορά του δείγματος κατά την ημέρα της δειγματοληψίας. Το δείγμα, η πλήρης κένωση του κάθε εθελοντή, μεταφέρθηκα στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.) με την απαραίτητη προϋπόθεση η ώρα της κένωσης με την ώρα της άφιξης στο εργαστήριο να μην υπερβαίνει τις 2 ώρες.

Στη συνέχεια, η πλήρης κένωση ζυγίστηκε σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0,1g. Το δείγμα, στη συνέχεια, αναδεύτηκε με το μέσο αραίωσης του εμβολίου των κοπράνων (Phosphate buffered Soline – PBS) σε αναλογία 20% w/v σε pH 7,3 (8,0g/l NaCl, 0,2g/l Kcl, 1,15g/l Na_2HPO_4, 0,2g/l KH_2PO_4), ταχύτητα περίπου 10 – 15 sec και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκε μηχανικά με τη βοήθεια του Stomacher (όργανο που προσομοιάζει τη λειτουργία του στομάχου) (Stomacher, Seward, U.S.A.), ώσπου να καταστεί οπτικά ομοιογενές. Στη συνέχεια, έχουμε τη μεταφορά του σε δοχείο Duhram και τέλος, την εισαγωγή του στον αναερόβιο θάλαμο για περαιτέρω επεξεργασία, ώστε να αποτελέσει το εμβόλιο για τα υποστρώματα που θα ζυμωθούν.

3.5 Υποστρώματα που εξετάστηκαν

Τα υποστρώματα που εξετάστηκαν στην in vitro ζύμωση και αξιολογήθηκαν για πιθανές πρεβιοτικές ιδιότητες, προήλθαν από μανιτάρια του είδους *C. cylindracea*. Ειδικότερα, προέκυψαν από την καλλιέργεια των στελεχών CC2 και CC505 σε υπόστρωμα με βάση το άχυρο σιταριού (wheat straw). Τα στελέχη προέρχονταν από τη συλλογή μυκητιακών στελεχών του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.), στις εγκαταστάσεις του οποίου πραγματοποιήθηκε και η διαδικασία παραγωγής των μανιταριών καθώς και του λυοφιλιωμένου υλικού-σκόνης που τελικά χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Τα στελέχη αυτά είναι πλούσια σε β- γλυκάνες και συγκεκριμένα το στέλεχος CC2 έχει βρεθεί ότι περιέχει 33,2% κ.β. ενώ το στέλεχος CC505, 37,2% κ.β. (Mitsou et al., 2020) Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα και ως θετικός μάρτυρας το βασικό μέσο καλλιέργειας με ινουλίνη 2% w/v ως πηγή άνθρακα, η οποία έχει αναγνωρισμένη πρεβιοτική δράση.

Πίνακας 4: Κωδικοί υποστρωμάτων για την in vitro ζύμωση και μάρτυρες

Περιγραφή	Κωδικός
Αρνητικός Μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας)	NC
Θετικός Μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας με 2% (w/v) ινουλίνη)	INU2
Μανιτάρια *Cyclocybe cylindracea* στέλεχος CC2	CC2WS
Μανιτάρια *Cyclocybe cylindracea* στέλεχος CC505	CC505WS

3.6 Πρωτόκολλο *in vitro* ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες *(Static batch culture fermentations)*

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Olano – Martin et al., 2000 και Rycroft et al., 2001 με μερικές τροποποιήσεις. Η σύσταση του βασικού μέσου καλλιέργειας προσαρμόστηκε κατάλληλα, ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη κυτταροτοξικότητά του, όπως για παράδειγμα, μείωση της συγκέντρωσης αιμίνης και Tween®80, αποφυγή προσθήκης ρεζαζουρίνης (Zhang, et al., 2013).

Η προετοιμασία των απαραίτητων υποστρωμάτων, δηλαδή του διαλύματος PBS (Phosphate – buffered saline), του μέσου αραίωσης του εμβολίου κοπράνων (faecal slurry) και του βασικού μέσου της καλλιέργειας (Basal culture medium) στο οποίο εισέρχεται και αναμιγνύεται η πηγή άνθρακα, πραγματοποιείται μια μέρα πριν την παραλαβή της κένωσης. Έτσι, την προηγούμενη μέρα του πειράματος προετοιμάζονται και προ-αποστειρώνονται τα εξής διαλύματα: Α) **PBS – Phosphate buffered saline** (1,6g/L NaCl, 0,04g/L KCl, 0,23g/L Na_2HPO_4, Ρύθμιση του pH στο 7,3 (Palframan, Gibson and Rastall, 2002).

Β) **Basal culture medium** (για 1 λίτρο βασικού μέσου καλλιέργειας 2g/L peptone water (Merck KGaA Darmstadt, Germany), 2g/L yeast extract (Merck KGaA), 0,1g/L NaCl, 0,04g/L K_2HPO_4, 0,04g/L K_2HPO_4, 0.01g/L $MgSO_4.7H_2O$, 0,01 $CaCl_1.6H_2O$ ή 0,01g/L $CaCl_2.2H_2O$, 2g/L $NaHCO_3$, 0,557g/L cysteine – HCl (Merck KGaA), 0,5g/L bile Salts (Oxgall™, BD and Company, Sparks, MD, USA), 0,005g/L hemin (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες 1M NaOH) (0,005 – 0,02g άλλοι), 0,2ml/L Tween® 80 (Poncreac Quimica SA, Barcelona, Spain), 10ml/L vitamin K1 (10μg/ml) (Fluka, Sigma – Aldrich, Switzerland) ρύθμιση του pH στο 7,0 με 1M HCl (Rycroft et al., 2001).

Σε δοχεία Durham όγκου 100ml μεταφέρονται 72ml του βασικού μέσου καλλιέργειας και τα διαλύματα μαζί με το PBS αποστειρώνονται στους 121^0C για 15min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρεται στον αναερόβιο θάλαμο με χαλαρά καπάκια (BACTPON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB, Cornelius, Oregon) και αφήνεται να προαναχθεί για περίπου 12 ώρες.

Κατά την ημέρα διεξαγωγής του *in vitro* πειράματος ζυγίζονται εντός αποστειρωμένου αλουμινόχαρτου τα λυοφιλιωμένα μανιτάρια (1,44g/ έκαστο) και

η ινουλίνη (1,44g). Έπειτα, όταν φτάσει το δείγμα με την πλήρη κένωση στο εργαστήριο, ζυγίζεται στον εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g, αναδύεται με το μέσο αραίωσης του εμβολίου των κοπράνων και αραιώνεται σε αναλογία 20% w/v. Στη συνέχεια ομογενοποιείται μηχανικά σε ειδικό μηχάνημα (Stomacher, Seward, USA), ώσπου να καταστεί οπτικά ομοιογενές για περίπου 10 sec και μεταφέρεται σε ένα δοχείο Durham και τοποθετείται στον πάγο.

Εντός του αναερόβιου θαλάμου μεταφέρονται τα προζυγισμένα υποστρώματα στα δοχεία Durham, που ήδη περιέχουν το βασικό μέσο καλλιέργειας. Σε ένα από αυτά προστίθεται ο θετικός μάρτυρας, η ινουλίνη, σε αναλογία 2% ενώ σε ένα άλλο δεν προστίθεται πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας). Όλα τα δοχεία εμβολιάζονται ασηπτικά με 10% (v/v) από το εμβόλιο κοπράνων (8ml faecal slurry σε 72ml basal culture medium) και οι στατικές καλλιέργειες (των 80ml) επωάζονται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37° C για 24h (με χαλαρά καπάκια).

Ο εμβολιασμός έγινε στα εξής υποστρώματα:

- **Αρνητικός μάρτυρας (Negative Control)**, χωρίς προσθήκη πηγής άνθρακα, με κωδικό **NC**

- Ινουλίνη, ως θετικός μάρτυρας γνωστός για την πρεβιοτική του δράση (Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 2% (w/v) (1.44g), με κωδικό **INU2**

- Μανιτάρι ***C. cylindracea*** στέλεχος **CC2** σε αναλογία 2% (w/v) (1.44g) με κωδικό **CC2WS**

- Μανιτάρι ***C. cylindracea*** στέλεχος **CC505** σε αναλογία 2% (w/v) (1.44g) με κωδικό **CC505WS**

Στους χρόνους 0h και 24h συλλέγονται τα αντίστοιχα δείγματα 1ml σε αποστειρωμένα eppendorfs των 1.5 ml (Rnase, DNasefree) και απομακρύνονται από τον αναερόβιο θάλαμο παραμένοντας σε πάγο μέχρι το πέρας της διαδικασίας, και φυλάσσονται στους -80^{0} C, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι περαιτέρω μικροβιολογικές αναλύσεις.

3.6.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από δείγμα κοπράνων

Η απομόνωση του ολικού μικροβιακού DNA από τις στατικές καλλιέργειες (1ml) πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου RBB+C (Repeated Bead Beating plus Column) (Yu & Morrison, 2004) , έπειτα από τροποποιήσεις της μεθόδου για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (Salonen et al., 2010). Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα (QIAmp DNA stool mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) και μηχανικής λύσης με τη βοήθεια του οργάνου MiniBead Beater™. Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του δείγματος (DNA) ελέγχονται με φωτομέτρηση στο φωτόμετρο IMPLEN P330 με τη χρήση του προγράμματος για dsDNA (double – stranded DNA)

Όργανα – αντιδραστήρια

- Υδατόλουτρα (95^0 C και στους 70^0 C)
- Screw cup tubes (με σφαιρίδια ζιρκονίου)
- Πιπέτες (1000 μl, 200μl, 20μl, 10μl)
- Θερμόμετρα και ποτήρια ζέσεως
- RNase & DNase free & low retention eppendorfs
- Mini – Beadbeater (BioSpec Products , USA)
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Φυγόκεντρος
- QIAamp- στήλες (QIAmp DNA stool mini kit, Qiagen, Hilden, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο (IMPLEN P330)

3.6.2 Προετοιμασία των δειγμάτων – λύση κυττάρων

- Ξεπαγώνουν τα δείγματα και γίνεται φυγοκέντριση στα 20000 x g στους 4^0 C για 10 min.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται στο θάλαμο νηματικής ροής, αφαιρείται το υπερκείμενο και το μεταφέρουμε σε screw cup tubes των 2ml (με 0,4g σφαιρίδια ζιρκονίου).
- Γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος με 1ml Lysis buffer (500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA, 4% SDS).
- Τοποθετούνται στο Mini – Beadbeater για περίπου 3min (180 sec), με σκοπό να επέλθει η λύση των κυττάρων.
- Πραγματοποιείται επώαση στο υδατόλουτρο για 15min στους 95^0 C και γίνεται ανάδευση ανά 5 λεπτά.
- Γίνεται φυγοκέντριση στα 20000 x g στους 4^0 C για 10 min και μεταφέρεται το υπερκείμενο σε eppendorf των 2ml.
- Προστίθενται 300μl Lysis στα screw cups tubes και τοποθετούνται στο Mini – Beadbeater για περίπου 3min, με σκοπό να επέλθει η λύση των κυττάρων.
- Πραγματοποιείται επανάληψη των παραπάνω βημάτων (4 έως 6) και αφαιρείται το υπερκείμενο.

3.6.3 Καταβύθιση του DNA

- Σε κάθε eppendorf προσθέτουμε 260μl οξικό αμμώνιο, για να καθιζάνουν στα στερεά, πραγματοποιείται καλή ανάδευση και επωάζονται για 5 min στον πάγο.
- Γίνεται φυγοκέντριση στα 16000 x g στους 4^0 C για 10 min.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο από τα eppendorfs και ισομοιράζεται (650μl/έκαστο) σε καινούργια 2 eppendorf των 1,5ml.
- Προστίθενται 650μl ισοπροπανόλης (1:1 όσο το υπερκείμενο) σε κάθε eppendorf, καλή ομογενοποίηση (15sec) και γίνεται επώαση στον πάγο για 30min.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 16000 x g στους 4^0 C για 15 min, αφαιρείται το υπερκείμενο και συνεχίζεται η διαδικασία μόνο με το ίζημα.
- Προστίθεται 1ml αιθανόλης 70%, ώστε να ξεπλυθεί το ίζημα και φυγοκέντριση στα 12000g στους 4^0 C για 2min, αφαιρείται το υπερκείμενο και αφήνεται για στέγνωμα για 30 min.

- Αναδιαλύεται το ίζημα με προσθήκη 100μl απο το TE buffer (tris – EDTA) (για 10ml ➔ VH20=9.88ml , Vtris – HCL 1M = 100μl, VEDTA 0.5M= 20μl) σε κάθε eppendorf και αναμονή για 15 min
- Μετά από αρκετές αναδεύσεις ενοποιούμε τα περιεχόμενα των δύο eppendorf σε 1 τελικό. Η διαδικασία πραγματοποιείται για όλα τα δείγματα.

3.6.4 Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών:

- Προστίθενται 2μl RNAse και γίνεται ήπια ανάδευση των δειγμάτων στον επωαστικό θάλαμο για 15 min στους 37^0 C .
- Γίνεται προσθήκη 15 μl Πρωτεϊνάσης Κ σε έκαστο eppendorf καθώς και 200 μl buffer AL. Καλή ανάδευση για 20 sec και στη συνέχεια τα επωάζουμε για 10 min σε υδατόλουτρο των 70^0 C.
- Γίνεται προσθήκη 200μl αιθανόλης 100%, καλή ανάδευση σε κάθε eppendorf και μεταφέρεται το περιεχόμενο από τα eppendorfs στα columns (QIAamp) και φυγοκεντρούνται στα 20800 x g για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου (25^0 C).
- Μεταφέρεται η στήλη σε νέο collection tube, προστίθενται 500μl AW1 buffer και πραγματοποιείτα φυγοκέντριση στα 20800 x g για 1min στους 25^0C
- Μεταφέρεται η στήλη σε νέο collection tube, προσθέτω 500μl AW2 buffer με ένα tip και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800 x g για 3 min στους 25^0 C.
- Γίνεται φυγοκέντριση για 1 min στα 20800 x g στους 25^0 C για να στεγνώσει η στήλη με ανοιχτά καπάκια και έπειτα προσθέτουμε 200 μl AE buffer και αναμονή για 5 min.
- Φυγοκέντριση πάλι για 1 min στα 20800 x g στους 25^0 C.
- Φωτομέτρηση γίνεται σε κάθε δείγμα (blank → AEbuffer 3 μl) για να διαπιστωθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA στο κάθε δείγμα.
- Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και αποθήκευση των δειγμάτων σε ποσότητες των 40 μl σε eppendorfs low retention 1,7ml στην κατάψυξη -20 και -80^0C. (Yu and Morrison, 2004).

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθιστά δυνατή την ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA, χρησιμοποιώντας για υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA.

Χρησιμοποιούνται επομένως δύο εκκινητές (primers), που καθένας τους είναι συμπληρωματικός μιας συγκεκριμένη αλληλουχία μίας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης και με την αυξομείωση της θερμοκρασίας προκύπτει σαν τελικό αποτέλεσμα η παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας – στόχου, καταλήγοντας έτσι στη λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων *(Kubista et al., 2006).*

Για τη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των μελών του εντερικού μικροβιώματος με τη χρήση ποσοτικής PCR (quantitative PCR) στα δείγματα από τις στατικές καλλιέργειες (1ml), με σκοπό να αναδειχθούν τυχόν διαφοροποιήσεις ανάλογα με το διαφορετικό υπόστρωμα. Έτσι, με την εφαρμογή της ποσοτικής PCR (qPCR) αλλά και την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών, πραγματοποιήθηκε στο ολικό γενωμικό DNA (gDNA) των κοπράνων ο ποσοτικός προσδιορισμός (log_{10}copies/ml) των ολικών βακτηρίων, του γένους *Bifidobacterium*, της ομάδας των λακτοβακίλλων (*Lactobacillus group*, που περιλαμβάνει είδη των γενών *Lactobacillus, Pediococcus, Weissella* και *Leuconostoc*), των θειοαναγωγικών κλοστριδίων (*C. perfringens group*) και του γένους *Bacteroides*, προκειμένου να διερευνηθούν δυνητικές ποσοτικές διαφοροποιήσεις στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και να υπολογιστεί ο πρεβιοτικός δείκτης για το κάθε υπόστρωμα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων εκκινητών (primers), που στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των μικροοργανισμών που στοχεύουμε για την κάθε αντίδραση (όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα), με ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μετρώντας την ένταση του φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) με χρήση του

μίγματος αντιδράσεων KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems), που βασίζεται στην τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green.

Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται:

- 10μl του kit, 0,4μl ή 0,6μl του κάθε εκκινητή
- 0,25μl BSA (Bovine serum Albumin, για αποφυγή της προσκόλλησης του μίγματος στα γυάλινα τριχοειδή)
- 5μl από το DNA – στόχο (αραιώσεις πρότυπου στελέχους ή δείγματα κοπράνων) και ανάλογη ποσότητα PCR – grade ύδατος

Η διαδικασία της PCR συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράσης) στους 95^0C για 3min, την ενίσχυση του προϊόντος (για 45 κύκλους) [αποδιάταξη DNA: 95^0C για 3sec – υβριδισμός εκκινητών στη βέλτιστη θερμοκρασία για 20 sec – επιμήκυνση στους 72^0C για το ελάχιστο χρονικό διάστημα, βάσει του αναμενόμενου προϊόντος], την ανάλυση melting curves για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των προϊόντων ενίσχυσης και την ψύξη του οργάνου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (ενίσχυση του προϊόντος) προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης για την κάθε υπό εξέταση μικροβιακή ομάδα

Πίνακας 5 : Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπο εξέταση μικροοργανισμών.

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria (Universal)	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	466bp	*Bacteroides fragilis* MM44 (ATCC 25285)	Nadkarni *et al.*, 2002
Bacteroides spp.	Bac303F Bfr-Fmrev	GAAGGTCCCCCACATTG CGCKACTTGGCTGGTTCAG	60°C	103bp	*Bacteroides fragilis* MM44 (ATCC 25285)	Ramirez-Farias *et al.*, 2009
Clostridium perfringens group	CPF CPR	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAATCTCCCTTT	55°C	120bp	*Clostridium perfringens* ATCC 13124	Phong *et al.*, 2010
Bifidobacterium spp.	Forward Reverse	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCCAC	58°C	243bp	*Bifidobacterium bifidum* DSM 20456	Rintillä *et al.*, 2004
Lactobacillus group	Forward Reverse	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58°C	341bp	*Lactobacillus gasseri* DSM 20243	Rintillä *et al.*, 2004

Τα βακτήρια ποσοστικοποιήθηκαν για το κάθε δείγμα και υπολογίστηκαν 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 καθώς είναι η μόνη φάση (log-linear phase) όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να φτάσει ένα δείγμα στο δεδομένο επίπεδο φθορισμού (μικρότερο Ct) τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA – στόχου στο αρχικό δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων γίνεται μέσω της χρήσης πρότυπων καμπύλων αναφοράς, όπου καθίσταται δυνατή η γραμμική συσχέτιση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA στον πρότυπο μικροοργανισμό και των αντίστοιχων τιμών Ct. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (10^1 έως 10^7 copies) των κατάλληλων βακτηριακών στελεχών αναφοράς σε κάθε περίπτωση. Οι καμπύλες αναφοράς παράγονται κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται και στο ολικό DNA των κοπράνων.

Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή των καμπύλων αναφοράς επιτυγχάνεται με τη χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), με αποδεκτό εύρος απόδοσης το 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου / ml δείγματος» (log_{10} copies / ml δείγματος).

3.8 Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη

Η πιθανή πρεβιοτική δράση των υποστρωμάτων μετά το πέρας της 24ωρης ζύμωσης θα αξιολογηθεί ποιοτικά βάσει του πρεβιοτικού δείκτη (*Prebiotic Index, PI*), ο οποίος αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό και τη σύγκριση της πρεβιοτικής δράσης *(Olano – Martin et al., 2002)* και υπολογίζεται με την παρακάτω εξίσωση (Palframan et al., 2003):

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

Όπου *Bif* είναι η καταμέτρηση του *Bifidobacterium* spp. στο χρόνο δειγματοληψίας (24h) καταμέτρηση *Bifidobacterium* spp. κατά το αρχικό εμβόλιο (0h), *Bac* είναι η

καταμέτρηση (σε copies/ml) του *Bacteroides* spp. στο χρόνο δειγματοληψίας (24h) καταμέτρηση του *Bacteroides* spp. κατά το αρχικό εμβόλιο (0h), *Lac* είναι η καταμέτρηση του *Lactobacillus group* στο χρόνο δειγματοληψίας (24h) / καταμέτρηση του Lactobacillus group κατά το αρχικό εμβόλιο (0h), *Clos* είναι η καταμέτρηση του *Clostridium perfringens group* στο χρόνο δειγματοληψίας (24h) / καταμέτρηση του *C. perfringens group* κατά το αρχικό εμβόλιο (0h), και Total είναι η καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στο χρόνο δειγματοληψίας (24h) / καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων. Η εξίσωση αξιολογεί την αύξηση των πληθυσμών του *Bifidobacterium* spp. και / ή του *Lactobacillus group* ως θετική επίδραση και την αύξηση των *Bacteroides* και των *Clostridia* ως αρνητική. Η έκφραση αυτή της εξίσωσης του πρεβιοτικού δείκτη, επιτρέπει την κανονικοποίηση των πληθυσμών των μικροοργανισμών σε σχέση με τα αρχικά τους επίπεδα, εξομαλύνοντας έτσι τη φυσιολογική μεταβλητότητα που χαρακτηρίζει την πειραματική διαδικασία της in vitro ζύμωσης (Palframan et al., 2003).

3.9 Στατιστική επεξεργασία

Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα που εξετάστηκαν (μάρτυρες και μανιτάρια) βασίστηκε στις μέσες τιμές ή στις διαμέσους των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S γονιδίου / ml δείγματος (log_{10}copies/ml δείγματος), ενώ ο υπολογισμός των πρεβιοτικών δεικτών βασίζεται στον αριθμό των αντιγράφων του 16S γονιδίου / ml δείγματος (copies / ml δείγματος). Ο έλεγχος κανονικότητας πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov. Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων για τις χρονικές στιγμές 0h και 24h πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο one-way ANOVA και τον έλεγχο ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated – Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity) στην περίπτωση της παραμετρικής ανάλυσης, καθώς και με τους ελέγχους Kruskal – Wallis και Friedman test (Repeated – Measures ANOVA on Ranks) στην περίπτωση της μη – παραμετρικής ανάλυσης. Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο t για εξαρτημένα δείγματα (paired – samples T test) ή τον έλεγχο Wilcoxon signed – rank test για μη παραμετρικές μεταβλητές. Ο πρεβιοτικός δείκτης για το σύνολο των εθελοντών υπολογίστηκε τον έλεγχο Kruskal – Wallis και Mann – Whitney για τις συγκρίσεις σε ζεύγη. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Stata 15.1 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών

4.2 Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών

4.3 Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών μετά τη ζύμωση

4.4 Συζήτηση

4.5 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα

4.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών

Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν ήταν τέσσερις γυναίκες και τρεις άνδρες, ηλικίας από 66 έως 81 ετών (μ.ο. 74,2), με Β.Μ.Ι. από 21,80kg/m^2 έως 30,25kg/m^2 (μ.ο. 25,48kg/m^2) και σωματικό βάρος από 61kg έως 80kg (μ.ο. 67,5kg). Η ημερήσια πρόσληψη θερμίδων ήταν από 745,65kcal έως 2.206,91kcal (μ.ο. 1.434,47kcal).

Πίνακας 6 : Γενικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ		
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	**ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ**
ΗΛΙΚΙΑ	74,28	5,87
ΥΨΟΣ (m)	1,63	0,09
ΒΑΡΟΣ (kg)	67,5	7,45
BMI (kg/m2)	25,48	3,24
ΧΡΟΝΙΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ	15,28	5,08

Πίνακας 7 : Διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης

ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ		
Μέση πρόσληψη σε:	**ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ**	**ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ**
Ενέργεια (kcal/day)	1434,47	425,81
Υδατάνθρακες (g/day)	155,42	49,11
Πρωτείνες (g/day)	70,25	22,52
Λιπαρά (g/day)	58,61	19,72
Κορεσμένα λιπαρά (g/day)	21,22	9,71
Μονοακόρεστα λιπαρά (g/day)	24,47	8,70
Πολυακόρεστα λιπαρά (g/day)	7,50	2,34
Σάκχαρα (g/day)	64,02	31,37
Φυτικές ίνες (g/day)	15,14	11,05
Αλκοόλ (g/day)	4,96	6,61
Χοληστερόλη (mg/day)	239,45	85,90
Βιταμίνη D (μg/day)	3,69	3,78
Ασβέστιο (mg/day)	816,56	255,56

Πίνακας 8 : Χαρακτηριστικά Φυσικής Δραστηριότητας των εθελοντών της μελέτης

ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ		
	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	**ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ**
Συνολική Φυσική Δραστηριότητα (MET min/week)	1243,35	931,53
Υψηλή Φυσική Δραστηριότητα (MET min/week)	165,71	320,35
Μέτρια Φυσική Δραστηριότητα (MET min/week)	420,0	412,95
Περπάτημα (MET min/week)	657,64	936,50
Ώρες καθιστικής ζωής (h/week)	35,00	15,12

4.2 Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών

Ο προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών στα υπό μελέτη δείγματα στην αρχή (t=0h) και μετά από 24h ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ποσοτικής PCR (qPCR). Μέσω αυτής της μεθόδου μας δίνεται η δυνατότητα να προσδιορίσουμε την επίδραση του *C. cylindracea* στους διάφορους εντερικούς βακτηριακούς πληθυσμούς που μελετώνται. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως, μέση τιμή ή διάμεσος των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S rDNA γονιδίου /ml δείγματος (log_{10} copies/ml δείγματος) (**Πίνακας 9, Πίνακας 10**).

Στην αρχή της *in vitro* ζύμωσης (t=0h) (**Πίνακας 9**) παρατηρούμε σημαντικά μικρότερο πληθυσμό των ολικών βακτηρίων στο υπόστρωμα με το μανιτάρι (CC2WS) σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC , *p*=0,013) αλλά και με τον θετικό μάρτυρα (INU2 , *p*=0,006). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρούμε και στην ομάδα του *C. perfringens* για την αρχή της ζύμωσης (t=0h) όπου στο υπόστρωμα με το μανιτάρι (CC2WS) ο πληθυσμός είναι σημαντικά μικρότερος συγκρινόμενος με τον αρνητικό μάρτυρα (NC , *p*=0,005) αλλά και με τον θετικό μάρτυρα (INU2 , *p*=0,003). Αντιστοίχως ο πληθυσμός του *Roseburia* spp – *Eubacterium rectale* στο υπόστρωμα με το μανιτάρι (CC2WS) είναι σημαντικά μικρότερος στην αρχή της ζύμωσης (t=0h), συγκρινόμενος με τον αρνητικό μάρτυρα (NC , *p*=0,030) αλλά και με τον θετικό μάρτυρα (INU2 , *p*=0,017). Για το αρχικό στάδιο της ζύμωσης (t=0h) παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα των

υπόλοιπων μικροοργανισμών στα μανιτάρια συγκρινόμενα με τον αρνητικό και τον θετικό μάρτυρα εξαιρουμένων των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log10copies/ml) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά την αρχή της *in vitro* ζύμωσης (t=0h)

	Αρχή ζύμωσης (t=0)						
	Total bacteria	Lactobacillus group	Bifidobacterium spp.	Bacteroides spp	Clostridium Perfringens group	Roseburia spp-Eubacterium rectale	Faecalibacterium prausnitzii
NC	10.09 ± 0.15	6.11 (5.82 – 7.05)	8.68 (7.10 – 9.03)	9.52 ± 0.26	6.52 (6.32 – 6.76)	8.46 ± 0.31	8.78 ± 0.33
INU2	10.17 ± 0.2	6.14 (5.82 – 7.01)	8.68 (7.01 – 9.03)	9.60 ± 0.23	6.47 (6.44 – 6.80)	8.47 ± 0.27	8.80 ± 0.29
CC2WS	9.85 ± 0.15 [a,b]	5.92 (5.43 – 6.60)	8.36 (7.06 – 8.92)	9.32 ± 0.27	5.83 (5.22 – 6.12)[a,b]	8.08 ± 0.25 [a,b]	8.53 ± 0.25
CC505WS	10.00 ± 0.17	5.98 (5.61 – 6.98)	8.53 (7.26 – 9.06)	9.47 ± 0.30	6.12 (5.66 – 6.49)	8.33 ± 0.23	8.72 ± 0.27
P overall	0.013	0.760	0.929	0.278	0.003	0.047	0.315

Οι τιμές εκφράζονται ως M.O ± Τυπική Απόκλιση για τα παραμετρικά ή ως διάμεσος (1^{ο} και 3^{ο} τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικά

[a]. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p< 0.05$) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) τη δεδομένη χρονική στιγμή (t=0) ή (t=24). (One Way Anova ή Kruskal-Wallis test)

[b]. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p< 0.05$) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (INU2) τη δεδομένη χρονική στιγμή (t=0) ή (t=24). (One Way Anova ή Kruskal-Wallis test)

[*]. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p< 0.05$) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon)

Μετά τις 24 ώρες της *in vitro* ζύμωσης (t=24h) παρατηρείται σημαντική τροποποίηση στους μικροβιακούς πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων συνολικά (*p-overall= 0,028*) (**Πίνακας 10**).

Τα ολικά βακτήρια μειώνονται σημαντικά στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (*p*=0,011). Επίσης είναι και σημαντικά υψηλότερα στην ινουλίνη (θετικό μάρτυρα), σε σχέση με τον αρνητικό (INU2 , *p*=0,017). Ο πληθυσμός των ολικών βακτηρίων στην περίπτωση των μανιταριών (CC2WS και CC505WS) αυξήθηκε σημαντικά μετά από τις 24 ώρες ζύμωσης σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα (*p*=0,002 και p= 0,022 αντίστοιχα), ενώ σε ότι αφορά το υπόστρωμα CC505WS τα ολικά βακτήρια είναι σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) στις 24 ώρες ζύμωσης (*p*=0,024) (**Πίνακας 10, Γράφημα 1**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log10copies/ml) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από 24 ώρες *in vitro* ζύμωσης (t=24h)

24 ώρες ζύμωσης (t=24)

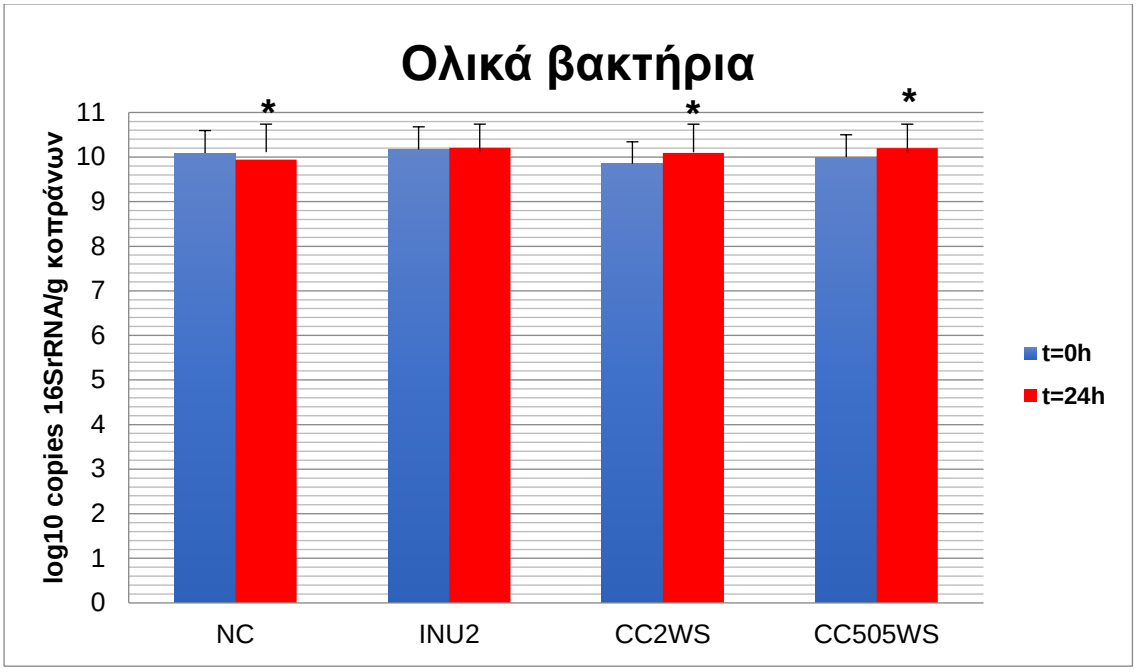
	Total bacteria	Lactobacillus group	Bifidobacterium spp.	Bacteroides spp	Clostridium Perfringens group	Roseburia spp-Eubacterium rectale	Faecalibacterium prausnitzii
NC	9.94 ± 0.22 *b	5.88 (5.64 – 7.04)b	8.64 (7.02 – 9.24)	9.05 ± 0.40*b	6.26 (6.02 – 6.73)	7.74 ± 0.67*	8.20 ± 0.40*b
INU2	10.21 ± 0.11a	7.59 (6.90 – 9.12)*a	9.77 (7.61 – 9.94)*	9.71 ± 0.21a	6.38 (6.18 – 6.58)	8.05 ± 0.46*	8.89 ± 0.34*a
CC2WS	10.09 ± 0.20*	6.23 (5.87 – 9.14)*	9.38 (7.64 – 9.88)*	8.87 ± 0.45*b	6.37 (5.67 – 6.52)*	7.79 ± 0.30*	8.73 ± 0.29*a
CC505WS	10.20 ± 0.14*a	6.27 (5.75 – 9.22)	9.69 (7.84 – 9.83)*	9.07 ± 0.52*b	6.40 (5.92 – 6.62)	8.08 ± 0.18	8.99 ± 0.23*a
P overall	0.028	0.193	0.195	0.005	0.923	0.391	0.001

Οι τιμές εκφράζονται ως M.O ± Τυπική Απόκλιση για τα παραμετρικά ή ως διάμεσος (1ο και 3ο τεταρτημόριο) για τα μη παραμετρικά

a. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) τη δεδομένη χρονική στιγμή (t=0) ή (t=24). (One Way Anova ή Kruskal-Wallis test)

b. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (INU2) τη δεδομένη χρονική στιγμή (t=0) ή (t=24). (One Way Anova ή Kruskal-Wallis test)

*. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon)

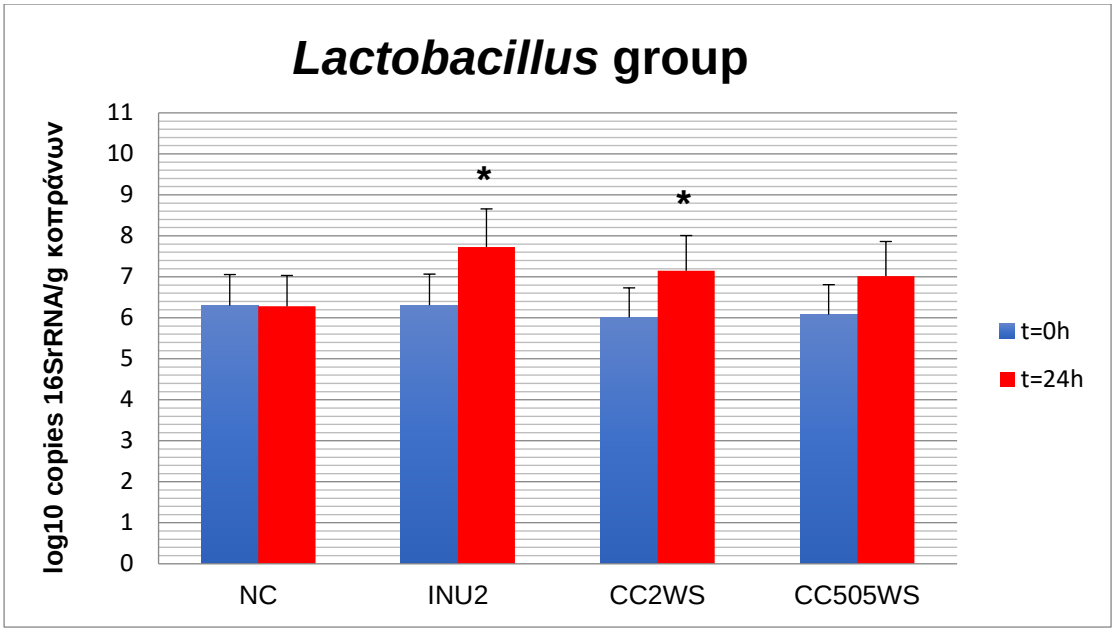


Γράφημα 1: Επίπεδα των ολικών βακτηρίων, των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά από 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως M.O ± Τυπική Απόκλιση

*. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

Στατιστικά σημαντικές διαφορές συναντάμε και στους λακτοβακίλλους.

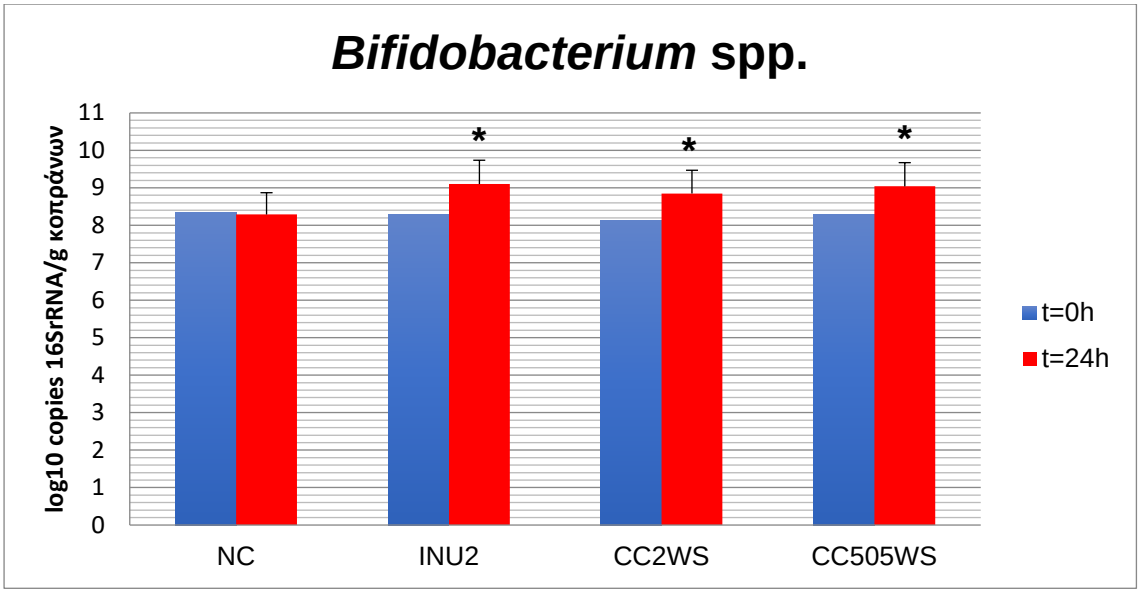
(**Πίνακας 10**). Στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα (INU2) παρατηρούμε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα λακτοβακίλλων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) μετά από 24 ώρες ζύμωσης *(p*=0,025*)* ενώ διαπιστώθηκε και αύξηση των επιπέδων σε σχέση με τις αρχικές τιμές (*p*=0,009). Επιπλέον, διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων λακτοβακίλλων σε σχέση με τις αρχικές τιμές στο υπόστρωμα CC2WS (p=0,035) ενώ στο CC505WS παρατηρήθηκε τάση για αύξηση (*p*=0,063) (**Γράφημα 2**).



Γράφημα 2: Επίπεδα της ομάδας του *Lactobacillus,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά από 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική Απόκλιση

***.** Στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

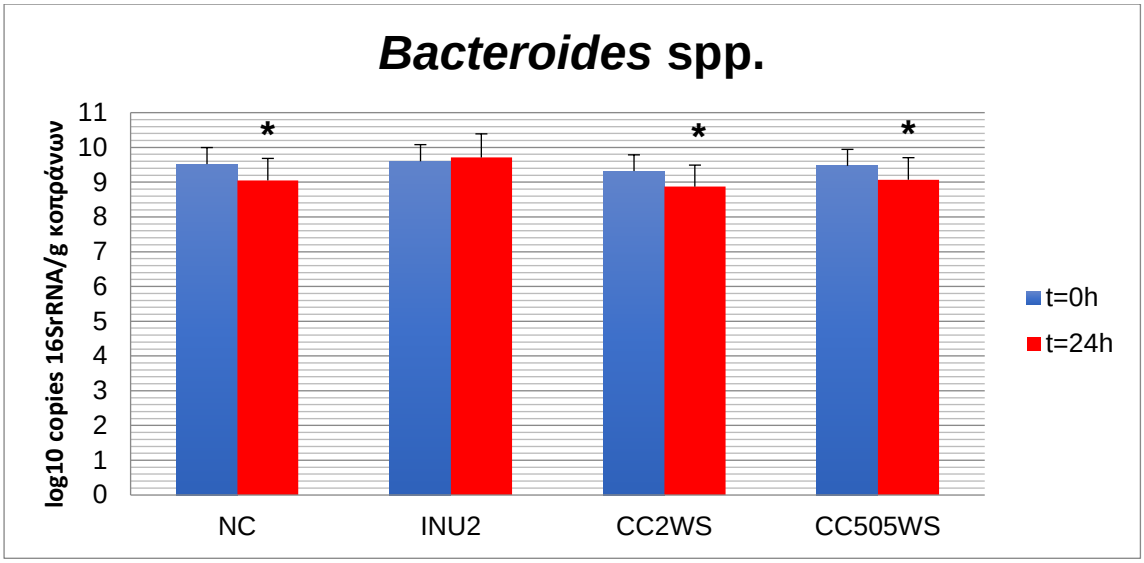
Σε ότι αφορά τον πληθυσμό των *Bifidobacterium* spp., παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των αρχικών επιπέδων μετά από 24 ώρες ζύμωσης στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα (INU2 , *p*=0,028), αλλά και των δύο υπό μελέτη μανιταριών (CC2WS , *p*= 0,043 και CC505WS , *p*= 0,018, αντίστοιχα). (**Γράφημα 3**).



Γράφημα 3: Επίπεδα των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική Απόκλιση

*. Στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

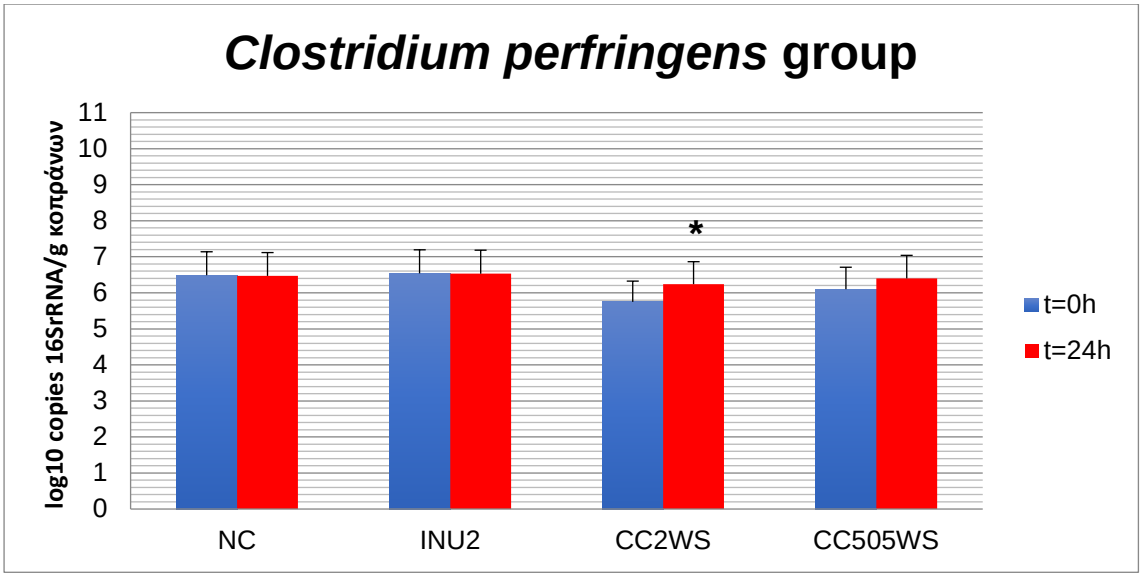
Ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των χειρισμών μετά από 24 ώρες ζύμωσης (*p-overall* = 0,005) με υψηλότερα επίπεδα στην περίπτωση του (INU2) σε σχέση με τα CC2WS (*p*=0,001), CC505WS (*p*=0,011) και τον αρνητικό μάρτυρα *(p*=0.002*).* Επιπλέον, τα αρχικά επίπεδα των bacteroides ελαττώθηκαν σημαντικά μετά από 24 ώρες ζύμωσης στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα (NC, *p*= 0,029), αλλά και στα υπό μελέτη υποστρώματα (CC2WS, *p*=0,016 και CC505WS *p*=0,045, αντίστοιχα) σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (**Γράφημα 4**).



Γράφημα 4: Επίπεδα της ομάδας των *Bacteroides,* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική Απόκλιση

***.** Στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

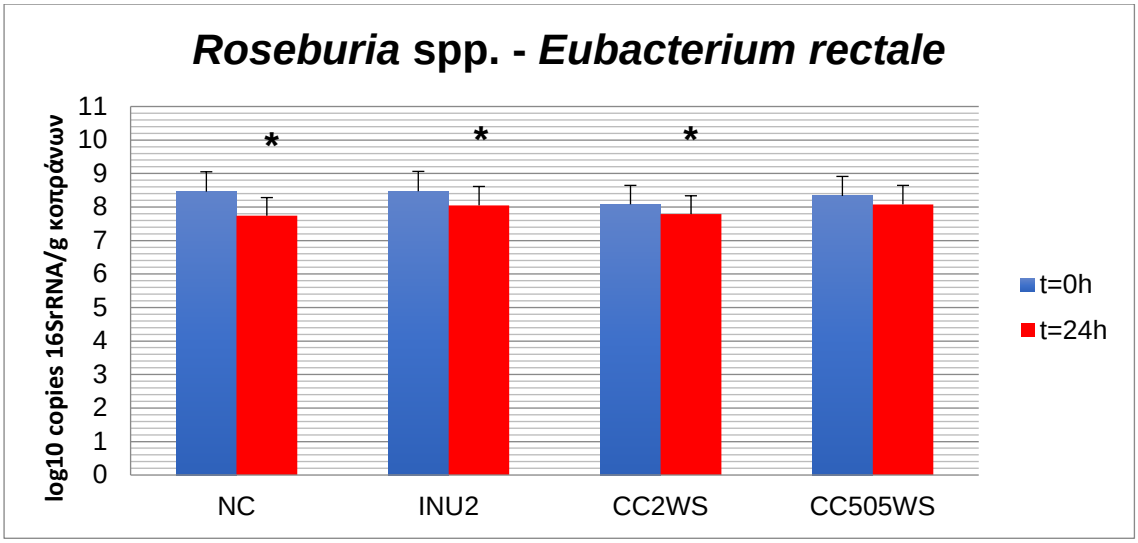
Ο πληθυσμός του *C. perfringens* δεν δίνει στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών μετά από 24 ώρες ζύμωσης, ενώ στο υπόστρωμα CC2WS είχαμε σημαντική αύξηση του πληθυσμού σε σχέση με την αρχή της ζύμωσης (*p*= 0,011)(**Γράφημα 5**). Δεν παρατηρείται κάποια άλλη σημαντική διαφορά γι' αυτό το βακτηριακό πληθυσμό.



Γράφημα 5: Επίπεδα της ομάδας των *C. perfringens*, των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική Απόκλιση

***.** Στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

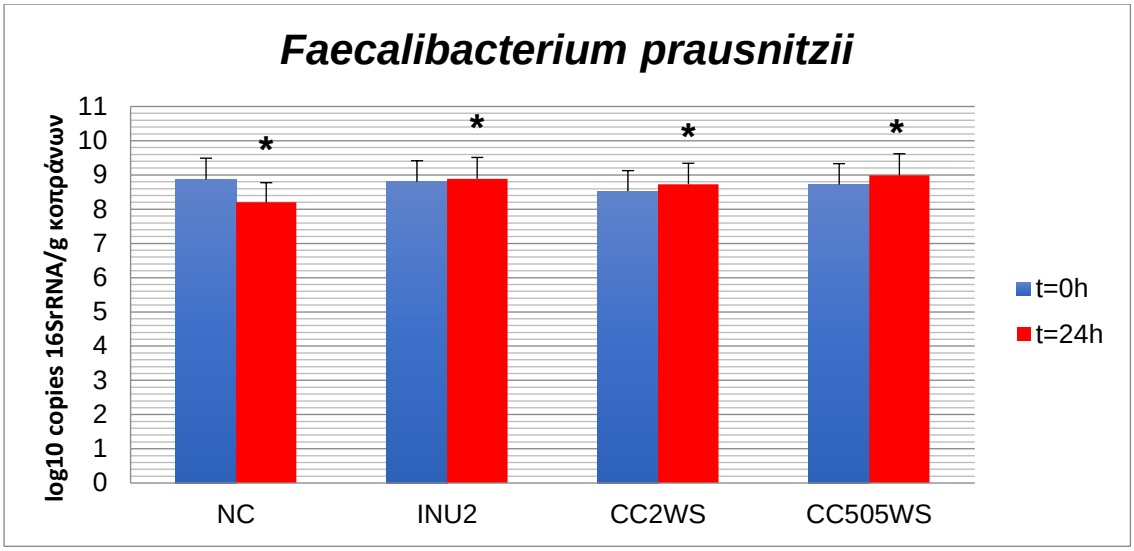
Στον πληθυσμό του *Roseburia* spp.- *Eubacterium rectale* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των αρχικών επιπέδων μετά από 24 ώρες ζύμωσης στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα (NC, *p*= 0,019), του θετικού μάρτυρα (INU2, *p*= 0,011), αλλά και ενός από τα υπό μελέτη υποστρώματα (CC2WS, *p*= 0,014) (**Γράφημα 6**). Αντιθέτως, στο υπόστρωμα CC505WS τα αρχικά επίπεδα των *Roseburia* spp.- *E. rectale* δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά.



Γράφημα 6: Επίπεδα της ομάδας των *Roseburia,*spp- *Eubacterium rectale* των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική

*. Στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των χειρισμών στον και πληθυσμό του *F. prausnitzii* μετά απο 24 ώρες ζύμωσης *(p- overall* = 0,001*).* Συγκεκριμένα, οι χειρισμοί INU2 (*p*= 0,005), CC2WS (*p*= 0,015) και CC505WS (*p*= 0,001) χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερο πληθυσμό *F. prausnitzii* σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στις 24 ώρες ζύμωσης (**Πίνακας 10**). Επιπλέον, τα αρχικά επίπεδα του *F. prausnitzii* αυξήθηκαν σημαντικά μετά από 24 ώρες ζύμωσης στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα (*p*= 0,044) και των δύο μανιταριών (CC2WS, *p*= 0,001 και CC505WS, *p*= 0,004) ενώ αντιθέτως μειώθηκαν στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα (*p*= 0,001) (**Γράφημα 7**).



Γράφημα 7: Επίπεδα των βακτηρίων του *Faecalibacterium prausnitzi* ,των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων στους χειρισμούς στο χρόνο (t=0h) και μετά απο 24 ώρες ζύμωση (t=24). Οι τιμές εκφράζονται ως Μ.Ο ± Τυπική

*. Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (t=0). (Paired Samples T-test ή Wilcoxon); NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

4.3 Προσδιορισμός πρεβιοτικών δεικτών μετά τη ζύμωση

Ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη βασίζεται στον αριθμό των αντιγράφων του 16S rDNA γονιδίου / ml δείγματος. Υπολογίστηκε με την εξίσωση του Palframan και των συνεργατών του (2003). Οι τιμές για τον πρεβιοτικό δείκτη για τους 7 εθελοντές εκφρασμένες κατά μέσο όρο με τυπική απόκλιση έχουν ως εξής:

Αρνητικός μάρτυρας NC: -3,27 ± 13,97

Θετικός μάρτυρας INU2 : 200,55 ± 457,38

CC2WS : 108,86 ± 191,54

CC505WS : 408,95 ± 1014,21

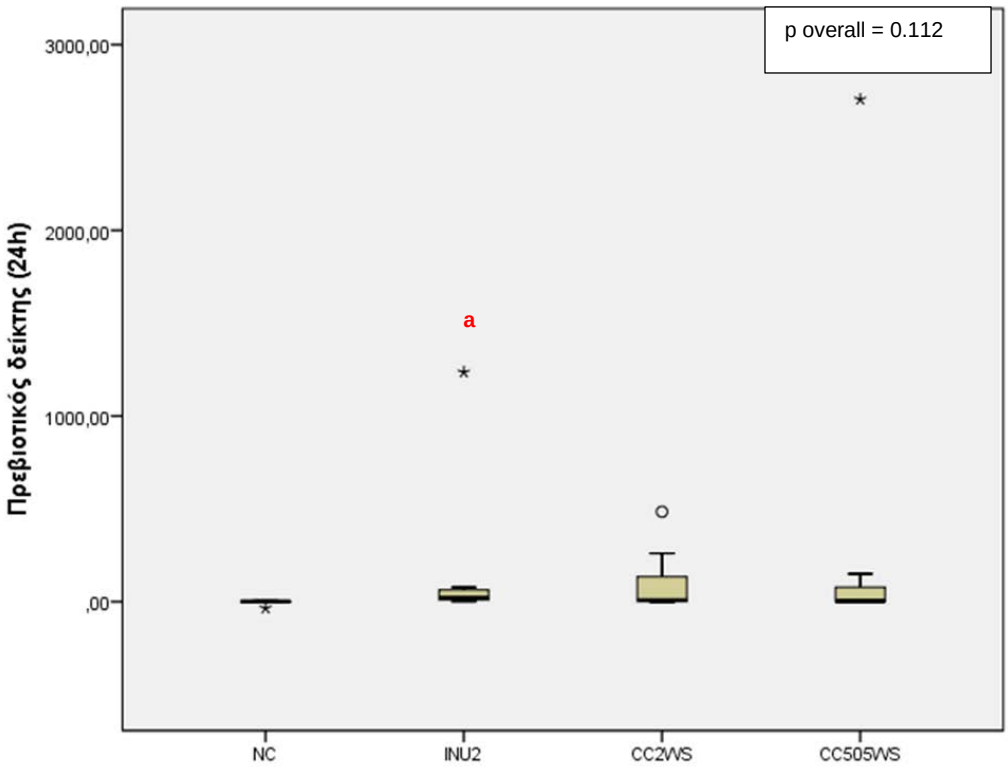
Οι τιμές για τον πρεβιοτικό δείκτη για τους 7 εθελοντές εκφρασμένες με διάμεσο (Q1-Q3) παρατίθενται ακολούθως (**Γράφημα 8**):

Αρνητικός μάρτυρας NC: 1,05 (-0,83-2,75)

Θετικός μάρτυρας INU2 : 19,77 (7,84-77,65)

CC2WS : 8,39 (-0,55-260,64)

CC505WS : 3,55 (-0,01 – 149,65)



Γράφημα 8: Οι πρεβιοτικοί δείκτες των υπό μελέτη μανιταριών και των μαρτύρων μετά από 24 ώρες ζύμωση. Οι τιμές εκφράζονται ως διάμεσος (οριζόντια γραμμή) και το διάστημα των τεταρτημορίων (Q1-Q3), ενώ οι αστερίσκοι/κύκλοι εκφράζουν ακραίες τιμές; [a]: σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με το NC; NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU2: Θετικός μάρτυρας, CC2WS και CC505WS : υπό μελέτη υποστρώματα

Στην περίπτωση των πρεβιοτικών δεικτών, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών συνολικά (*p overall* = 0,112) (**Γράφημα 8**). Ο θετικός μάρτυρας ινουλίνη (INU2) είχε σημαντικά υψηλότερο πρεβιοτικό δείκτη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (*p*=0.013). Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η ινουλίνη όσο και τα δύο μανιτάρια είχαν θετικούς πρεβιοτικούς δείκτες μετά το πέρας της ζύμωσης.

4.4 Συζήτηση

Οι ιδιότητες των μανιταριών στην προαγωγή της υγείας μέσω της λειτουργίας του εντερικού μικροβιόκοσμου δεν έχει μέχρι στιγμής διερευνηθεί επαρκώς.

Τα μανιτάρια αποδεδειγμένα έχουν αντιαλλεργικές , αντικαρκινικές και αντιχοληστεροληιμικές ιδιότητες. Αποτελούν πλούσια πηγή υδατανθράκων όπως η χιτίνη , α και β γλυκανών , ξυλάνες, μαννάνες και γαλακτάνες τα οποία τα καθιστούν κατάλληλη επιλογή ως πρεβιοτικά. (Muthukumaran et. al. 2017).

Ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος περιέχει παραπάνω από 10 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς με 1000 είδη γνωστών βακτηρίων, με παραπάνω από 3 εκατομμύρια γονίδια, τα οποία υπολογίζονται ότι είναι 150 φορές περισσότερα των ανθρώπινων.(Philip et. al. 2015)

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπου έχει γίνει αντικείμενο εκτενών ερευνών τα τελευταία χρόνια και οι γνώσεις για τα είδη τα οποία κατοικούν σε αυτόν αλλά και οι λειτουργίες αυτών, συνεχώς αυξάνονται.(Guinane et. al., 2013)

Στη μελέτη αυτή ερευνήθηκαν και αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις σε συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από την *in vitro* ζύμωση λυοφιλοποιημένων μανιταριών των στελεχών CC2 και CC505 του μύκητα *Cyclocybe cylindracea*. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε άχυρο σίτου. Το εμβόλιο κοπράνων που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από υγιείς ηλικιωμένους εθελοντές (≥65 ετών). Πρόκειται για μία ηλικιακή ομάδα που υφίσταται σε δραστικές αλλαγές τόσο στον εντερικό μικροβιόκοσμο όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα.(Nicholson et al., 2012), (Liu et al., 2016). Στους ηλικιωμένους είναι προφανές ότι υπάρχουν αλλαγές στην εντερική λειτουργία όπως αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού , αλλαγές στο ανοσοποιητικό και μικροβιακή δυσβίωση (Gavini, 2001, Mueller et al., 2006, An et. al., 2018). Σε ότι αφορά το μικροβιόκοσμο των ηλικιωμένων ατόμων το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι η αλλοίωση στις αναλογίες των βακτηρίων *Firmicutes* και *Bacteroidetes* με τους ηλικιωμένους να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό *Bacteroidetes* , συγκριτικά με τους νέους ενήλικες που έχουν υψηλότερο ποσοστό *Firmicutes* (Mariat, D., 2009). Σε άλλες έρευνες αποτυπώνεται η μείωση των επιπέδων στα γένη *Bacteroides* και

Bifidobacterium spp στους ηλικιωμένους όπου η περιστασιακή αύξηση αναερόβιων όπως στρεπτόκοκκων , εντερόκοκκων και εντεροβακτήριων είναι γεγονός. (Gavini, 2001, Mueller et al., 2006). Πολλές *(in vitro και in vivo)* μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να αποτραπούν αυτά τα αποτελέσματα στον εντερικό μικροβιόκοσμο των ηλικιωμένων χρησιμοποιώντας προβιοτικά και πρεβιοτικά. (Toward et al., 2012, Vulevic et al., 2015, Guigoz et al., 2002, Bouhnik et al., 2007).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης για την επίδραση των στελεχών CC2WS και CC505WS έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές μεταβολές σε συγκεκριμένες βακτηριακές ομάδες του εντερικού μικροβιόκοσμου. Στα ολικά βακτήρια παρατηρείται σημαντική τροποποίηση στους μικροβιακούς πληθυσμούς μετά από τις 24 ώρες ζύμωσης όπου τα επίπεδα των ολικών βακτηρίων αυξήθηκαν σημαντικά συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (NC). Ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων αυξήθηκε σημαντικά στα μυκητιακά υποστρώματα CC2WS και CC505WS μετά από 24 ώρες ζύμωση. Σε παλαιότερες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι οι β - γλυκάνες αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των λακτοβακίλλων (Mitsou et al., 2010, Drzikova et al., 2005, Snart et al., 2006, Synytsya et al., 2009)

Σημαντική αύξηση των αρχικών επιπέδων μετά από 24 ώρες ζύμωσης παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό των ειδών *Bifidobacterium* και για τα δύο στελέχη των μανιταριών. Το φαινόμενο αυτό θεωρείται αναμενόμενο καθώς έχει διαπιστωθεί ότι οι β- γλυκάνες δρουν ευεργετικά και διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό των *Bifidobacterium* (Mitsou et al., 2009). Πρόσφατα κάποιες μελέτες αξιολόγησαν τις πρεβιοτικές ιδιότητες των εδώδιμων μανιταριών και την ικανότητά τους στη διέγερση και ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών του γένους *Bifidobacterium (Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium animalis* και *Bifidobacterium longum)*.(Saman et al., 2016). Αύξηση των μπιφιδοβακτηρίων θεωρείται σημάδι υγιούς εντερικού μικροβιόκοσμου. Πολλοί ερευνητές επισημαίνουν την ευεργετική δράση στην πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου, στην κανονική λειτουργία του παχέος εντέρου και την οξεία διάρροια (Fehlbaum et al., 2018). Τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobaccilus* είναι ευρέως αποδεκτό ότι είναι ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπου.(Deepalakshmi et al., 2014)

Στον πληθυσμό των ειδών *Bacteroides* παρουσιάζεται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των χειρισμών μετά από 24 ώρες ζύμωσης (p overall = 0.005). Τα *Bacteroides* spp θεωρούνται πολύ σημαντικά για την αποδόμηση των φυτικών ινών (Tuncil et al., 2017). Ανήκουν στα σακχαρολυτικά βακτήρια και συμμετέχουν σε ευεργετικές για τον ξενιστή διαδικασίες. Ο λόγος που κρίνεται απαραίτητη η διατήρηση της ισορροπίας στον πληθυσμό των *Bacteroides* είναι η ικανότητά τους στην παραγωγή διαφορετικών τύπων τοξινών. (Hecht et al., 2016, Wexler, 2007)

Στον πληθυσμό του *C. perfringens* δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των χειρισμών μετά από 24 ώρες ζύμωση. Μόνο στο υπόστρωμα CC2WS παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του πληθυσμού συγκριτικά με την αρχή της ζύμωσης (p= 0,011). Μελέτες έχουν δείξει ότι αύξηση του ομάδων *C. perfringens* και *Bacteroides* επιφέρουν μείωση του πρεβιοτικού δείκτη χωρίς να είναι σαφής η δράση τους σε όλες τις περιπτώσεις και πάντα πρέπει να συνεκτιμάται και η ταυτόχρονη αύξηση των ευεργετικών βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου. (Hecht et al., 2016, Wexler, 2007). Τα δύο κυρίαρχα βουτυρικοπαραγωγά βακτήρια είναι το *F. prausnitzii* και τα είδη *Roseburia* (Zhang et al., 2018). Τα επίπεδα των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ στο παχύ έντερο συνδέονται με την υγεία του ξενιστή καθώς οι διαβητικοί, τα άτομα με καρκίνο του παχέος εντέρου οι ηλικιωμένοι και οι ασθενείς με φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου χαρακτηρίζονται από χαμηλή παραγωγή βουτυρικού οξέος και αυξημένα επίπεδα ευκαιριακών παθογόνων. Το γένος *Roseburia* υπάρχει σε αφθονία στον εντερικό μικροβιόκοσμο αλλά όταν ακολουθείται μία δίαιτα με υψηλά επίπεδα πρωτείνης και χαμηλά επίπεδα υδατανθράκων τότε ο αριθμός του συγκεκριμένου γένους μειώνεται (Flint et al., 2012). Στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα (NC) αυτοί οι βακτηριακοί πληθυσμοί μειώνονται. Στην περίπτωση του θετικού μάρτυρα (INU2) τα επίπεδα του *F. prausnitzii* αυξήθηκαν ενώ τα επίπεδα των ειδών *Roseburia* μειώθηκαν. Στους πληθυσμούς των ειδών *Roseburia* παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων μετά από 24 ώρες ζύμωσης σε όλα τα υποστρώματα εκτός του CC505WS. Τα βακτήρια *Roseburia* θεωρούνται ευεργετικά για τον οργανισμό βακτήρια (Ren et al., 2016). Πολλές μελέτες έχουν ταυτοποιήσει ξεχωριστές τιμές ως σημαντικές για την έναρξη της παχυσαρκίας

και του διαβήτη. Τα βακτήρια του γένους *Roseburia* όπως και *F. prausnitzii* φαίνεται ότι μειώνονται σημαντικά στα άτομα με διαβήτη τύπου 2. Η μείωση των πληθυσμών αυτών των βακτηρίων σε γυναίκες θεωρείται ένδειξη προδιάθεσης εκδήλωσης διαβήτη (Karlsson et al., 2013). Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στον πληθυσμό του *F. prausnitzii* μετά από 24 ώρες ζύμωσης στα διάφορα υποστρώματα που εξετάστηκαν. Τα αρχικά επίπεδα του *F. prausnitzii* αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη ζύμωση στις περιπτώσεις του θετικού μάρτυρα και των δύο μανιταριών. Η αύξηση των επιπέδων στο συγκεκριμένο βακτήριο θεωρείται σημαντική διότι σχετίζεται με αντιφλεγμονώδη δράση (Soko et al., 2008)

Ο πρεβιοτικός δείκτης επιτρέπει τη σύγκριση πρεβιοτικών που προέρχονται από διαφορετικά υποστρώματα (Palframan et al., 2003). Παραμένει ένα χρήσιμο εργαλείο που χρησιμοποιείται για την εύρεση πρεβιοτικής δράσης σε διάφορα φυσικά υποστρώματα ή επεξεργασμένους υδατάνθρακες όπως η ινουλίνη οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες η πολυδεξτρόζη και οι ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (Mandalari et al., 2010, Ghoddusi et. al., 2007). Για την εκτίμηση της πρεβιοτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε ο πρεβιοτικός δείκτης, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών συνολικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η ινουλίνη όσο και τα μανιτάρια είχαν θετικούς πρεβιοτικούς δείκτες μετά το πέρας της ζύμωσης. Παρατηρούνται επίσης υψηλές τιμές στην περίπτωση του CC505WS λόγω της μπιφιδογόνου δράσης του και λόγω της μείωσης του πληθυσμού των *Bacteroides* spp.

Οι β- γλυκάνες ως διαιτητικές ίνες διέρχονται άπεπτες από το λεπτό έντερο και ζυμώνονται στο παχύ έντερο είτε ολοκληρωτικά είτε μερικά από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Από τη ζύμωση αυτή παράγονται μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα όπως το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ εξασφαλίζοντας έτσι την καλή υγεία του εντέρου καθώς αποτελούν πηγή ενέργειας των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου (Malkki et.al., 2001). Παλαιότερες μελέτες αναφέρουν τη πρεβιοτική δράση των β-γλυκανών και μάλιστα επιλεκτική αύξηση για μερικά είδη λακτοβακίλλων. Για παράδειγμα το *L.rhamnosus* GG φαίνεται να καταναλώνει πάνω από το 70% των διαθέσιμων β- γλυκοολιγομερών σε 24 ώρες επώασης, το *L.acidophilus* κατανάλωσε το 17% και τα μπιφιδοβακτήρια το 4% των β- γλυκοολιγομερών (Jaskari et. al.,

1998). Σε διπλά τυφλή κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 82 εθελοντές κατανάλωναν 0,75g β-γλυκάνης από κριθάρι ενσωματωμένο σε κέϊκ για ένα μήνα και μελετήθηκε η επίδραση αυτής της κατανάλωσης στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Το αποτέλεσμα ήταν πως στους εθελοντές άνω των 50 ετών η κατανάλωση της β- γλυκάνης προκάλεσε σημαντική αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* (Mitsou et. al., 2010). Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο φάνηκε ότι συγκεκριμένα είδη εδώδιμων μανιταριών πλούσια σε β- γλυκάνες εμφανίζουν πρεβιοτική δράση. Στελέχη από τα γένη *Pleurotus* και *Cyclocybe* παρουσίασαν ευεργετική επίδραση στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου των φαινομενικά υγιών εθελοντών ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών. Στις συγκεκριμένες μετρήσεις παρουσιάστηκε αύξηση στους πληθυσμούς των *Bifidobacterium* spp και *F.prausnitzii*, ενώ όλα τα μανιτάρια που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα προκάλεσαν αύξηση της αναλογίας του προπιονικού και του βουτυρικού οξέος μετά από 24 ώρες ζύμωσης (Mitsou et. al., 2020)

4.5 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα

Η παρούσα μελέτη έδειξε θετικά αποτελέσματα για την πρεβιοτική δράση και των δύο στελεχών του μανιταριού *Cyclocybe cylindracea*. Σε μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερος αριθμός εθελοντών καθώς στην παρούσα χρησιμοποιήθηκαν 7 εθελοντές το οποίο αποτελεί έναν βασικό περιοριστικό παράγοντα για την εξαγωγή γενικών συμπερασμάτων από αυτή τη μελέτη. Θα μπορούσαν να διερευνηθούν επιμέρους βακτηριακά είδη και στελέχη για το κάθε βακτήριο που εξετάστηκε. Σε μελλοντική έρευνα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ηλικιακές ομάδες αλλά και ασθενείς με νόσους του εντέρου χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) για την ανάλυση όλου του φάσματος του εντερικού μικροβιόκοσμου δίνοντας μας πληροφορίες για το σύνολο των μικροοργανισμών (αλληλουχία του 16S rDNA). Το δείγμα της κένωσης θεωρείται αντιπροσωπευτικό της κατάστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου παρ’ όλα αυτά αν είχαμε δείγμα του παχέος εντέρου μετά από κολονοσκόπηση θα έδινε μία πληρέστερη εικόνα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A. Vrieze, F. Holleman et al. The Environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. Diaberologia (2010)
2. Aagaard, K., et al., The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med, 2014.
3. Abrams, S., Griffin, I., Hawthorne, K., Liang, L., Gunn, S., Darlington, G., & Ellis, Lk, (2005). A combination of prebiotic short – and long – chain inulin – type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. The American Journal of Clinical Nutrition
4. Agus, A., et al., Western diet induces a shift in mictobiota composition enhancing susceptibility to Adherent – Invasive E. coli infection and intestinal inflammation.
5. Aida, S. M., Yazid, M., Maaruf, A. (2009). Mushroomas a potential source of prebiotics : a review. Trends in food Science and technology
6. Akpinar, M., Urek, R.O. (2013). Extracellular ligninolythic enzymes production byXTRACELLULAR Pleurotus eryngii on agroindustrial wastes. Preparative Biochemistry and Biotechnology.
7. Alexopoulos C.J., Mims C.W. and Blackwell M., (1996), Introductory Mycology.
8. Alonso V.R. & Guarner F. (2013)" Linking the gut microbiota to human health" British Journal of Nutrition
9. An, R., Wilms, E., Masclee, A., Smidt, H., Zoetendal, E., Jonkers, D.(2018).Age dependent changes in GI physiology and microbiota :time to reconsider? Gut
10. 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.
11. Angelakis E., Armougom F., Million M., Raoult D. (2012) "The relationship between gut microbiota and weight gain in humans" Future Microbiol.
12. AOAC (1995). Official methods of Analysis (16th ed.) Arlighton VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
13. Arslan N. (2014) "Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota" World J Gastroenterol 20
14. Bano, Z., Rajarathnam, S., Steinkraus, K.H. (1988) Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post – harvest physiology, preservation, and role as human food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
15. Barbara Stachowiak, J.R., Health – promoting potential of edible mactomycetes under special consideration of polysaccharids: a review. European Food Research and Technology, 2012.
16. Baxter, N. T., Schmidt, A., Venkataraman, A., Kim, K., Waldron, C., Schmidt, T. (2019). Dynamics of human gut microbiota and short- chain fatty acid in response to dietary interventions with three fermentable fibers. mBio.
17. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species, Am J Bot. 2011.
18. Bottacini, F., et al., Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. Microb Cell Fact, 2014.
19. Bouhnik, Y., Achour, L., Paineau, D., Riottot, M., Attar, A., Bornet, F.R.J. Fourweek short chain fructo oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacterial and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. Nutr. J. 2007.

20. Butel M.J. (2014) Probiotics, gut microbiota and health", Medecine et maladies infectieuses 1 – 8
21. Chatterjee, B., and Patel, t. (2016). Edible mushroom-a nutritious food improving human health. International Journal of clinical and Biomedical Research.
22. Chatterjee, S., Biswas,G., Kumar Basu, S., Acharya, K. (2011). Antineoplastic effect of mushrooms: a review. Australian Journal of Crop Science.
23. Conlon, M., & Bird, A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. Nutrients (2014).
24. Cresci G.A. and Bawden E. (2015) "Gut Microbiome: What We Do and Don't Know" Nutrition in Clinical Practice.
25. Da Silva, M.C.S., Naozuka, J., Da Luz, J.M.R., De Assucao, L.S., Oliveira, P.V., Vanetti, M.C.D. Bazzolli, D.M.S. Kasuya, M.C.M. (2012). Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. Food Chemistry.
26. Deacon J., (2006), Fungal biology. Blackwell, Oxford - United Kingdom.
27. Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. Pleurotus ostreatus: An oyster mushroom with nutrinional and medical properties (2014).
28. Dimou, DM, Zervakis GJ, Polemis E. (2002). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: I. Macrofungi from the southernmost Fagusforest in the Balkans (Oxya Mountain, central Greece). Mycotaxon
29. Donsky, M., (2000). Growing Mushrooms on Logs. Colorado Mycological society.
30. Drzikova, B., Dongowski, g., & Gebhardt, E., (2005). Dietary fiber-rich oat – based products affect serum lipids, microbiota, formation of short-chain fatty acids and steroids in rats. British journal of nutrition.
31. Dutton, R.J. and P.J. Turnbaugh, Taking a metagenomic view of human nutrition. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012.
32. El Enshasy, H. et al., Mushrooms and truffles: historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the middle East. Evid Based Complement Alternat Med, 2013.
33. Aidaa, M.S., Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends in Food Science & Technology, 2009.
34. FAOSTAT (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E)
35. Feeney, M.J., Dwyer, J., Hasler – Lewis, C.M., Milner, J.A., Noakes, M., Rowe, S., Wach, M., Beelman, R.B., Caldwell, J., Cantorna, M.T., Castleburry, L.A., Chang, S.T., Cheskin, L.J. Clemens, R., Drescher, G., Fulgoni, V.K., Haytowitz, D.B., Hubbard, V.S., Law, D., Miller, A.M., Minor, B., Percival, S.S., Riscuta, G., Schneeman, B., Thornsbury, S., Toner, C.D., Woteki, C.E., WU, D., (2014). Mushrooms and Health Summit Proceedings. The Journal of Nutrition.
36. Feeney, M.J., Miller, A.M., Roupas, P. (2014). Mushrooms – Biologically Distinct and Nutritionally Unique. Nutrition Today.
37. Fehlbaum, S., Prudence, K., Kieboom, J., Heerikhuisen, M., Broek, T., Schuren, F., Steinert, R., Raederstorff, D. In vitro fermetntation of selected prebiotics and their effects on the composition and activity of the adult gut microbiota. Int. J.Mol. Sci.2018.
38. Ferreira C.M., Vieira A.T., Ramirez Vinolo M.A., Oliveira F.A., Curi R., and Santos Martins F. (2014) "The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases" Journal of Immunology
39. Flint, H., Louis, P., Duncan, S. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.2012.

40. Fredrik H. Karlsson, Valentina Tremaroli, Intamat Nookaew, Goran Bergistrom, Carl Johan Behre, Bjorn Fagerberg, Jens Nielsen and Fredrik Backhed. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. Natura (2013)
41. Fortin, O., Aguilar – Uscanga, B. R., Vu, K. D., Salmieri, S. & Lacroix, M. Effect of Saccharomyces Boulardii Cell Wall Extracts on Colon Cancer Prevention in Male F344 Rats Treated with 1,2-Dimethylhydrazine. Nutrition and Cancer (2018)
42. Fuller, S., Beck, E., Salma, H., Tapsell, L. New Horizons for the study of ditary fiber and health : A reviw., Plant foods hum nutr.2016
43. Ghoddusi, H., Grandison, M.A., Grandison, A., Tuohy, K. In vitro study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. Anaerobe 2007.
44. Gibson G.R. and Roberfroid M. B., (1995), Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition.
45. Gibson G.R. Probert H.M., Van Loo J., and Roberfroid M.B. (2004), Dietary odulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews.
46. Guigoz, Y., Rochat, F., Perruisseau-Carrier, G., Rochat, I., Schriffrin, E.J. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non specific immune system in elderly people. Nutr. Res.2002.
47. Guillamon, E., Garcia – Lafuente, A., Lozano, M., D' Arrigo, M., Rostagno, M.A. Villares, A., Martinez, J.A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia.
48. Guillamon, E., Garcia – Lafuente, A., Lozano, M., Moro, C., Palacios, I., D' Arrigo, M., Martinez, J.A., Villares, A. (2011). Mushroom proteins: Potential therapeutic agents. Agro Food Industry Hi Tech.
49. Guinane, CM., Cotter, P.D. Role of gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: Understanding a hidden metabolic organ. Ther. Adv Gastroenterol. 2013.
50. Gupta, S., Summuna, B., Gupta, M., Annepu, S.K. (2018) Edible Mushrooms: Cultivation, Bioactive Molecules, and Health Benefits. In: Merillon JM., Ramawat K. (eds)) Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.
51. Hallfrisch, Physiological responses of men and women to barley and oat extracts (NutrimX). Comparison of glucose and inulin response Cereal Chem (2003).
52. Healey ,G. R., Murphy, R., Brough, L., Butts, C., Coad, J. (2017). Interindividual variability in gut microbiota and host response. Nutrition Revies.
53. Hecht, A., Casterline , B., Earley, Z., Goo, Y., Goodlett, D., Bubech W., (2016) Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. EMBO Reports, 17(9), 1281-1291.
54. Hinzey, E.M. (11/01/2017) Mushrooms: A great source of antioxidants and other nutrient, Nutrition.
55. http://www.internationaloliveoil.org
56. Hughes, S.A., Shewry, P. R., Gibson, G. R. McCleary, B.V. & Rastall, R. A. In vitro fermentation of oat and barley derived β-glucans by human faecal microbiota: in vitro fermentation of cereal β-glucans. FEMS Microbiology Ecology (2008)
57. Ianiro G., Bruno G., Lopetuso L., Beghella F.B., Laterza L., D' Aversa F., Giante G., Cammarota G. and Gasbarrini A. (2014) "Role of Yeasts in Healthy and Impaired Gut Microbiota: The Gut Mycome" Current Pharmaceutical Design
58. Isikhuemhen, O.S., Mikiashvili, N.A. and Kelkar, V. (2009). Application of solid waste from anaerobic digestion of poultry litter in Agrocybe aegerita cultivation: Mushroom production, Lignocellulolytic enzymes activity and substrate utilization. Biodegradation.

59. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Reddy D.N. (2015) “The role of the normal gut microbiota” World J Gastroenterol.
60. Jaskari, J., Oat b-glucans and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. Applied Microbiology and Biotechnology (1998).
61. Jayachandran et al. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota, International Journal of Molecular Sciences (2017)
62. Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S., & Xu, B. (2018). A critical review on the impact of β-glucans on gut microtiota and human health. The Journal of Nutritional Biochemistry.
63. Jeffery I.B. and O’Toole P.W. (2013) “Diet – Microbiota Interactions and Their Implications for Healthy Living” Nutrient.
64. Jones, J.M. CODEX – aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap”. Nutr. J, 2014.
65. Jong – Wonyon, J. W.C., Lee, Y.S and Song, C.H. (2001), A preliminary study on the hypoglycemic effect of the exo-polymers produced by five different medicinal mushrooms. Journal of Microbial Biotechnology.
66. Ka – Lung Lam, P.C. – K.C., Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber, (2013).
67. Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. Food Chemistry. Volume 113, Issue 1, p. 9 – 16.
68. Kalac, P., Svoboda, L. (2000). A review of trace element concentrations in edible mushrooms. Food Chemistry.
69. Ka-Lung Lam, P.C.-K.C., Non-digestible long chain beta-blucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013.
70. Karimi G, Sabran MR, Jamaluddin R, Parvaneh K,et al. The anti-obesity effects of Lactobacillus casei strain Shirota versus Orlistat on high fat diet induced obese rats. Food Nutr Res (2015)
71. Karlsson, F., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F. (2013)**.** Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*
72. Keenan, M.J., Marco, M., Ingram, D., Martin, R.(2015).Improving healthspan via changes in gut microbiota and fermentation. Age.
73. Khan, A., Mousoumi, T. (2012). Nutritional and Medicinal Importance of Pleurotus Mushrooms: An Overview. Food Reviews International. Volume 28, Issue 3, p. 313 – 329
74. Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Stathopoulos, P., Kaliora, A.C., Zervakis, G.I. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in Pleurotus ostreatus mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. World Journal of Microbiology and Biotechnology.
75. Koutrotsios, G., Mountzouris, K.C., Chatzipavlidis, I., Zervakis, G.I. (2014). Bioconversion of lignocellulosic residues by Agrocybe cylindracea and Pleurotus ostreatus mushroom fungi – Assessment of their effect on the final product and spent properties. Food Chemistry.
76. Lam Yu Shan & Okello Edward J.Determination of lovastatine,b-glucan,total polyphenols and antioxidant activity in raw and processed oyster-culinary- medical mushroom, Pleurotus Ostreatus.International Journal of Medicinal Mushrooms (2015).
77. Lavelli, V., Proserpio, C., Gallotti, F., Laureati, M. Pagliarini, E., (2018). Circular reuse of bioresources: the role of Pleurotus spp. In the development of functional foods. Food and Fuction.
78. Liu, M., Li, X., Zhou, S., Wang, T., Zhou, S., Yang, K., Wang, J., (2020). Dietary fiber isolated from sweet potato residues promotes a healthy gut microbiome profile. Food and function.

79. Liu, Y., Gibson, G.R. & Wolton, G.E. An in vitro approach to study effects of prebiotics and probiotics on the faecal microbiota and selected immune parameters relevant to the elderly. (2016)
80. MacLean P.S., Bergouignan A., Cornier M.A.., and Jackman M.R. (2011) “Biology’s response to dieting: the impetus for weight regain” American Journal of Physioligy 301 (3): R581-R600
81. Madigan, M.T., Brock biology of microorganisms. 13th ed. 2012.
82. Malkki, Y., Gastrointestinal effects of Oat bran and oat gum, Lebensmittel-Wissenschaft und technology (2001).
83. Malyarenko, O.S., Usoltseva, R. V., Zvyagintseva, T. N. & Ermakova, S. P. Laminaran from brown alga Dictyota dichotoma and its sulfated derivative as radioprotectors and radiosensitizers in melanoma therapy. Carbohydrate Polymers (2019).
84. Mandalari, G., Faulks, R., Bisignano,C., Waldron, K., Narbad, A., Wickman, M. In vitro evaluation of the prebiotic properties of almond skins (Amygdalus communis L.) (2010).
85. Manzi Pamela, Pizzoferrato L., Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry 68 (2000).
86. Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V.J Agric Food Chem. (2001).
87. Micka, A., Siepelmeyer, A., Holz, A., Theis, S., & Schon, C., (2016). Effect of consumption of chicory inulin on bowel function in healthy subjects with constipation: a randomized, double-blind,placebo-controlled trial. International Journal of Food Sciences And Nutrition.
88. Miles, P.G., Chang, S.T. (1997). Mushroom Biology. Chapter 1: Introduction to Mushroom Biology.
89. Mitsou, E., Kougia, E., Nomikos, T., Yannakoulia, M., Mountzouris, K., Kyriacou, A. (2011). Effects of banana consumption on faecal microbiota: A randomized, controlled trial. Anaerobe.
90. Mitsou, E., Panopoulou, N., Turunen, k., Spiliotis, V., & Kyriakou, A., (2010). Prebiotic potential of barely derived b-glucan at low intake levels: A randomized, double blinded, placebo-controlled clinical study. Food Research International
91. Mitsou, E., Saxami, G., Stamoulou, E., Kerezoudi, E., Terzi, E., Koutrotsios, G., Bekiaris,G., Zervakis, G., Mountzouris, K., Pletsa, V., Kyriacou, A. Effects of rich in b- glucans edible mushrooms on aging gut microbiota characteristics :An in vitro study. Molecules, (2020)
92. Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D’ Arrigo, M., Guillamon, E., Villares, A., Martinez, J.A., Garcia – Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. Food Chemistry.
93. Muthukumaran Jayachandran, Jianbo Xiao, Baojun Xu., (2017). A critical review on health promoting benefits of edible mushrooms through gut microbiota
94. Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Yadav, H.92018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. Nutrition and healthy aging.
95. Nicholson, J.K. Host – Gut Microbiota metabolic interactions. Science 336, 1262-1267 (2012)
96. Noack, J., et al., Fermentation profiles of wheat dextrin, inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in vitro digestion pretreatment and in vitro batch fermentation system model. Nutrients, (2013)
97. Noordeloos, M., & Polemis, E. (2008). Studies in the genus Entoloma (Basidiomycetes, Agaricales) from the Kiklades (C. Aegean, Greece) Mycotaxon.
98. Palframan, R., Gibson, G.R., Rastall, R.A. Development of a quantitive tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Lett. Appl. Microbiol. (2003).
99. Parnell, J. & Reimen, R. (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide Y in overweight and obese adults. The American Journal of Clinical Nutrition.

100. Pedneault, K., Angers, P., Avis, T.J., Gosselin, A., Twedde, R.J. (2007) Fatty acid profiles of polar and nonpolar lipids of Pleurotus ostreatus and P. cornucopiae var.citrino – pileatus grown at different temperatures. Mycological Research.
101. Perez-Munoz, M.E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A., Walter, J.(2017). A critical assessment of the sterile womband in utero colonization hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. Microbiom.
102. Philippoussis, A. (2009). Production of Mushrooms Using Argo-Industrial Residues as Substrates. Chapter 9. Biotechnology for agro-industrial residues utilization: Utilisation of agro-residues.
103. Philippoussis, A., Zervakis, G.I. and Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural Lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushromms Agrocybe aegerita, Volvariella volcacea and Pleutotus spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology.
104. Phillip, A., Green, E.S.J., Voigt, R.M. The gastrointestinal microbiome alcohol effects on composition of intestinal microbiota.
105. Polemis, E, Zervakis GI, Dimou, DM. 2002. New and interesting findings of macromycetes from the island of Andros and Naxos (Cyclades, Greece). In: The 7th International Mycological Congress,(2002)
106. Polemis, E, Zervakis GI. (2016). Mushrooms in Greece. Present status and threats. In proceedings of the workshop on mushrooms including truffles. Regulating policies, p.11. Edited by R. Tsiakiris & K. Stara; COST Action Fp1203 technical report. Ioannina , Greece.
107. Polemis, E., & Noordeloos, M.E. (2007). Two new Gymnopus species from the Island of Andros (Kiklades, C. Aegean, Greec). Mycotaxon.
108. Quince C, Ijaz UZ, Loman N, Eren AM, Saulnier D, Russell J, et al. Extensive modulation of the fecal metagenome in children with chrons disease during exvlusive nutrition. Am J Gastroenterol 2015.
109. Ravcheev D. & Thiele I. (2014) “Systematic genomic analysis reveal the complementary aerobic and anaerobic respiration capacities of the human gut microbiota” Frontiers in Microbiology.
110. Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira IC.Food Chem Toxicol.(2012)
111. Roberfroid, M., et al., Prebiotic effects: metabolic and health benefirts. Br J Nutr, (2010).
112. Robles Alonso, V. and F. Guarner, Linking the gut bicrobiota to human health. Br J Nutr, (2013).
113. Rop, O., J. Mlcek, and T. Jurikova, Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutr Rev, 2009.
114. Royse, D.J., Baars, J., Tan, Q., (2017). Current overview of mushroom production in the world.
115. Saman, P., Chaiongkarn, A., Moonmangmee, S., Sukcharoen, J., Kuancha, C., Fungsin, B. Evaluation of prebiotic property in edible mushrooms. Biol. Chem. Res. (2016).
116. Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U. Berger, R.G., Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) in humans. Journal of Functional Foods.
117. Scott, K.P., et al., Prebiotic stimulation of human colonic butyrate – producing bacteria and bifidodacteria, in vitro. FEMS Microbiol Ecol, 2014.
118. Sekirov, I., et al., Gut microbiota in health and disease, Physiol Rev, 2010.
119. Senn-Irlet B, Heilmann-Clausen J, Genney D, Dahlberg A (2007) Gudiance for conservation of macrofungi in Europe. Document prepared for the European Council for Conservation of Fungi (ECCF) within the European Mycological Association (EMA) and the Directorate of Culture and Cultural and Natural Heritage, Council of Europe, Strasbourg.
120. Shoaib, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. Carbohydrate Polymers (2016)

121. Shon, Y.H and Nam, K.S. (2001), Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, Journal of Ethnopharmacology.
122. Slavin, J., Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits, Nutrients, 2013. 5(4): p. 1417 – 35
123. Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., & Allison, G, (2006). Supplementation of diet with high – viscosity beta glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. Applied and environmental microbiology.
124. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-humaran, L., Gratadoux, J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J., Corthier, G., et al. From the cover: Faecalibacterium prousnitzii is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Chron disease patients. Proc Natl. Acad. Sci.USA (2008)
125. Stamets, P., (1993). Growing Gourmet and medicinal Mushrooms. Ten speed press.
126. Synytsya, A., Mickova, K., Jablonsky, I., Slukova, M., Copikova, J. (2008) Mushrooms of Genus Pleurotus as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements.
127. Swanson, K., Vos, W., Martens, E., Gilbert, J., Menon, R., Soto-Vaca, A., Slavin, J. (2020). Effects of fructans, prebiotics and fibers on the human gut microbiome assessed by 16S rRna-based approaches: a review. Beneficial Microbes.
128. Torii, K., Uneyama, H., Nakamura, E. 2013. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption Journal of Gastroenterology.
129. Toward, R., Montandon, S., Walton, G., Gibson, G. Effects of prebiotics on the human gut microbiota of elderly persons. Gut microbes (2012).
130. Tremanoli Valentina, F. Backhed, Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature, (2012)
131. Tuncil, E., Xiao Y., Porter. N.T., Reuhs. B., Martens. E.C., Hamaker. B. Reciprocal priorization to dietary glycans by gut bacteria in competitive environment promotes stable coexistence. (2017)
132. Turroni, F., et al., Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota.
133. Turunen K., et al, Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: A pilot study. Anaerobe (2011).
134. Turunen, K. T. et al. Impact of β-glucan on the Fecal Water Genotoxicity of Polypectomized Pat ients. Nutrition and Cancer (2016)
135. Uhart, M. and Alberto, 6. (2007), Morphologic characterization of Agrocyge Cylindracea (Basidiomycetes, Agaricales) from Americo, Europe and Asia. Revista Mexicana de Micologia.
136. Ulrike Lindequist et al., The pharmacological potential of mushrooms. Institute of pharmacy, (2005)
137. USDA (2018). National Nutrient Database for Standart Reference. http://ndb.nal.usda.gov/.(Πρόσβαση 20/5/2018)
138. Valverde M. Elena, Hernandez-perez, T., Paredes-Lopez, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. International Journal of Microbiology, (2015) p.14
139. Valverde M.E., Hernandez – Perez T., Paredes – Lopez O. 2015 Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality. International Journal of Microbiology
140. Vasiljevic, T., Kealy, T. & Mishra, V.K. Effects of b -Glucan Addition to a Probiotic Containing Yogurt. J Food Science (2007).
141. Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P. & Richter, J. Beta Glucan; Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials. Molecules (2019).
142. Virginia R. Alonso, F. Guarner, Lingking the gut microbiota to human health. British Journal of Nutrition (2013).

143. Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., & Venema, K. et al. (2014). Immunological Properties of Inulin-Type Fructans. Critical Reviews In Food Science And Nutrition.
144. Vulevic, J., Juric, A., Walton, G., Claus, S., Tzortzis,G., Toward, R., Gibson , G. Influence of galacto-oligosaccaride mixture (B-GOS) on gut microbiota , immune parameters and metabonomics in elderly persons. Br J. Nutr.(2015).
145. Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides Appl Microbiol Biotechnol.
146. Webb, D., (May, 2014) Betting on beta-glucans, Today's Dietitian
147. Wexler, H. (2007). Bacteroides: the good, the bad and the nitty-gritty. Clinical microbiology reviews.
148. Xu Z. & Knight R. (2015) "Dietary effects on human gut microbiome diversity" British Journal of Nutrition.
149. Xu, H., Zou, S. & Xu. X. The β-glucan from Lentinus edodes suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in estrogen receptor positive breast cancers. Oncotarget 8, (2017)
150. Yang T., Owen J.L., Lightfoot Y.L., Kladde M.P., Mohamadzadeh M. (2013) "Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer" Trends Mol Med.
151. Yang, N. Liang, Y., Xiang, Y., Zhang, Y., Sun, H., Wang, D.C. (2005). Crystallization and preliminary crystallographic studies of an antitumour lectin from the edible mushroom Agrocybe aegerita. Protein and Peptide Letters.
152. Yang, Q., Qi, L., Biju, B., Belobrajdic, D., Feng, Q.-J., Zhang, W. (2020). Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: A narrative review.
153. Zervakis GJ, Dimou, DM, Polemis E, Karadelev, M. (2002a). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: II. Macromycetes associated with conifers in the Taygetos Mountain (Peloponnisos). Mycotaxon.
154. Zervakis GJ, Polemis E, Dimou, DM, (2002b). Mycodiversity studies in selected ecosystems of Greece: III. Macromycetes recorded in Quercus forests in southern Peloponnisos. Mycotaxon 84, 141 – 162
155. Zervakis, G. I., Koutrotsios, G. and Katsaris, P. (2013). Composted Versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms – An assessment of selected cultivation and quality parameters. BioMed Research International.
156. Zhang, T., Yang, Y., Liang, Y., Jiao, X., Zhao, C. Beneficial effects of intestinal fermentation of natural polysaccharides. Nutrients (2018).
157. Zhang, Y., Mills, G.L. and Nair, M.G. (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, Agrocybe aegerita. Phytomedicine, 10, 386 – 390.
158. Zhu, F., Du, B., Bian, Z. & Xu, B. Beta –glucans from edible and medicinal mushrooums: Characteristics, physicochemical and biological activies. Journal of Food Composition and Analysis (2015)
159. Α.-Φ.Α. Μεντής, Ανθρώπινο Μικροβίωμα του εντέρου – Ο ρόλος στην υγεία και στη νόσο Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής 2013.
160. Διαμάντης, Σ., (1992). Τα μανιτάρια της Ελλάδος. Εκδόσεις Ίων.
161. Ζερβάκη, Γ., Δήμου, Δ. & Πολέμης, Η. (2008). Η βιοποικιλότητα των μακρομυκήτων στην Ελλάδα
162. Ζερβάκης, Γ., (1998). Εισαγωγή στη μυκητολογία και στοιχεία καλλιέργειας εδώδιμων μανιταριών. Διδακτικές σημειώσεις ΤΕΙ Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας
163. Ζερβάκης, Γ., (2011). Εισαγωγή στη μυκητολογία. Πανεπιστημιακές σημειώσεις στα πλαίσια του μαθήματος "Γενική Μικροβιολογία" ΓΠΑ, Αθήνα.
164. Καλκάνη, Ε., (2001). Γενική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Ελλήν.

165. Κουτρώτσιος, Γ., (2019). Βιομετατροπές γεωργικών παραπροϊόντων σε αποτοξικοποιημένα παράγωγα και εδώδιμη βιομάζα με τη χρήση επιλεγμένων στελεχών βασιδιομυκήτων .
166. Παντίδου, Μ., (1991). Μανιτάρια από τα Ελληνικά δάση. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας.
167. Τζουβάρα – Καραγιάννη, Σ. (1996). Σύσταση, Χημική Ανάλυση και Προδιαγραφές βασικών τροφίμων. 8η έκδοση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 265 – 266
168. Φραντζεσκάκης, Ι., (1990). Μανιτάρια: Βιολογία και καλλιέργεια των βρώσιμων μανιταριών. Εκδόσεις Γαρταγάνης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ερωτηματολόγιο μελέτης

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΜΕ Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ ΑΠΟ ΕΔΩΔΙΜΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΒΙΟΤΟΠΩΝ

ΚΩΔΙΚΟΣ : _____ (συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο)

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ «Ανάπτυξη καινοτόμου λειτουργικού τροφίμου εμπλουτισμένου με β-γλυκάνες από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων»

Ο/Η……δηλώνω τη συγκατάθεσή μου για να συμμετέχω στην ερευνητική μελέτη με τίτλο «Ανάπτυξη καινοτόμου λειτουργικού τροφίμου εμπλουτισμένου με β-γλυκάνες από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων. Επιστημονική υπεύθυνη είναι η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, κα. Κυριακού Αδαμαντίνη. Η μελέτη έχει σκοπό την αξιολόγηση της *invitro* επίδρασης των β-γλυκανών από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων στη σύσταση και τα μεταβολικά προϊόντα του εντερικού μικροβιόκοσμου εθελοντών ηλικίας άνω των 65 ετών. Περιλαμβάνει την αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης και της φυσικής δραστηριότητας, τη λήψη ανθρωπομετρικών μετρήσεων, τη συμπλήρωση ερωτηματολογίων συχνότητας γαστρεντερικών συμπτωμάτων, καθώς και τη δειγματοληψία κοπράνων και αίματος. Πιθανά ερωτήματά μου σχετικά με οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης θα απαντηθούν πλήρως από τους υπεύθυνους της μελέτης. Οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με το άτομό μου και τα αποτελέσματα των μετρήσεων, που θα προκύψουν κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα παραμείνουν απόρρητα. Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση.

Η σημερινή ημερομηνία είναι ……/……../20..

Ο/Η εθελοντής/-ντρια……

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο :

Διεύθυνση:

Τηλέφωνο: E-mail:

2. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης : …….. /……. /…… Ηλικία: ……..

Επίπεδο μόρφωσης (πχ. Δημοτικό , Γυμνάσιο κτλ):……Χρόνια εκπαίδευσης: ……

Οικογενειακή κατάσταση: ☐ Άγαμος/-η ☐Έγγαμος/-η ☐λλο ……

Ποιο είναι το επάγγελμα που ασκείτε τώρα; …….

Κάπνισμα τώρα: ☐Όχι ☐αι ☐το παρελθόν Πόσα χρόνια; …. Τσιγάρα/ ημέρα; ……

3. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ιατρικώς διαγνωσμένη πάθηση (π.χ. ΣΔ, υπέρταση, καρδιαγγειακή νόσος, υπερλιπιδαιμία, ηπατική/νεφρική/πνευμονική νόσος κτλ.):☐ Όχι ☐Ναι Ποια; ……..

Έχετε αλλεργία; ☐Όχι ☐ Ναι Τι είδους (π.χ. τροφική, άσθμα); ……

Πάσχετε από περιοδοντίτιδα/ουλίτιδα; ☐ Όχι ☐ Ναι

Λαμβάνετε θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα; Όχι ☐ Ναι ☐ Ποια;……..

Ακολουθείτε ειδική δίαιτα; ☐ Όχι ☐ Ναι Ποια; …….

Ακολουθείτε δίαιτα απώλειας βάρους; ☐ Όχι ☐ Ναι Ποια; …….

4. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΛΗΨΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ*

Όνομα φαρμάκου	Δόση	Συχνότητα	Διάρκεια	Πάθηση για την οποία λαμβάνεται
……..	……..	……..	……	
……..				

*** Στα φάρμακα συμπεριλαμβάνονται και τα συμπληρώματα διατροφής**

Λάβατε μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη το τελευταίο διάστημα; ☐Όχι ☐αι
Πότε;……Ποια;……

5. ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ύψος: ..... m**Σωματικό βάρος:** ..... kg

BMI: .....kg/m^2

6. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ (IPAQ-SF)

IPAQ_1	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες μέρες κάνατε **έντονες** φυσικές δραστηριότητες όπως άρση βαρών, σκάψιμο, αεροβική γυμναστική ή έντονη ποδηλασία; Να αναφερθούν μόνο οι δραστηριότητες που κάνατε για τουλάχιστον 10 λεπτά.	
IPAQ_2	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως κάνοντας **έντονες** φυσικές δραστηριότητες σε μία από αυτές τις ημέρες;	
IPAQ_3	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες μέρες κάνατε φυσικές δραστηριότητες **μέτριας** ένταση όπως μεταφορά ελαφρού φορτίου, ποδηλασία σε μέτρια ένταση ή διπλό τένις; Μη συμπεριλάβετε το περπάτημα. Να αναφερθούν μόνο οι δραστηριότητες που κάνατε για τουλάχιστον 10 λεπτά.	
IPAQ_4	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως κάνοντας φυσικές δραστηριότητες **μέτριας** ένταση σε μία από αυτές τις ημέρες;	
IPAQ_5	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες ημέρες **περπατήσατε** για τουλάχιστον10 λεπτά τη φορά;	
IPAQ_6	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως για **περπάτημα** σε μια από τις παραπάνω ημέρες;	
IPAQ_7	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσο χρόνο (σε ώρες συνολικά) καταναλώσατε **καθιστός** στο γραφείο, με φίλους, διαβάζοντας ή καθιστός ή ξαπλωμένος βλέποντας τηλεόραση;	

7. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΕΝΩΣΕΩΝ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ

7.1. ΠΟΣΟ ΣΥΧΝΑ ΕΙΧΑΤΕ ΚΕΝΩΣΕΙΣ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ;

0 ΚΑΜΙΑ ΚΕΝΩΣΗ
1 ΜΙΑ ΦΟΡΑ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ
2 ΔΥΟ ΦΟΡΕΣ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ
3 ΤΡΕΙΣ ΦΟΡΕΣ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ
4 ΤΕΣΣΕΡΙΣ Ή ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΦΟΡΕΣ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ

7.2. ΕΙΧΑΤΕ ΜΙΑ Ή ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ ΥΔΑΡΕΙΣ ΚΕΝΩΣΕΙΣ;

ΝΑΙ ΟΧΙ

7.3. ΠΟΣΕΣ ΥΔΑΡΕΙΣ ΚΕΝΩΣΕΙΣ ΕΙΧΑΤΕ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ; ...

Χαρακτηριστικά εθελοντών μελέτης

Χαρακτηριστικά εθελοντών μελέτης

Ηλικία άνω των 65 ετών:	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
19.5 kg/m^2≤ΔΜΣ ≤ 27.5 kg/m^2	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές νόσοι, στεφανιαία νόσος, καρκίνος, υπο- ή υπερ-παραθυρεοϊδισμός, αυτοάνοσα νοσήματα	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Σοβαρές νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, χρόνια ή οξεία διάρροια, χρόνια δυσκοιλιότητα)	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Απώλεια βάρους το τελευταίο χρόνο λόγω π.χ. δίαιτας	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Λήψη αντιβίωσης μέχρι 2 μήνες πριν τη μελέτη	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐
Διακοπή λήψης συμπληρωμάτων διατροφής που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντέρου (προβιοτικά, πρεβιοτικά, φυτικές ίνες) για 2 εβδομάδες πριν τη λήψη των δειγμάτων	ΝΑΙ ☐	ΟΧΙ ☐

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΜΕ Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ ΑΠΟ ΕΔΩΔΙΜΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΒΙΟΤΟΠΩΝ

ΤΡΙΗΜΕΡΟ ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΩΔΙΚΟΣ : _____ (συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο)

Ημερομηνία:…….. Ανακαλούμενη ημέρα:……..

Ώρα (προσδιορίστε την ώρα των γευμάτων)	Περιγραφή τροφής (αναλυτικά) Είδος τροφής-Τρόπος μαγειρέματος	Εμπορική ονομασία τροφίμου	Ποσότητα τροφίμου	Τόπος κατανάλωσης (πού φάγατε;)	Παράλληλες δραστηριότητες (π.χ.TV, H/Y, διάβασμα)	Συνδαιτυμόνες (με ποιους φάγατε;)
Πρόγευμα						
Ενδιάμεσα						
Μεσημεριανό						
Απογευματινό						
Δείπνο						
Προ του ύπνου						

Νερό συνολικά μέσα στην ημέρα (ποτήρια):……..
Παίρνετε συμπληρώματα διατροφής; …… Τι είδους και πόσο συχνά; ……
Καταναλώσατε ποτά με λίγες θερμίδες;…… Ήπιατε καθόλου αλκοολούχα ποτά;……
Υπάρχει κάτι ασυνήθιστο στη διατροφή σας σήμερα (π.χ. νηστεία, δίαιτα, γιορτή κτλ)/Ήταν η συγκεκριμένη ημέρα αντιπροσωπευτική;……