

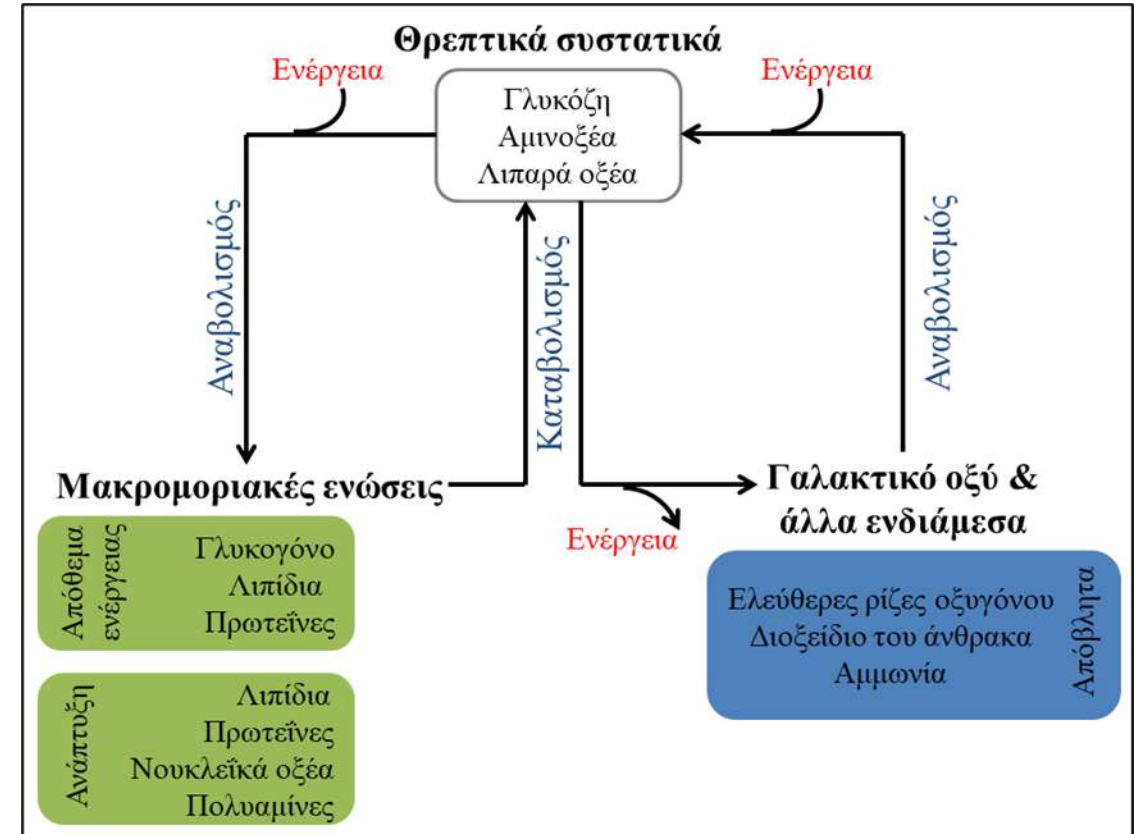
«Σχεδιασμός λειτουργικών τροφίμων με θετικές δράσεις στην υγεία και με έμφαση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου-1»



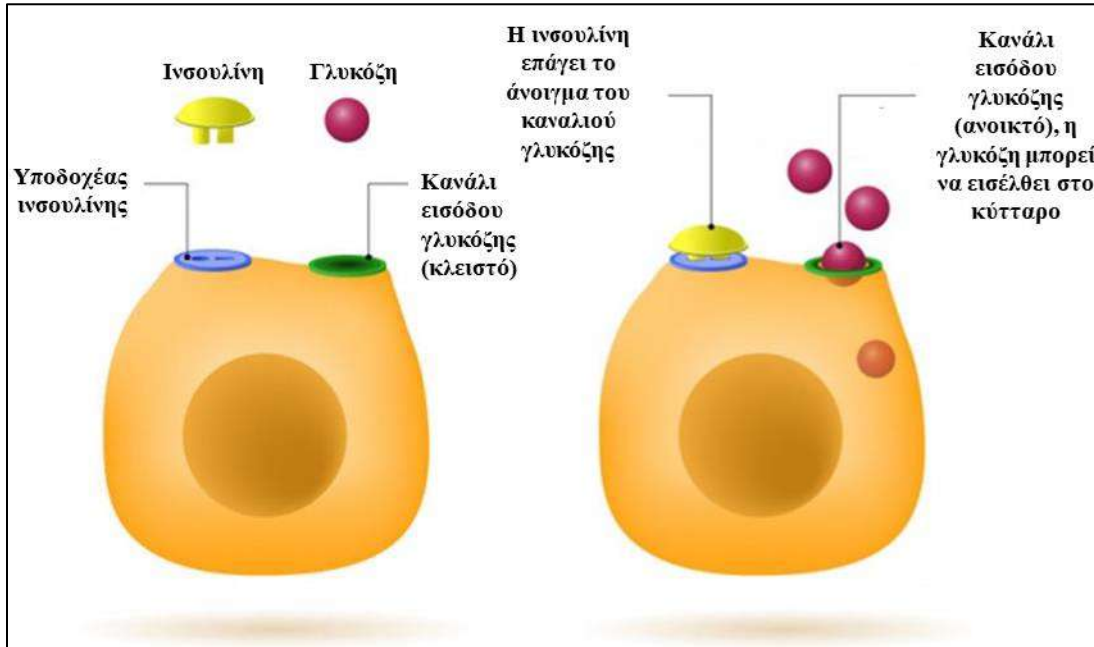
Πράπα Ιωάννα, Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια, PhD
Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
ΤΜΒΓ, ΔΠΘ
iprapa@mbg.duth.gr

Μεταβολικά νοσήματα

- Διαταραχές των διαδικασιών του μεταβολισμού οδηγούν σε ασθένειες → μεταβολικά νοσήματα
- Οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες (κληρονομικά νοσήματα) ή σε περιβαλλοντικά αίτια (επίκτητα, μη κληρονομικά νοσήματα) ή σε συνδυασμό τους



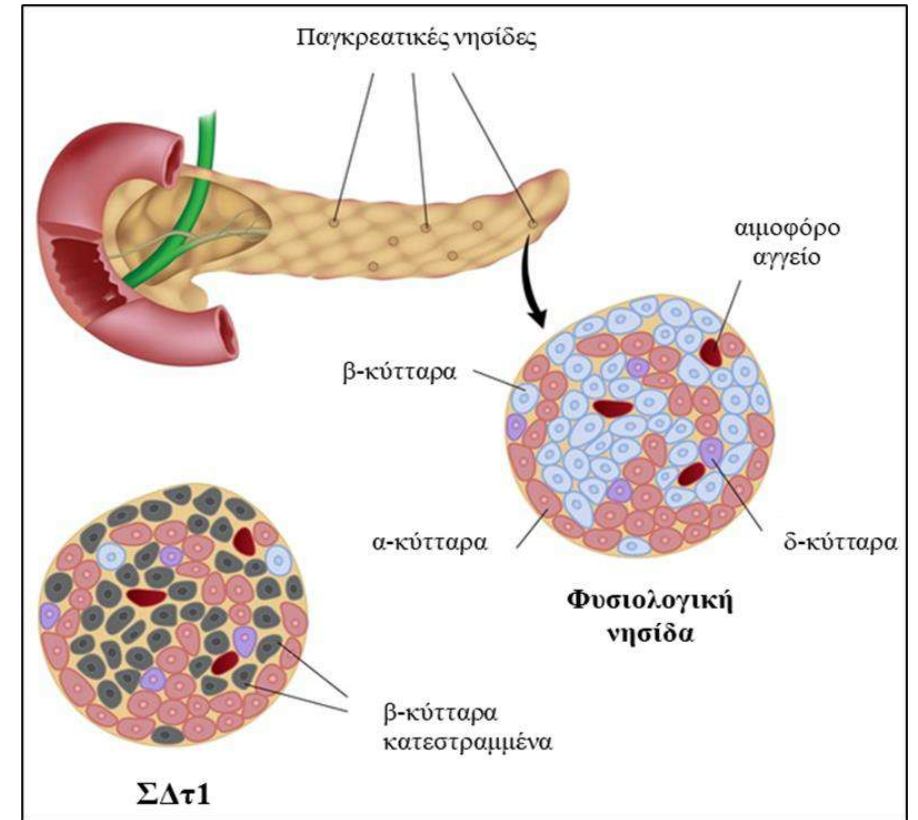
Σακχαρώδης Διαβήτης



- Ομάδα χρόνιων μεταβολικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από χρόνια υπεργλυκαιμία
- Βλάβες κατά την παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης ή/και της δράσης της
- Αδυναμία μεταβολισμού της γλυκόζης → διατάραξη του μεταβολισμού των θρεπτικών συστατικών (υδατανθράκων, λιπών & πρωτεϊνών)
- Έλλειψη ινσουλίνης ή αδυναμία των κυττάρων να ανταποκριθούν σε αυτήν → υπεργλυκαιμία → ΣΔ

Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου-1

- Αυτοάνοσο νόσημα
- Καταστροφή των β- παγκρεατικών κυττάρων
- Ανεπάρκεια ινσουλίνης
- 5-15% των διαβητικών ασθενών
- 80-90% των περιπτώσεων ΣΔ σε παιδιά και εφήβους
- Σύμφωνα με την IDF, το 2021 υπήρχαν παγκοσμίως 1.2 εκατομμύρια νέοι ηλικίας <20 ετών με ΣΔτ1
- Ετησίως, διαγιγνώσκονται περίπου 184,100 νέοι με ΣΔτ1.



Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου-1



Πολυδιψία



**Συχνουρία/
Πολυουρία**



**Απώλεια ενέργειας/
Κάματος**



**Διαρκές αίσθημα
πείνας**



**Ξαφνική απώλεια
βάρους**

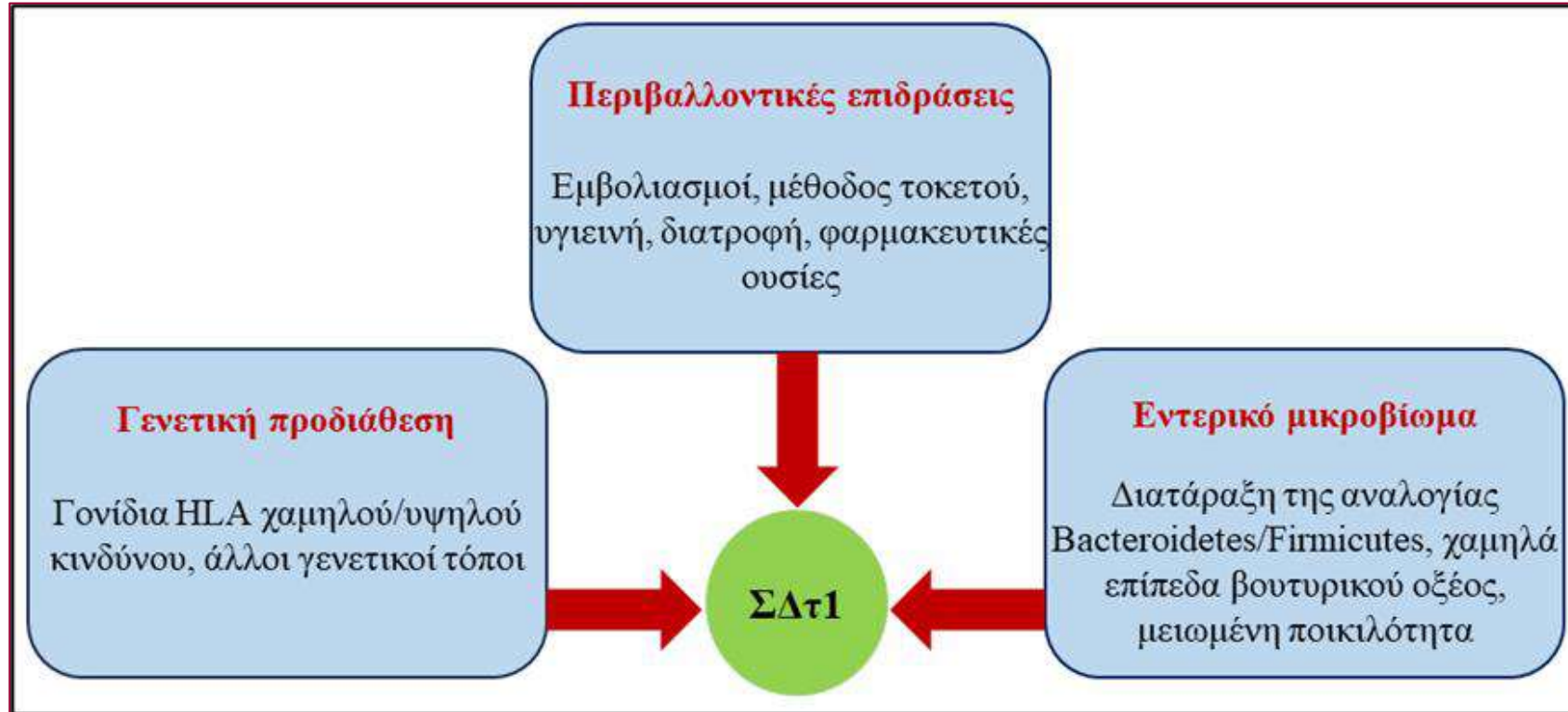


Θολή όραση



Διαβητική κετοξέωση

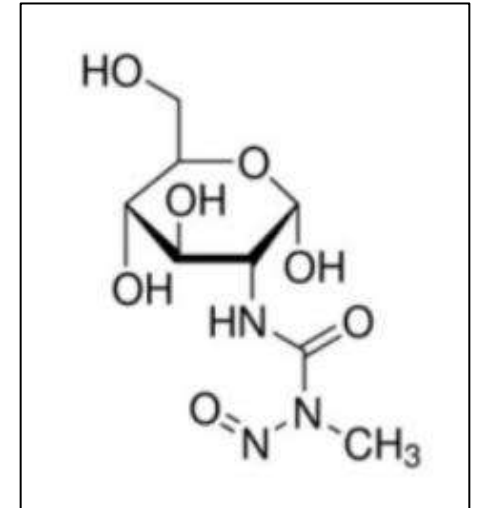
Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου-1



Μέθοδος πρόκλησης ΣΔ		Ζωικό πρότυπο/ Περιγραφή
Χημική επαγωγή		Με αλλοξάνη: βλάβες στα β-κύτταρα του παγκρέατος και στην έκκριση ινσουλίνης
		Με στρεπτοζοτοκίνη: βλάβες στα β-κύτταρα του παγκρέατος, προκαλώντας υποινσουλιναιμία και υπεργλυκαιμία
Αυθόρμητη επαγωγή	αυτοάνοση	Μη παχύσαρκοι διαβητικοί μύες (non- obese diabetic, NOD): μοντέλο ΣΔτ1 με χαρακτηριστική υπεργλυκαιμία και φλεγμονή στο πάγκρεας
		Επίμυες Biobreeding (BB): Αναπτύσσουν αυτόματα υπεργλυκαιμία και κετοασίδωση, κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΔτ1
		Επίμυες Komeda diabetes-prone (KDP): Μετάλλαξη στο γονίδιο Cblb που οδηγεί σε αυτοάνοσο ΣΔτ1
		Επίμυες Long-Evans Tokushima Lean (LETL): μοντέλο που προσομοιάζει τον ΣΔτ1, χωρίς λεμφοπενία
		Επίμυες Lewis-insulin dependent diabetes mellitus (LEW-iddm): Αναπτύσσει αυτοάνοσο ΣΔ, μέσω απόπτωσης των β-κυττάρων του παγκρέατος
Γενετικά επαγόμενος		Μύες Akita: μετάλλαξη στο γονίδιο της ινσουλίνης (Ins2) οδηγεί σε λανθασμένη αναδίπλωση του μορίου, βλάβη στα β- κύτταρα και μειωμένη έκκριση της ινσουλίνης
		Επίμυες Zucker Fatty (ZF): μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα λεπτίνης. Αναπτύσσουν παχυσαρκία και χαρακτηρίζονται από υπερλιπιδαιμία και υποϊνσουλιναιμία
		Μύες db/db: μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της λεπτίνης. Εκδήλωση παχυσαρκίας, χρόνιας υπεργλυκαιμίας, ατροφία παγκρεατικών β-κυττάρων και υποϊνσουλιναιμία (μοντέλο ΣΔτ2)
		Επίμυες Goto-Kakizaki (GK): μη παχύσαρκο μοντέλο ΣΔτ2
		Επίμυες Zucker Diabetic Fatty (ZDF): μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα λεπτίνης. Προέρχονται από τα ZF και αναπτύσσουν παχυσαρκία με ΣΔ και χρησιμοποιούνται στη μελέτη του ΣΔτ2
Γενετική τροποποίηση		Μύες KKAy: μοντέλο ΣΔτ2 με αντίσταση στην ινσουλίνη, υπεργλυκαιμία και υπερινσουλιναιμία
		Μύες Obese hyperglycemic (ob/ob): μοντέλο παχυσαρκίας αφού είναι υπέρβαρα και υπερφαγικά από νεαρή ηλικία και δεν έχουν λειτουργική λεπτίνη
Χειρουργική επαγωγή		Παγκρεατεκτομή: προσομοιάζει τον ΣΔτ2 καθώς η μάζα των β-κυττάρων του παγκρέατος μειώνεται χειρουργικά
Επαγωγή με ιούς		Από ιό Coxsackie B: αναπτύσσει ινσουλίνο- εξαρτώμενο διαβήτη ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των T-κυττάρων
		Από ιό Encephalomyocarditis (EMC): αναπτύσσει διαβήτη μέσω εκλεκτικής καταστροφής των β-κυττάρων

Streptozotocin (STZ)

- *Streptomyces achromogenes*
- Χημειοθεραπεία β- παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων
- Ταχεία καταστροφή των β- παγκρεατικών κυττάρων
- Μείωση της ινσουλίνης και αύξηση της γλυκόζης στο αίμα
- Ζωικό μοντέλο διαβήτη μυών/ επίμυων



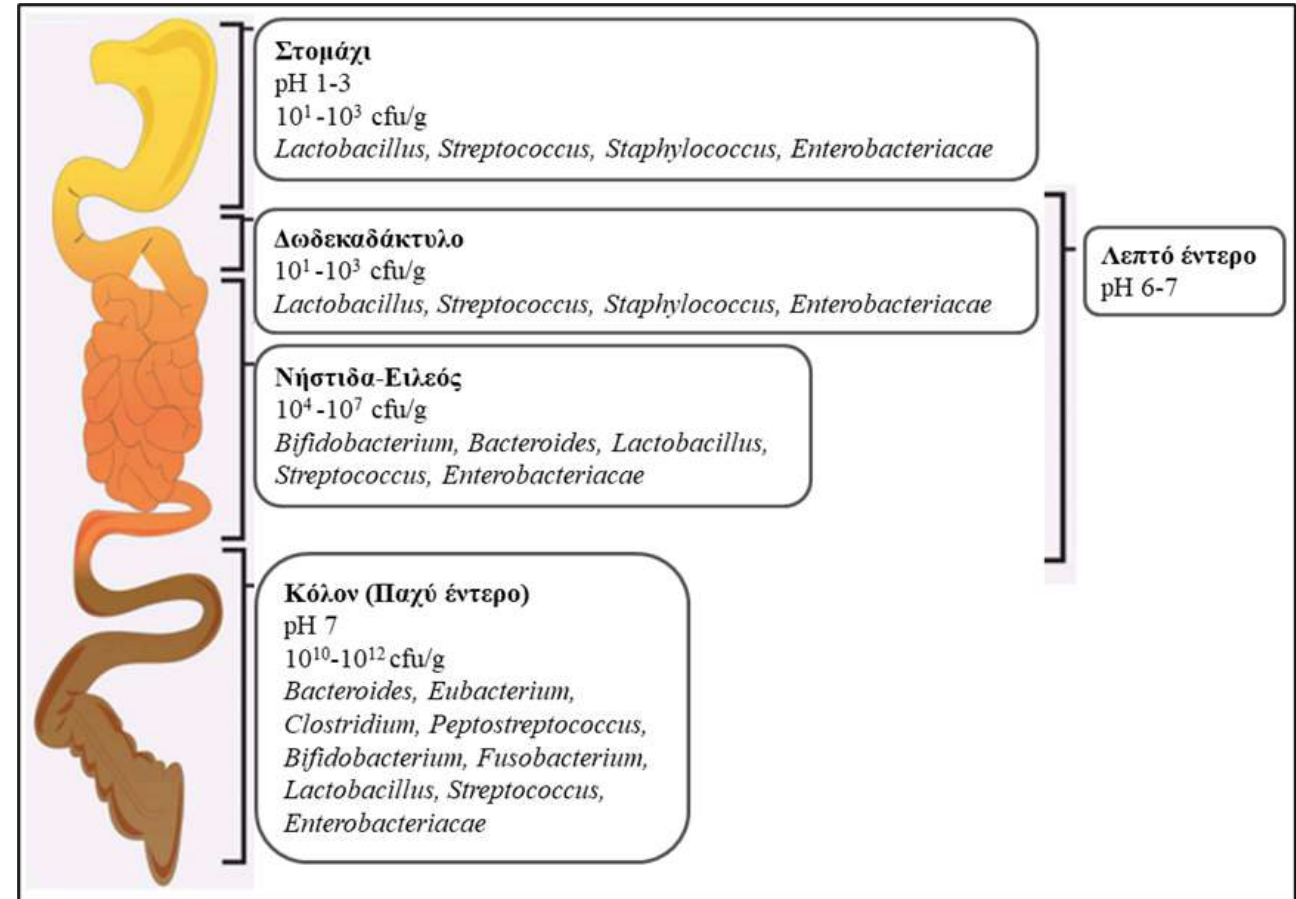
Χημικός τύπος μορίου
STZ (Makaronas, 1983)

Διατροφή-ΣΔτ1

- Η συχνότητα εμφάνισης του ΣΔτ1 έχει αυξηθεί δραματικά στις ανεπτυγμένες χώρες τις τελευταίες δεκαετίες.
- Εκτός από γονιδιακούς παράγοντες, περιβαλλοντικές επιδράσεις, μεταξύ των οποίων η διατροφή, φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και στην πορεία της νόσου.
- Συνεχής αύξηση του ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων που προάγουν την ανθρώπινη υγεία, όπως μέσω της αποκατάστασης της φυσιολογικής ισορροπίας του εντερικού μικροβιώματος σε ασθενείς με μεταβολικά νοσήματα.

Εντερικό μικροβίωμα

- $\sim 1 \cdot 10^{13}$ μικροοργανισμοί συμβιώνουν στον εντερικό σωλήνα.
- Κυρίως στο παχύ έντερο (κόλον): μικροβιακός πληθυσμός σε δυναμική ισορροπία.
- Κύρια φύλα: Firmicutes και Bacteroidetes
- Άλλα φύλα: Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria



Η κατανομή της εντερικής μικροχλωρίδας κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (Clarke et al., 2019).

Εντερικό μικροβίωμα



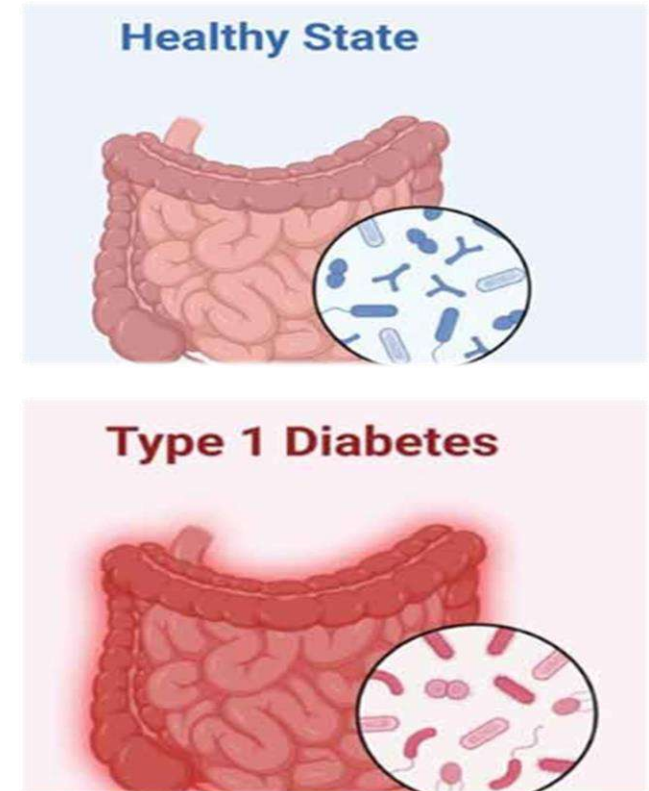
Η συσχέτιση της εντερικής δυσβίωσης με πλήθος νοσημάτων (Hou et al., 2022).



Οι βασικές λειτουργίες του Εντερικού Μικροβιώματος (Singh et al., 2021)

ΣΔτ1-μικροβίωμα

- ΣΔτ1 χαρακτηρίζεται από αλλαγές στη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος
- Διατάραξη της φυσιολογικής σύστασης του εντερικού μικροβιώματος (Δυσβίωση) συμβάλλει στην εμφάνιση και εξέλιξη του ΣΔτ1
- Το εντερικό μικροβίωμα δύναται να επηρεάσει τη φυσιολογική αλληλεπίδραση του εντέρου με το ανοσοποιητικό σύστημα και να οδηγήσει σε ανοσολογικές αποκρίσεις, με αντίκτυπο στον ΣΔτ1.



Εντερικό μικροβίωμα-Διατροφή

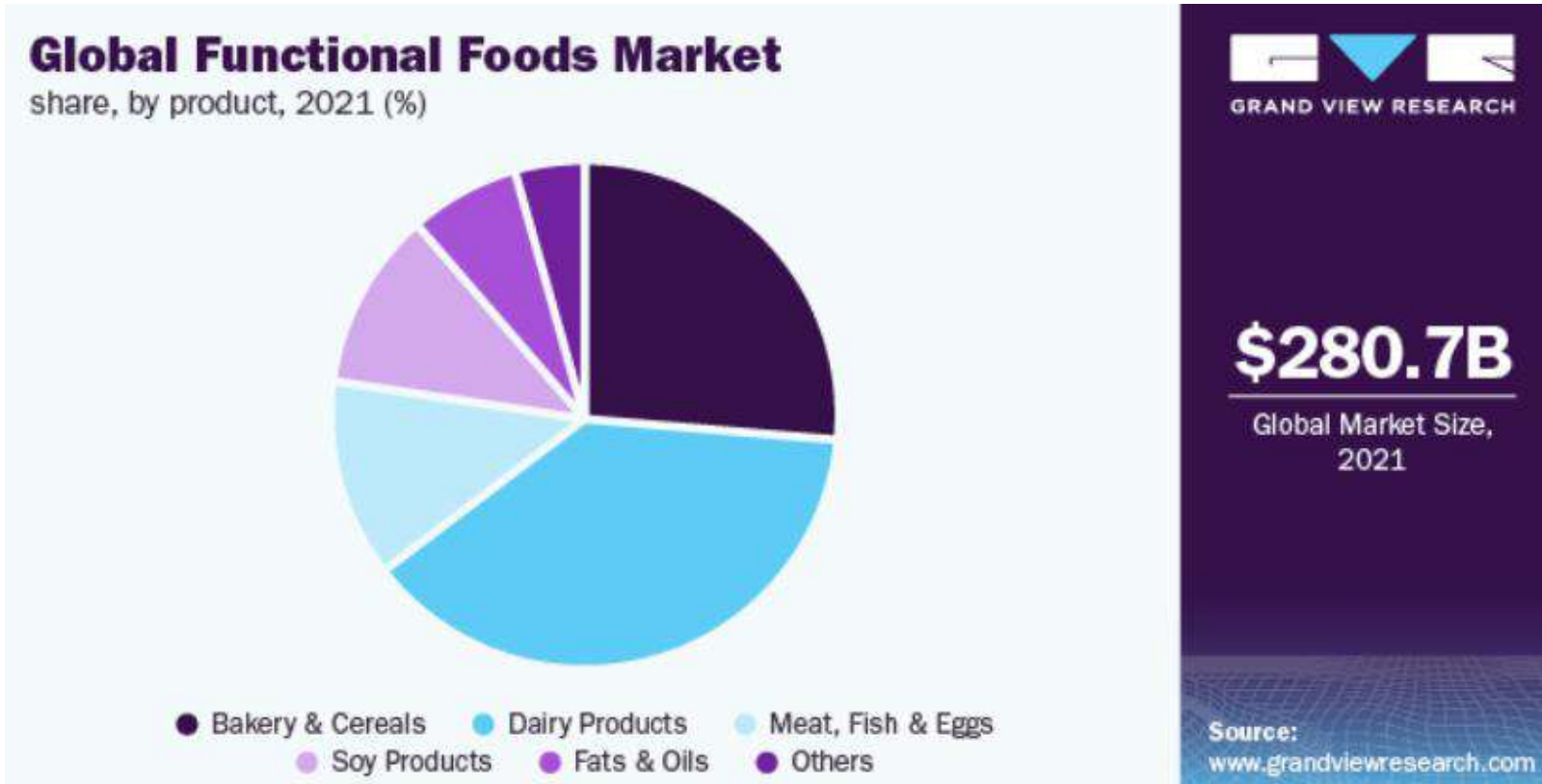
- Η διατροφή επιδρά στον ξενιστή:
 - Άμεσα
 - Μέσω αλλαγών στην εντερική μικροχλωρίδα
- Τα συστατικά της τροφής διαμορφώνουν το εντερικό μικροβίωμα.
- Τα βακτήρια του εντέρου έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν πλήθος υποστρωμάτων.

Λειτουργικά τρόφιμα

«Τρόφιμα τα οποία, πέραν της επαρκούς διατροφικής αξίας, παρέχουν ευεργετική επίδραση στις πολλαπλές λειτουργίες του σώματος με τρόπο που σχετίζεται είτε με βελτιωμένη κατάσταση της υγείας και της ευεξίας είτε με μειωμένο κίνδυνο ασθένειας» .

European Food Safety Association, EFSA

Λειτουργικά τρόφιμα



<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-functional-foods-market>

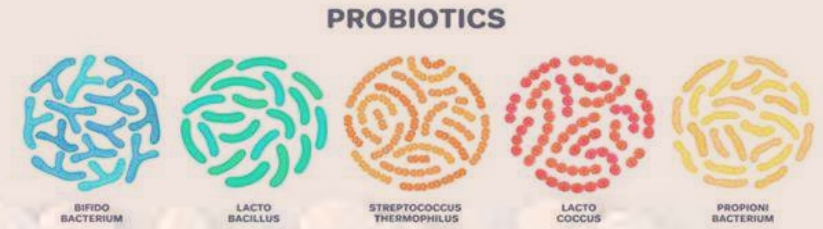
- 280.7 δισεκατομμύρια \$ (2021)
- 586.1 δισεκατομμύρια \$ έως το 2030
- ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης 8.5%

Προβιοτικά

«Μικροοργανισμοί (βακτήρια ή ζύμες), οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή».

FAO/WHO, 2002

- 77.1 δισεκατομμύρια \$ (2022)
- 220.1 δισεκατομμύρια \$ (2030)
- Ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης 14%



Grand View Research, 2023

Προβιοτικά



Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός πρέπει να:

1. είναι ζωντανός τη στιγμή της κατανάλωσης
2. διαθέτει επιστημονικά τεκμηριωμένο όφελος στην υγεία του ξενιστή
3. έχει ταξινομηθεί σε επίπεδο γένους, είδους και στελέχους
4. είναι ασφαλής για την προβλεπόμενη χρήση του

Κελυφωτό φιστίκι

- Ξηροί καρποί: απαραίτητα συστατικά μιας ισορροπημένης διατροφής.
- **Κελυφωτό Φιστίκι Αιγίνης:** βραβείο από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και χαρακτηρισμός ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ, 1994)
- Πλούσια πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως ελαϊκό οξύ), διαιτητικών ινών και φυτοχημικών.



Δυνητικές πρεβιοτικές ιδιότητες



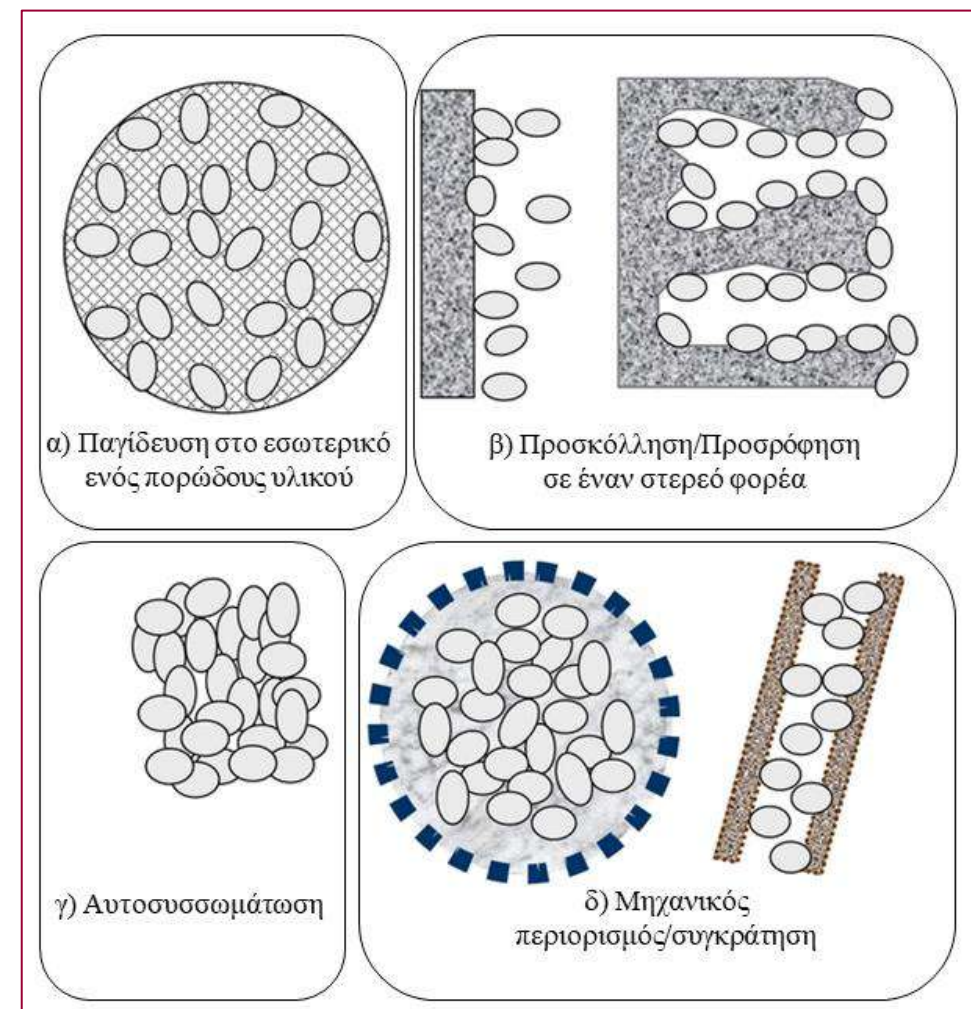
Πρεβιοτικά: πολύτιμα διατροφικά στοιχεία, μη αφομοιώσιμες ίνες που, μέσω του μεταβολισμού τους από μικροοργανισμούς στο έντερο,



ρυθμίζουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, ενισχύοντας την ανάπτυξη και τη δράση ευεργετικών ειδών.

Ακινητοποίηση κυττάρων

- Διέλευση διαμέσω του γαστρεντερικού σωλήνα
ΚΑΙ
- Υψηλές ημερήσιες δόσεις > 2-5 δισ. κύτταρα
- Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να περιέχουν προβιοτικά κύτταρα > 7 logcfu/g
- Η **ακινητοποίηση** των κυττάρων σε φυσικούς φορείς (π.χ. συστατικά τροφίμων) προτείνεται για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και τη διευκόλυνση της μετάβασης των προβιοτικών στο σημείο δράσης τους (*Mitropoulou et al. 2013*; <https://doi.org/10.1155/2013/716861>).



Σκοπός

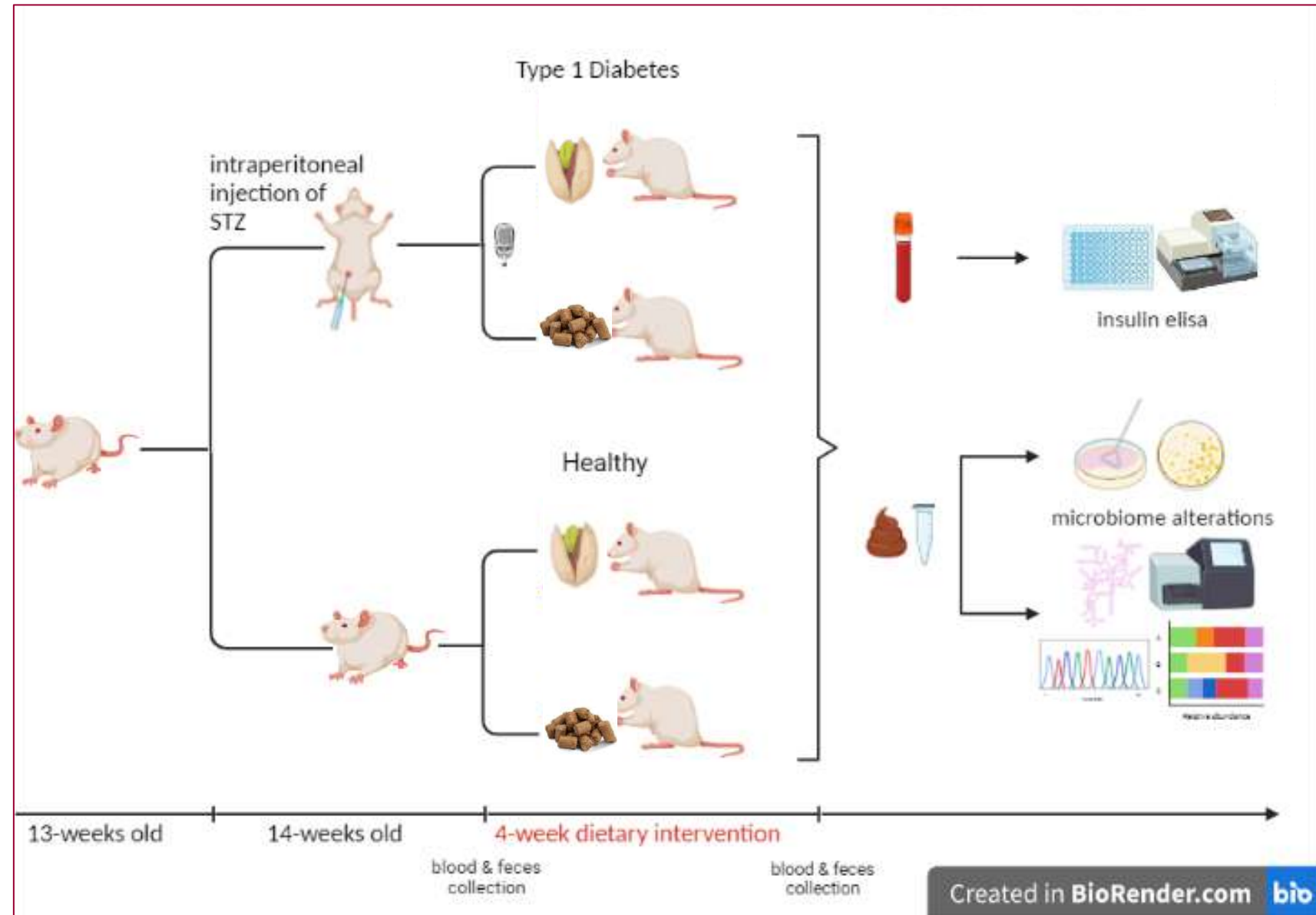
Ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη ενός λειτουργικού συστατικού τροφίμου και τελικών προϊόντων με θετικές δράσεις στην υγεία και με έμφαση στον ΣΔτ1.

Στόχοι

1. Η ακινητοποίηση λειτουργικών καλλιέργειών σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης και επίδραση α) του διαστήματος/θερμοκρασίας αποθήκευσης και β) της γαστρεντερικής πέψης, στην κυτταρική βιωσιμότητα
2. Η *in vivo* αξιολόγηση επίδρασης νέων λειτουργικών τροφίμων εμπλουτισμένων με ακινητοποιημένες λειτουργικές καλλιέργειες στο εντερικό μικροβίωμα υγιών ζωικών προτύπων και ζωικών προτύπων ΣΔτ1
3. Η παραγωγή νέων τροφίμων με ξηρές ακινητοποιημένες καλλιέργειες

Πειραματικός σχεδιασμός (1)

ΣΔ Υγιή με συμβατική δίαιτα	ΦΔ Υγιή με δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι
ΔΣΔ Διαβητικά με συμβατική δίαιτα	ΔΦΔ Διαβητικά με δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι



Πειραματικός σχεδιασμός (1)

- ❖ Υγιείς και διαβητικοί ΣΔτ1 επίμυες (ένεση διαλύματος STZ, 40mg/kg ΣΒ).
- ❖ Ο χειρισμός των ζωικών προτύπων έγινε σύμφωνα με τα Ευρωπαϊκά πρότυπα και την Ευρωπαϊκή οδηγία 2010/63 και εγκρίθηκε από την Κτηνιατρική Διεύθυνση Περιφέρειας Αττικής (2057/05-04-2017) και την ΕΗΔΕ του ΔΠΘ (49254/386/22-05-2020).
- ❖ Το πειραματικό πρωτόκολλο έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).



Διατροφική σύσταση και ενεργειακό περιεχόμενο

Διατροφική σύσταση (g/100g) και ενεργειακό περιεχόμενο (kcal/100g) διατροφικής παρέμβασης.

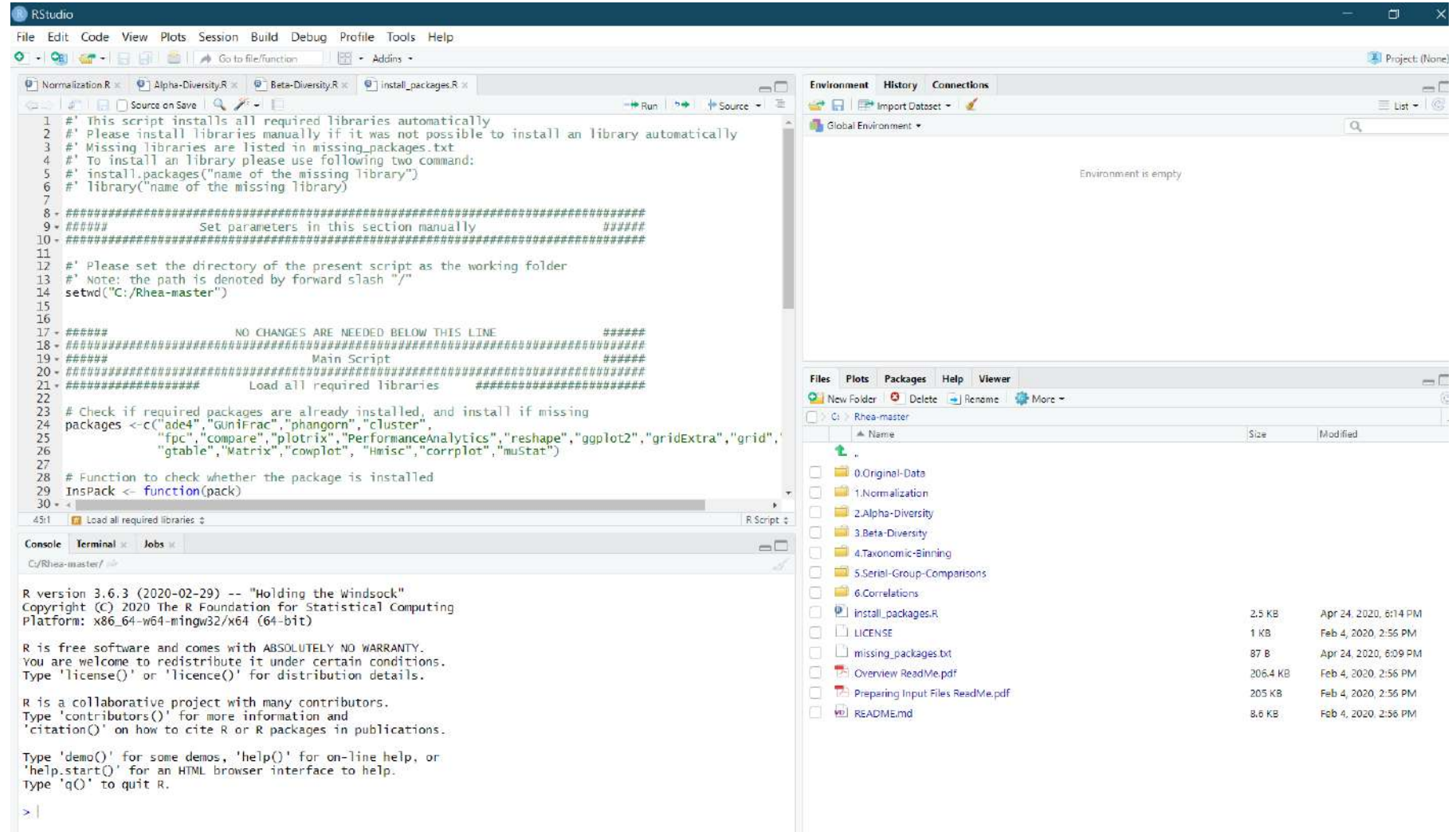
Διατροφική σύσταση & ενεργειακό περιεχόμενο	Συμβατική δίαιτα	Δίαιτα με Φιστίκι
Πρωτεΐνες	18.73	19.50
Υδατάνθρακες	39.82	38.41
Λίπος	10.00	10.00
Φυτικές ίνες	4.05	4.98
Άμυλο	37.18	35.59
Σουκρόζη	2.64	2.55
Αραβοσιτέλαιο	4.09	0.00
Κελυφωτό Φιστίκι	0.00	8.05
Ενέργεια (kcal/100g)	430.0	427.1

Απομόνωση DNA και NGS ανάλυση

- ❖ Διπλά δείγματα (duplicates) κοπράνων από την 0 και 4η εβδομάδα.
- ❖ Απομόνωση DNA με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (NucleoSpin® Stool Mini kit, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Γερμανία).
- ❖ Υπερμεταβλητή περιοχή V1-V3 του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA.
- ❖ Εκκινητές: Forward: “AGRGTTTGATCMTGGCTCAG”
Reversed: “GTNTTACNGCGGCKGCTG”
- ❖ Αλληλούχιση νέας γενιάς MiSeq Illumina από την εταιρία Mr. DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, ΗΠΑ).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων NGS

Επεξεργασία των δεδομένων της αλληλούχισης μέσω της πλατφόρμας Rhea (Lagkounardos et al., 2017) και του περιβάλλοντος R

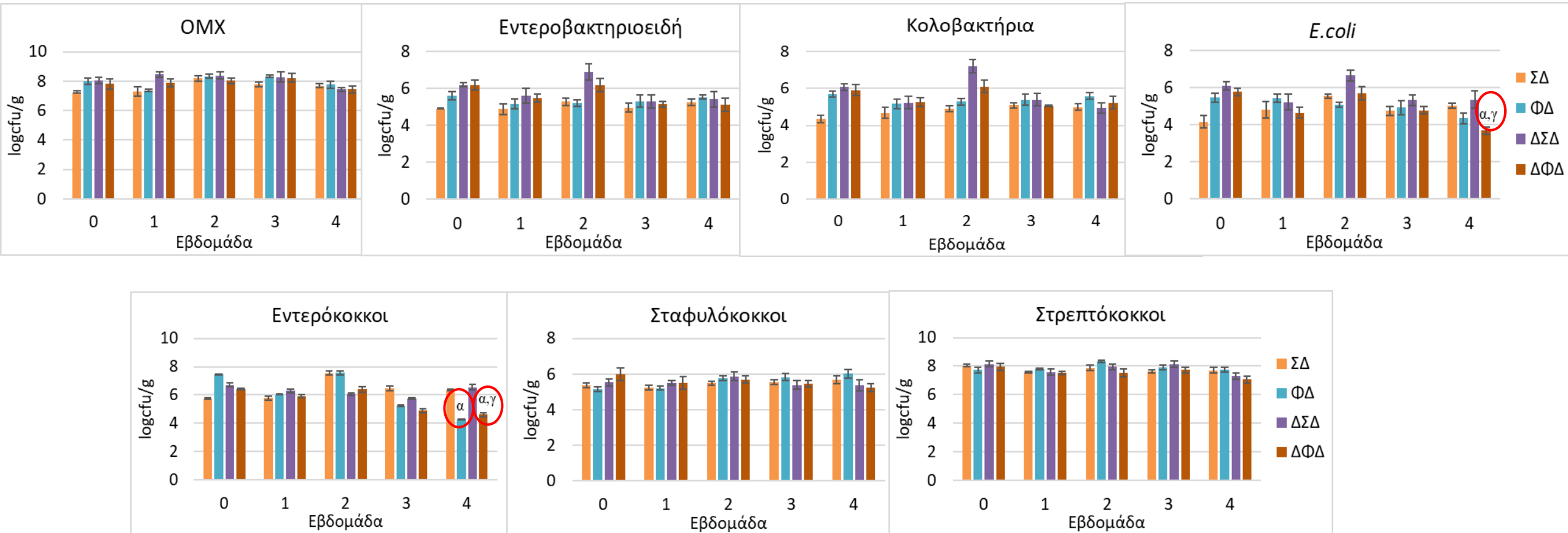


Σωματικό βάρος, Επίπεδα Ινσουλίνης & Γλυκόζης πλάσματος Βιοχημικές αναλύσεις

Εβδομάδα	ΣΔ		ΦΔ		ΔΣΔ		ΔΦΔ	
	0	4	0	4	0	4	0	4
Σωματικό βάρος (g)	412.3±12.2	410.8±11.5	412.0±10.3	409.5±8.7	357.2±15.4	333.5±16.5 ^{α,β}	377.0±17.2	326.0±8.9 ^{α,β}
Γλυκόζη (mg/dL)	124.50±5.35	106.67±2.56	123.67±8.48	112.84±4.17	352.17±39.18 ^{α,β}	345.67±75.54 ^{α,β}	403.17±39.23 ^{α,β}	503.00±60.31 ^{α,β}
Ινσουλίνη (ng/mL)	4.63±0.23	3.60±0.49	3.85±0.20	2.63±0.48	1.81±0.79 ^{α,β}	0.82±0.30 ^{α,β}	2.07±0.08 ^{α,β}	1.72±0.27 ^α
TC (mg/dL)	90.17±4.32	102.00±4.35	93.5±1.88	89.50±2.26	99.17±5.99	117.34±7.89	91.67±1.93	115.34±8.52
HDL-c (mg/dL)	71.40±1.89	80.84±2.94	69.84±4.29	74.00±1.57	68.17±3.96	84.67±4.94	73.17±4.36	87.20±5.11
TAG (mg/dL)	103.40±13.08	120.00±6.71	109.67±14.72	118.67±9.34	230.40±93.28	148.20±40.50	210.83±47.74	167.67±49.81

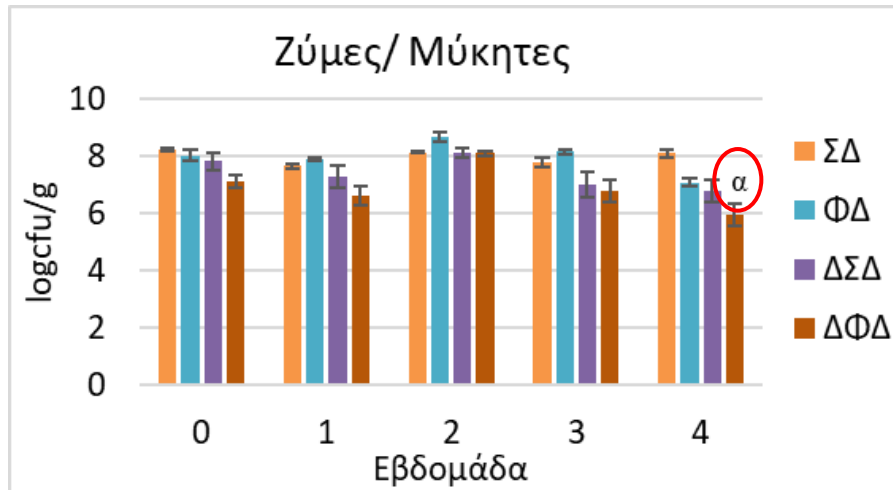
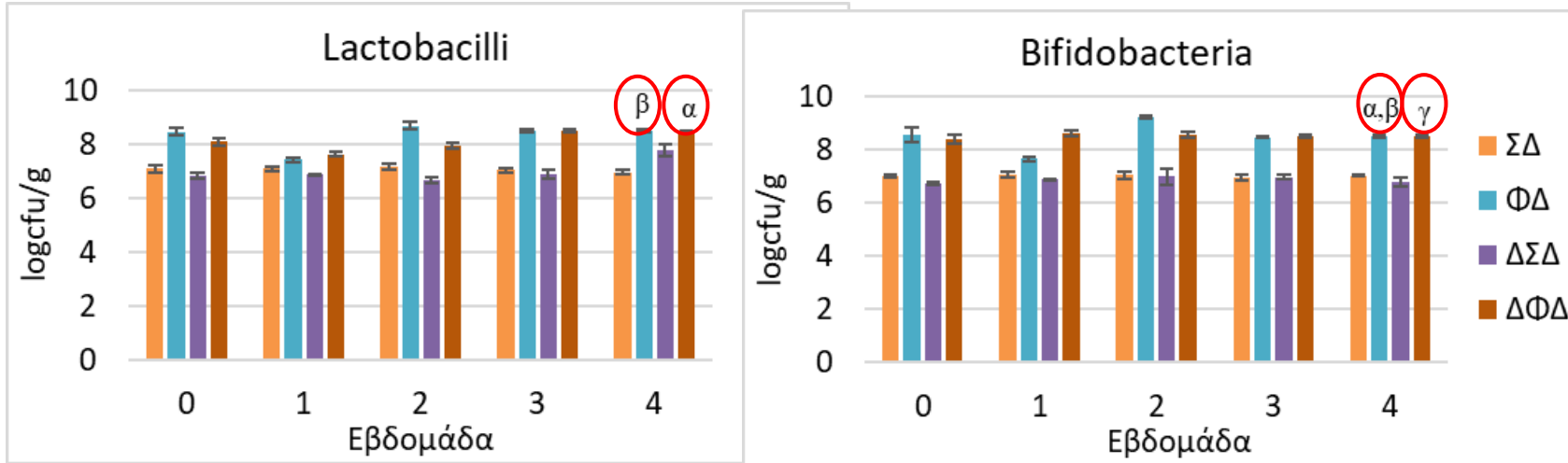
α: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΣΔ, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΦΔ. 0: εβδομάδα 0, αρχή της διατροφικής παρέμβασης και 4: 4η εβδομάδα, τέλος της παρέμβασης

Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



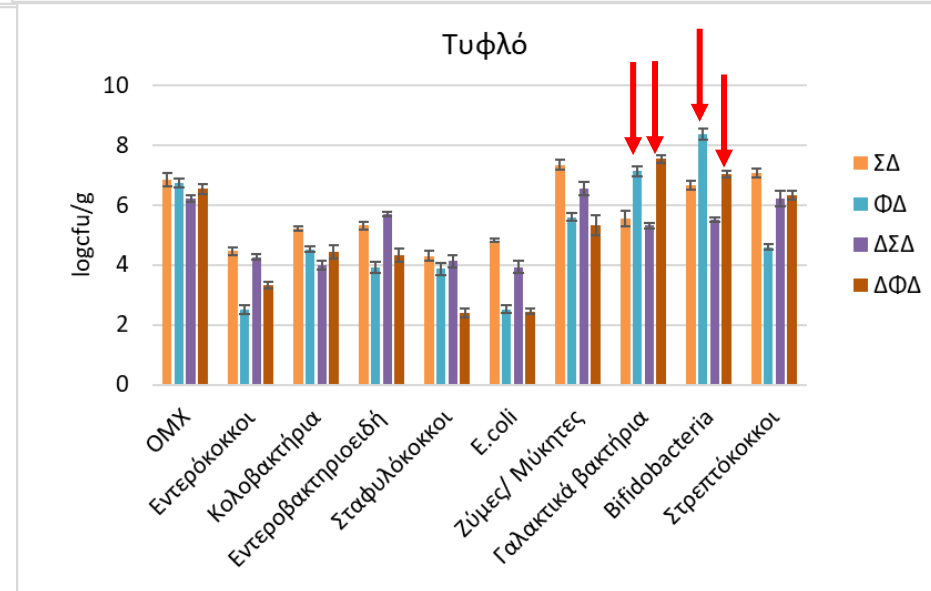
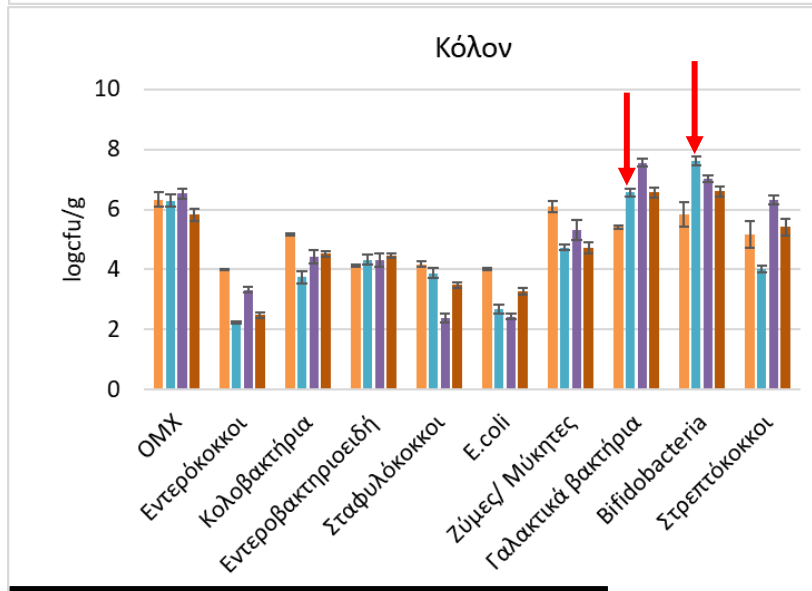
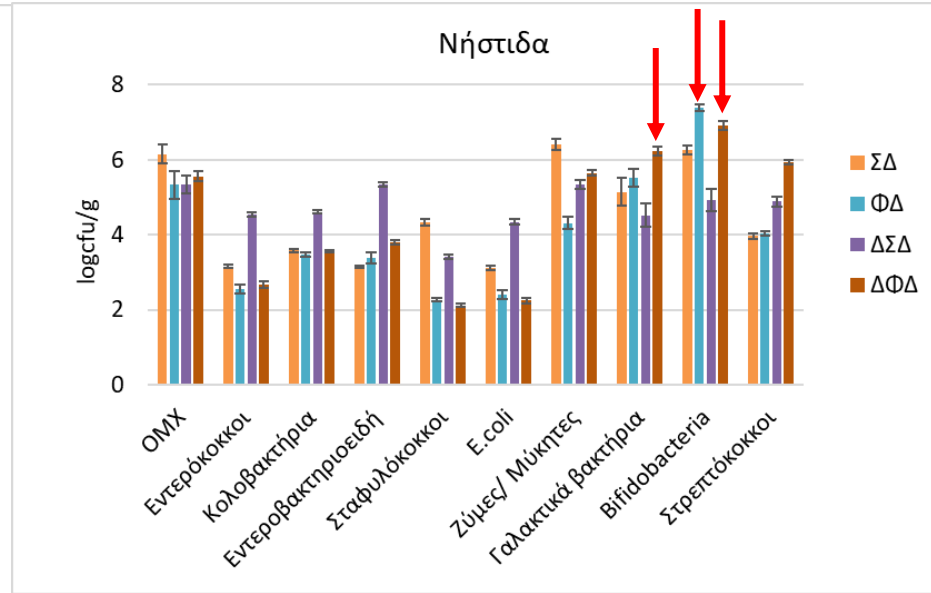
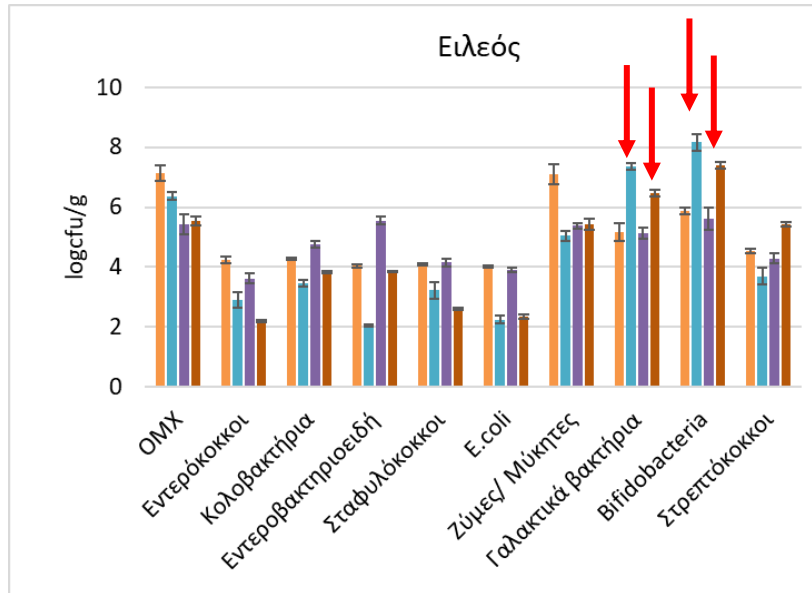
↓ Enterococci & *E.coli* στα υγιή και διαβητικά ζώα τα οποία ακολούθησαν τη διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι (4η εβδομάδα)

Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



- ↑ bifidobacteria & lactobacilli στα υγιή και διαβητικά ζώα που ακολούθησαν τη διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι (4η εβδομάδα)
- ↓ fungi στα διαβητικά ζώα που ακολούθησαν τη διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι (4η εβδομάδα)

Μικροβιολογικές αναλύσεις εντερικού ιστού

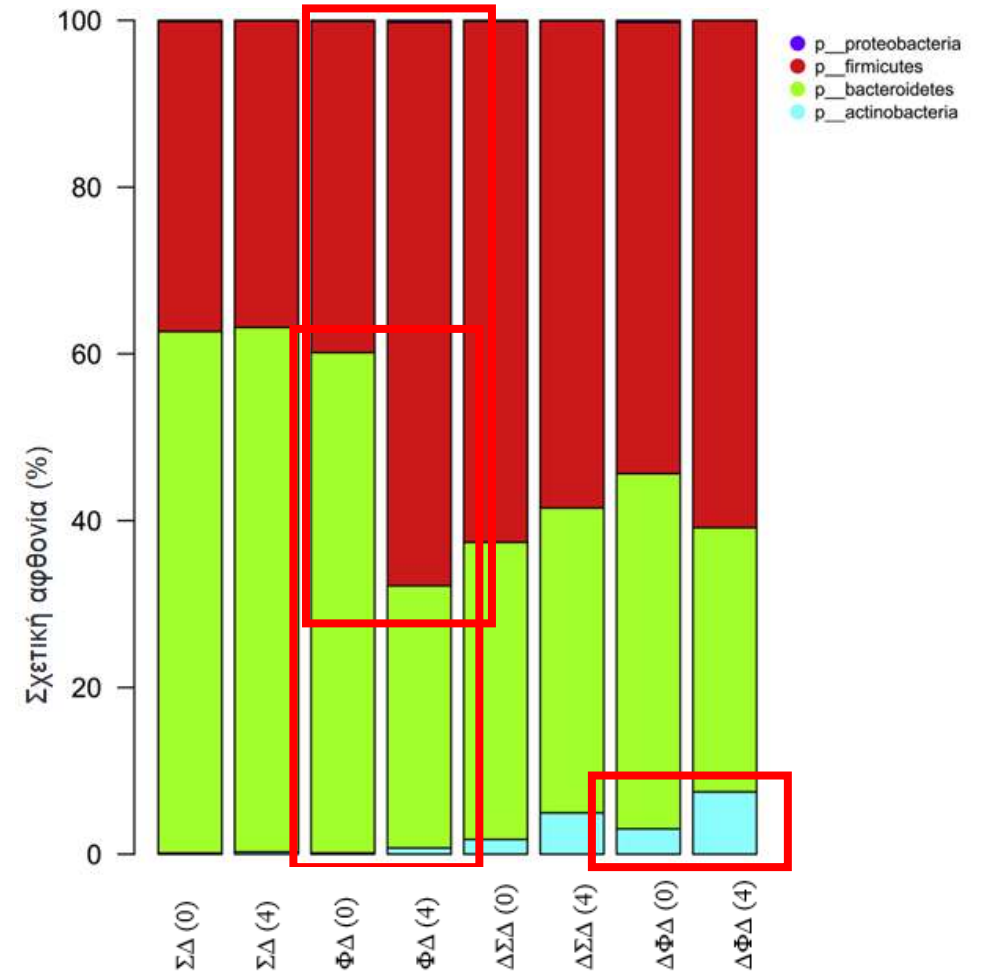


❖ ↑bifidobacteria & lactobacilli στη νήστιδα, τον ειλεό και το τυφλό σε υγιή και διαβητικά ζώα που ακολούθησαν δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι.

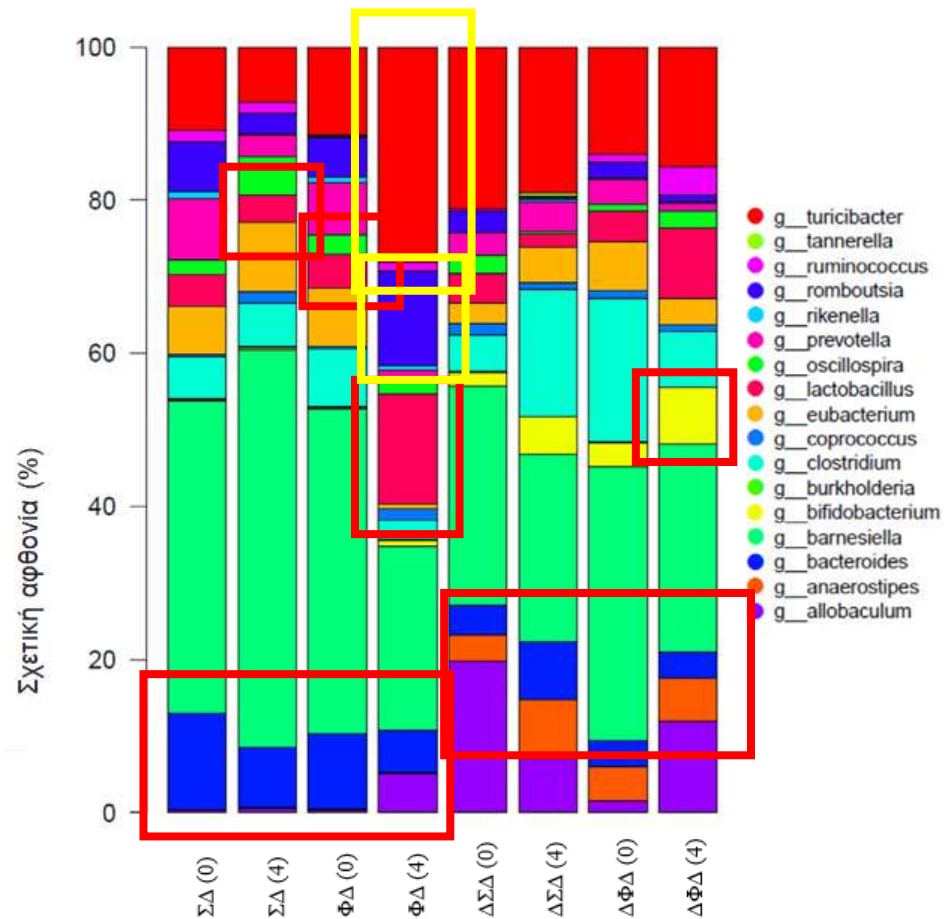
❖ ↑bifidobacteria & lactobacilli στο κόλον σε υγιή ζωικά πρότυπα που ακολούθησαν δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι.

Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο phylum

- ↑ Firmicutes & ↓ Bacteroidetes στην ομάδα ΦΔ
- ↑ Actinobacteria στην ομάδα των διαβητικών ζώων που χορηγήθηκε κελυφωτό φιστίκι



Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο genus



- ↑ *Lactobacillus* ΦΔ (εβδομάδα 4)
- ↑ *Bifidobacterium* ΔΦΔ (εβδομάδα 4)
- ↑ *Turicibacter* & *Romboutsia* ΦΔ (εβδομάδα 4)
- ↓ *Bacteroides* στα διαβητικά ζωικά πρότυπα (vs υγιή)

Ποσοτικοποίηση SCFAs & γαλακτικού οξέος

Εβδομάδα	ΣΔ		ΦΔ		ΔΣΔ		ΔΦΔ	
	0	4	0	4	0	4	0	4
Γαλακτικό οξύ	0.798±0.026	0.921±0.088	0.760±0.023	1.345±0.255 ^α	1.429±0.128	0.819±0.044 ^α	1.508±0.200	0.711±0.030 ^α
Οξικό οξύ	5.224±0.320	7.274±0.885	5.303±0.274	6.617±0.294	5.744±1.210	9.171±0.984	6.424±1.129	5.845±0.746
Προπιονικό οξύ	0.911±0.061	0.960±0.059	0.965±0.030	1.078±0.098	0.916±0.179	1.225±0.116	1.019±0.166	0.766±0.051
Ισοβουτυρικό οξύ	0.199±0.005	0.213±0.015	0.206±0.005	0.249±0.019	0.173±0.011	0.215±0.016 ^α	0.164±0.008	0.180±0.010
Βουτυρικό οξύ	0.937±0.061	0.845±0.065	0.834±0.072	0.936±0.128	0.606±0.080	0.764±0.087	0.653±0.091	0.580±0.081
Ισοβαλερικό οξύ	0.040±0.004	0.074±0.007	0.056±0.004	0.034±0.005 ^β	0.030±0.007	0.068±0.020	0.033±0.005	0.026±0.006 ^γ
Βαλερικό οξύ	0.109±0.014	0.191±0.013	0.135±0.014	0.134±0.016	0.120±0.017	0.191±0.027	0.183±0.022	0.182±0.026

ΣΔ: Υγιή ζώα με συμβατική διαίτα, ΦΔ: Υγιή ζώα με διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι, ΔΣΔ: Διαβητικά ζώα με συμβατική διαίτα, ΔΦΔ: Διαβητικά ζώα με διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι.

α: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΔΣΔ, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΣΔ, γ: $p < 0.05$ συγκριτικά με εβδομάδα 0 στο αντίστοιχο δείγμα.

Συμπεράσματα

- Το κελυφωτό φιστίκι μπορεί να επαναφέρει την ισορροπία στο εντερικό μικροβίωμα.
- Η παρουσία ευεργετικών μικροβιακών γενών (π.χ. bifidobacteria) μπορεί να ενισχυθεί με δίαιτα πλούσια σε κελυφωτό φιστίκι στο ζωικό μοντέλο ΣΔτ1 που επάγεται από στρεπτοζοτοκίνη.
- Οι αλλαγές παρατηρούνται τόσο στα δείγματα κοπράνων αλλά και στους πληθυσμούς που είναι προσκολλημένοι στα διάφορα εντερικά τμήματα
- Η κατανάλωση κελυφωτού φιστικιού οδηγεί σε αύξηση του γαλακτικού οξέος των κοπράνων σε υγιή ζωικά πρότυπα

Δημοσιεύσεις

Metabolism Open 7 (2020) 100040

Contents lists available at ScienceDirect

Metabolism Open

journal homepage: www.journals.elsevier.com/metabolism-open

ELSEVIER

Check for updates

Functional modulation of gut microbiota in diabetic rats following dietary intervention with pistachio nuts (*Pistacia vera* L.)

Amalia E. Yanni ^{a,*}, Gregoria Mitropoulou ^b, Ioanna Prapa ^b, Georgios Agrogiannis ^c, Nikolaos Kostomitsopoulos ^d, Eugenia Bezirtzoglou ^e, Yiannis Kourkoutas ^b, Vaios T. Karathanos ^a

^a Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Physical Chemistry of Foods, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, Athens, Greece
^b Laboratory of Applied Microbiology and Biotechnology, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, GR, 68100, Greece
^c First Department of Pathology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece
^d Laboratory Animal Facility, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece
^e Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

<https://doi.org/10.1016/j.metop.2020.100040>

applied sciences

MDPI

Article

Dietary Pistachio (*Pistacia vera* L.) Beneficially Alters Fatty Acid Profiles in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat

Ioanna Prapa ¹, Amalia E. Yanni ^{2,*}, Anastasios Nikolaou ¹, Nikolaos Kostomitsopoulos ³, Nick Kalogeropoulos ², Eugenia Bezirtzoglou ⁴, Vaios T. Karathanos ² and Yiannis Kourkoutas ^{1,*}

¹ Laboratory of Applied Microbiology and Biotechnology, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Dragana, 68100 Alexandroupolis, Greece; ioannaprap@gmail.com (I.P.); anikol@mbg.duth.gr (A.N.)
² Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Physical Chemistry of Foods, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, 17671 Athens, Greece; nickal@hua.gr (N.K.); vkarath@hua.gr (V.T.K.)
³ Laboratory Animal Facility, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece; nkostom@bioacademy.gr
⁴ Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Department of Medicine, Democritus University of Thrace, Dragana, 68100 Alexandroupolis, Greece; empezirt@yahoo.gr
* Correspondence: ayanni@hua.gr (A.E.Y.); ikourkou@mbg.duth.gr (Y.K.); Tel.: +30-2109-549-174 (A.E.Y.); +30-2551-030-633 (Y.K.)

[i.org/10.3390/app12094606](https://doi.org/10.3390/app12094606)

Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης

Μικροβιακά στελέχη

- *Pediococcus acidilactici* SK και *Lactiplantibacillus plantarum* F4, τα οποία επιλέχθηκαν μετά από *in vitro* αξιολόγηση των προβιοτικών τους ιδιοτήτων, στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Καινοτόμα Λειτουργικά Τρόφιμα: Ανάπτυξη, Παραγωγή, Χαρακτηρισμός, Ιδιότητες- iFUNFoods»
- *L. plantarum* B282 (στέλεχος αναφοράς)

Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης



Νιφάδες ζέας

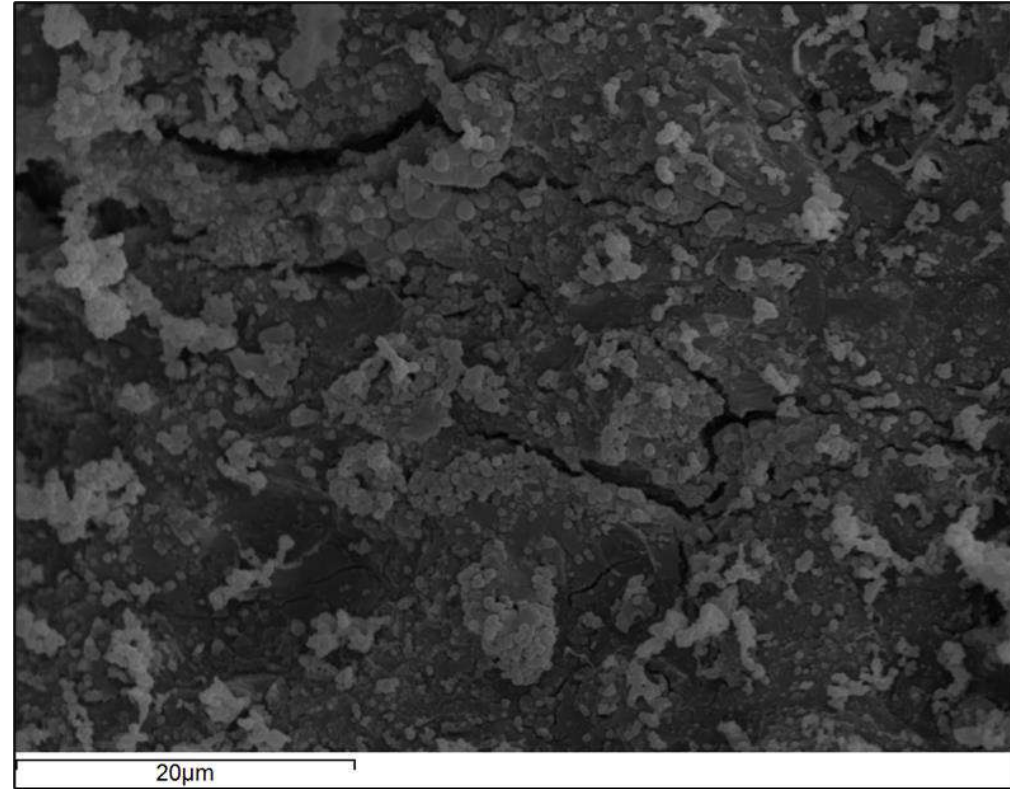
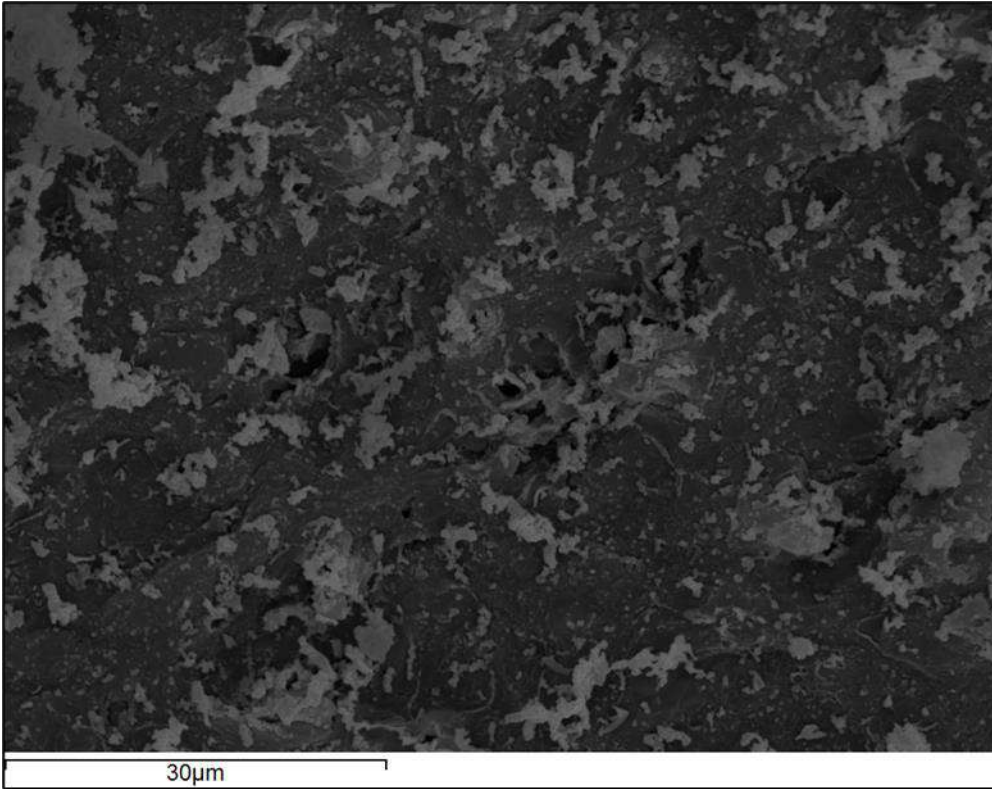


Κελυφωτό φιστίκι



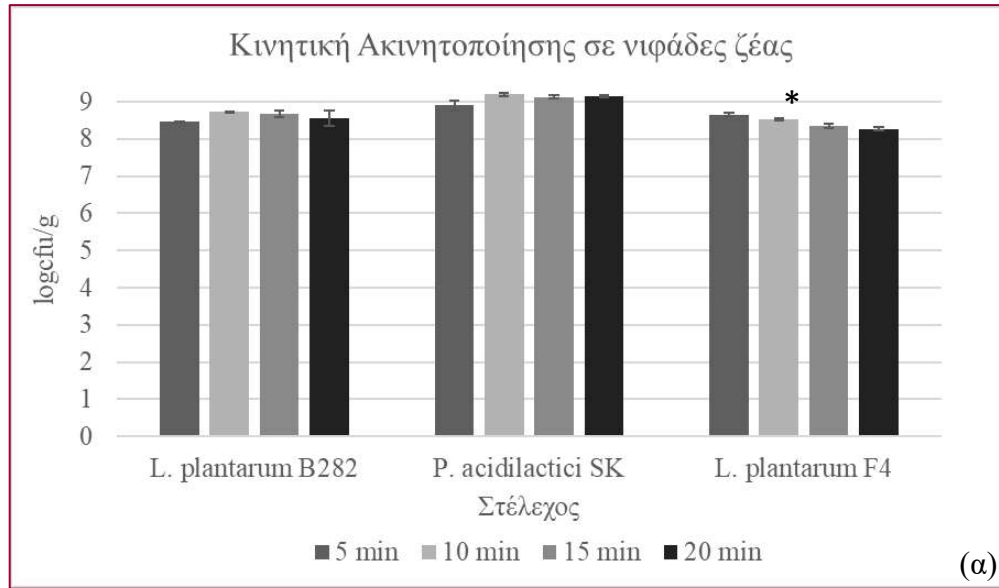
Σταφίδα

Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης



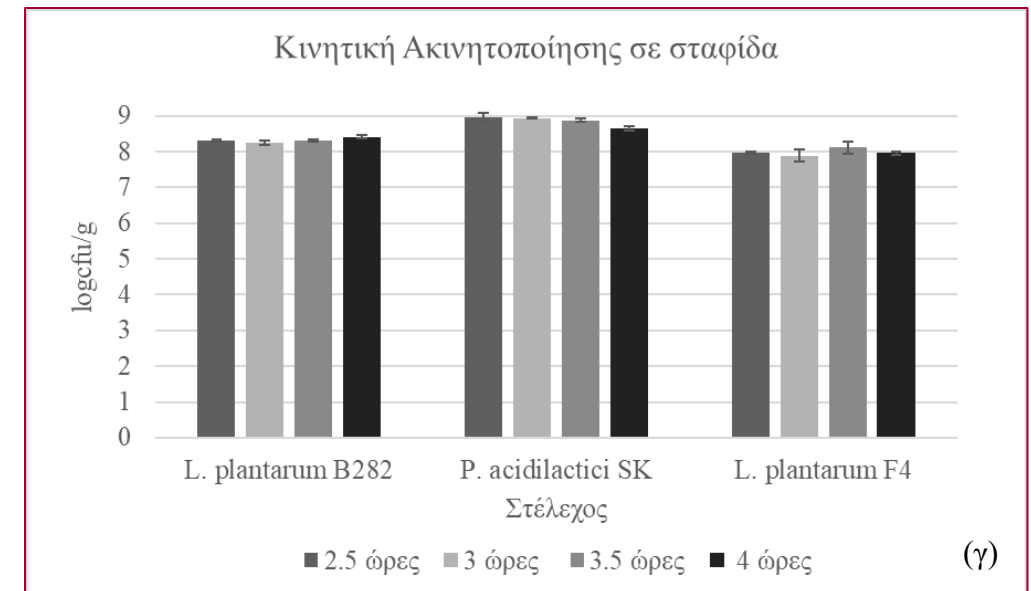
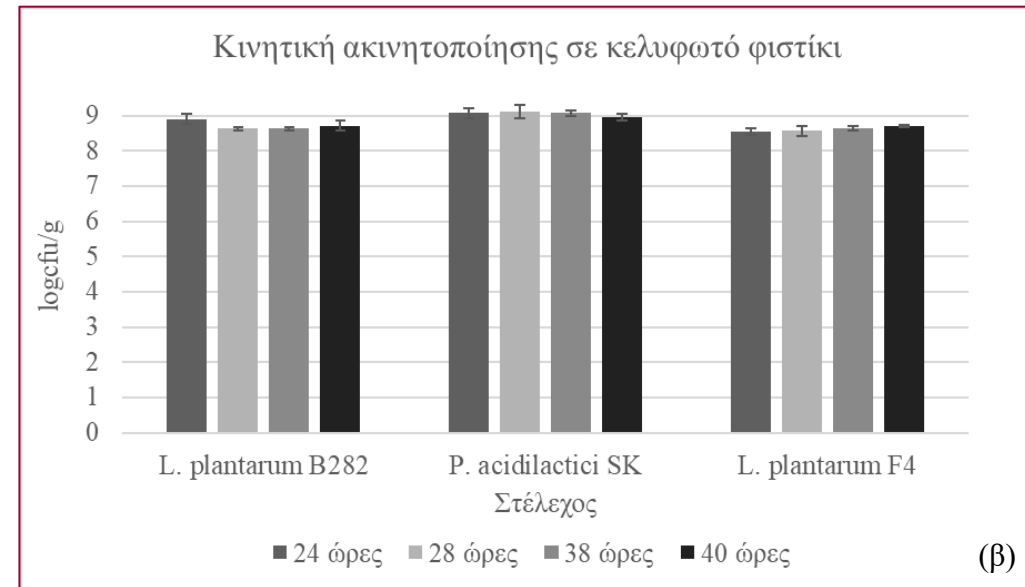
Ηλεκτρονικές μικρογραφίες ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι σε κλίμακα (α) 30μm και (β) 20μm.

Βελτιστοποίηση των παραμέτρων ακινητοποίησης (χρόνος)

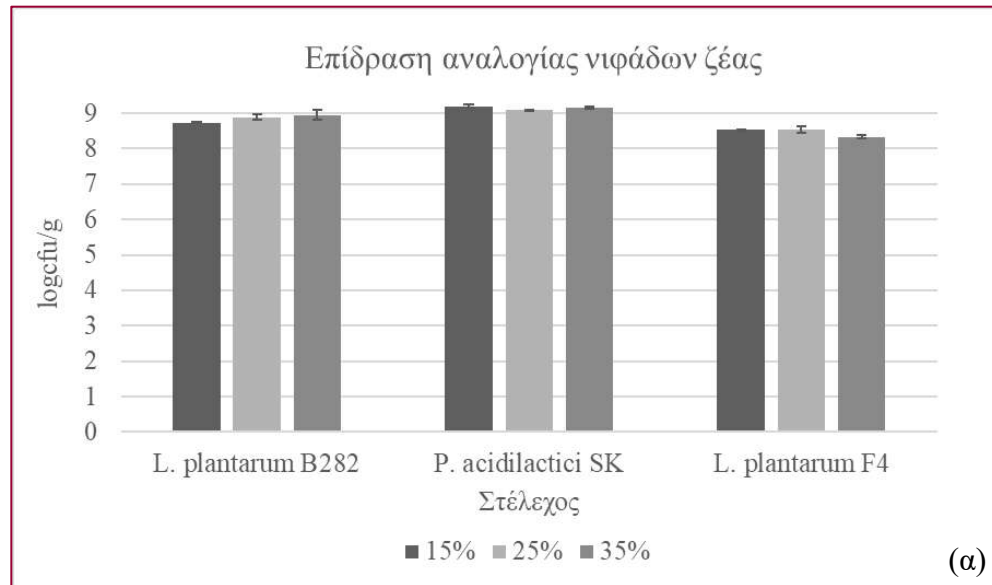


Επίδραση του χρόνου ακινητοποίησης στα επίπεδα ακινητοποιημένων κυττάρων *L. plantarum* B282, *P. acidilactici* SK και *L. plantarum* F4 σε: (α) νιφάδες ζέας, (β) κελυφωτό φιστίκι και (γ) σταφίδα Σουλτανίνα.

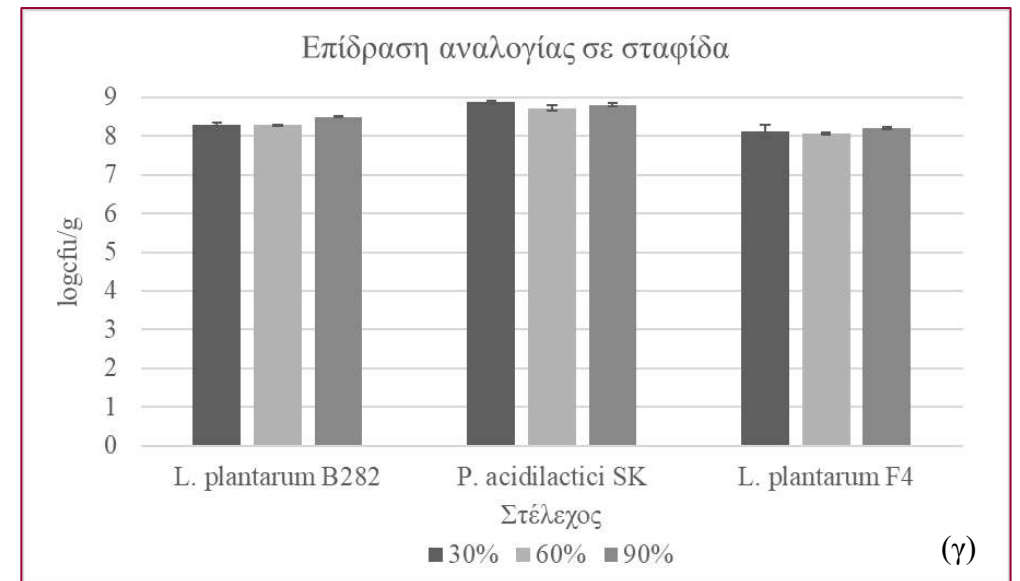
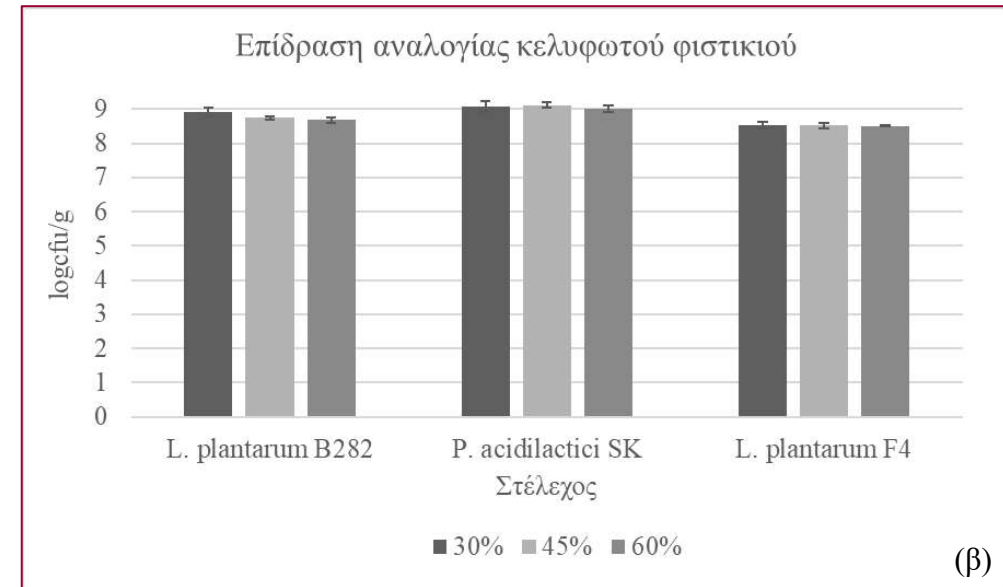
*: $p < 0.05$ συγκριτικά με χρόνο ακινητοποίησης 5min.



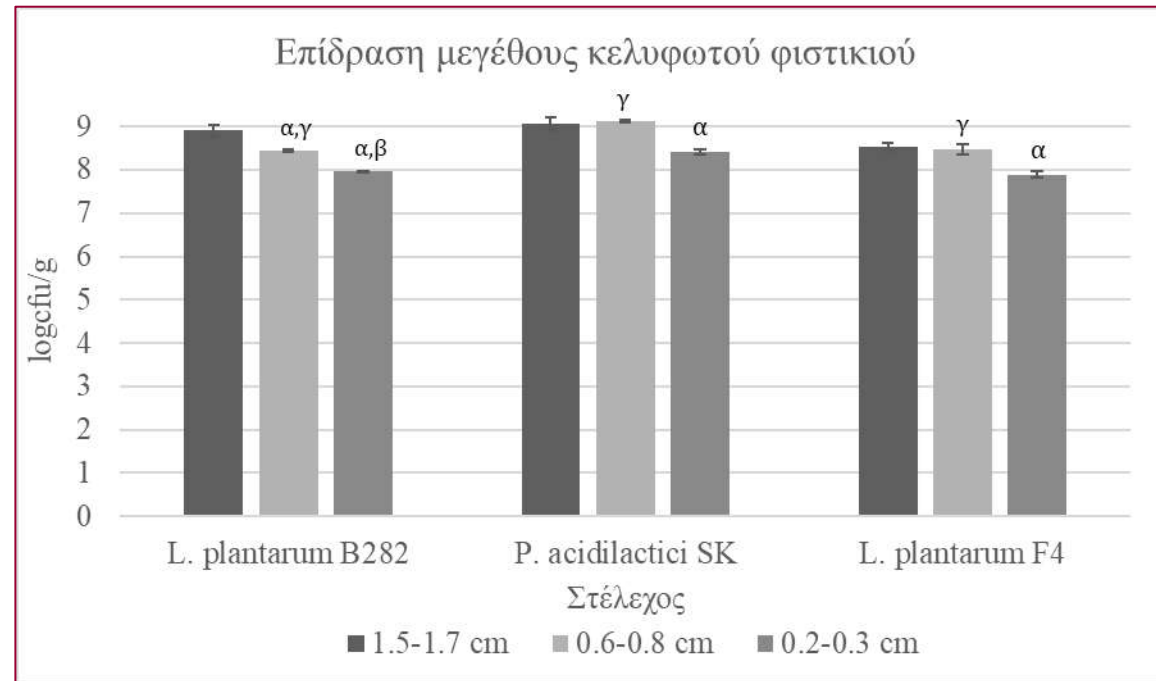
Βελτιστοποίηση των παραμέτρων ακινητοποίησης (αναλογία)



Επίδραση της αναλογίας του φορέα ακινητοποίησης στα επίπεδα ακινητοποιημένων κυττάρων *L. plantarum* B282, *P. acidilactici* SK και *L. plantarum* F4 σε: (α) νιφάδες ζέας, (β) κελυφωτό φιστίκι και (γ) σταφίδα Σουλτανίνα.



Βελτιστοποίηση των παραμέτρων ακινητοποίησης (μέγεθος)



Επίδραση του μεγέθους φορέα ακινητοποίησης στα επίπεδα ακινητοποιημένων κυττάρων *L. plantarum* B282, *P. acidilactici* SK και *L. plantarum* F4 σε κελυφωτό φιστίκι

α: $p < 0.05$ συγκριτικά με κομμάτια 1.5-1.7 cm, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με κομμάτια 0.6-0.8 cm, γ: $p < 0.05$ συγκριτικά με κομμάτια 0.2-0.3 cm.

Επίδραση της λυοφιλίωσης στα κυτταρικά επίπεδα

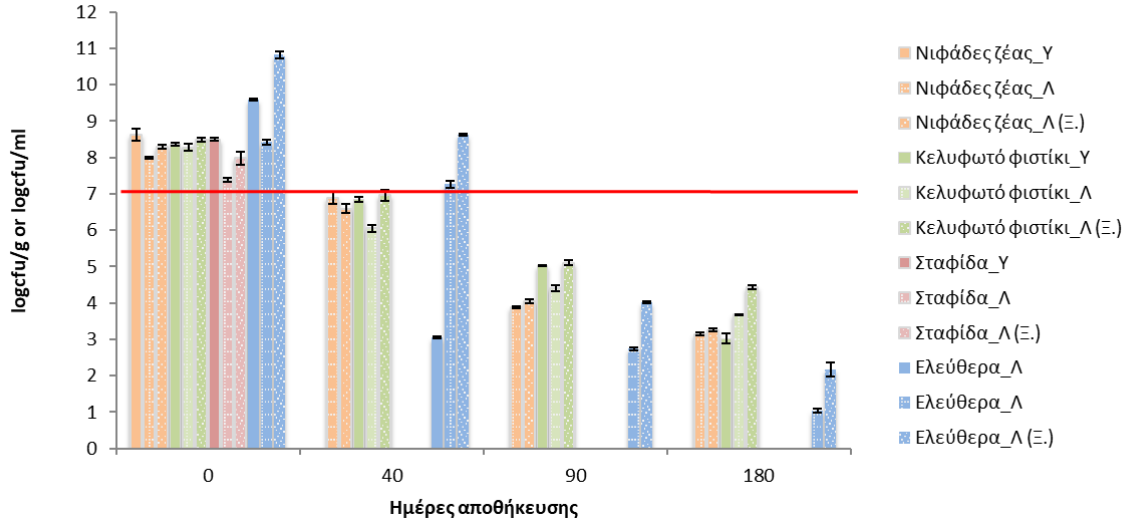
		Ακίνητοποιημένα κύτταρα σε φορείς			Ελεύθερα κύτταρα
		Νιφάδες ζέας	Κελυφωτό φιστίκι	Σταφίδα	
<i>L. plantarum</i> B282	Υ	8.63±0.17	8.37±0.03	8.50±0.01	9.59±0.03
	Λ (Ξ.)	8.30±0.06	8.49±0.08	7.98±0.04	10.82±0.10
	Λ	7.99±0.03*	8.27±0.13	7.38±0.05	8.42±0.08
	% επιβίωση	92.6±0.3**	98.8±0.2	86.8±0.6**	87.8±0.8**
<i>P. acidilactici</i> SK	Υ	8.97±0.01	9.01±0.01	8.81±0.05	9.68±0.03
	Λ (Ξ.)	9.04±0.06	8.99±0.06	8.02±0.17	11.40±0.10
	Λ	8.28±0.30*	8.49±0.10*	7.35±0.14*	9.07±0.08*
	% επιβίωση	92.3±0.4	94.3±0.5	83.5±1.6**	93.7±0.8
<i>L. plantarum</i> F4	Υ	8.33±0.04	8.24±0.02	8.20±0.03	9.33±0.04
	Λ (Ξ.)	8.46±0.09	8.35±0.10	7.77±0.15	11.35±0.03
	Λ	8.18±0.03	8.16±0.04	7.38±0.04*	8.81±0.01*
	% επιβίωση	98.2±0.4**	99.0±0.5**	89.9±0.4**	94.4±0.1

Υγρή καλλιέργεια (Υγρά) μετά την ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο MRS, λυοφιλωμένη καλλιέργεια πριν [Λ. (Ξ)] και μετά (Λ) από επανενυδάτωση.

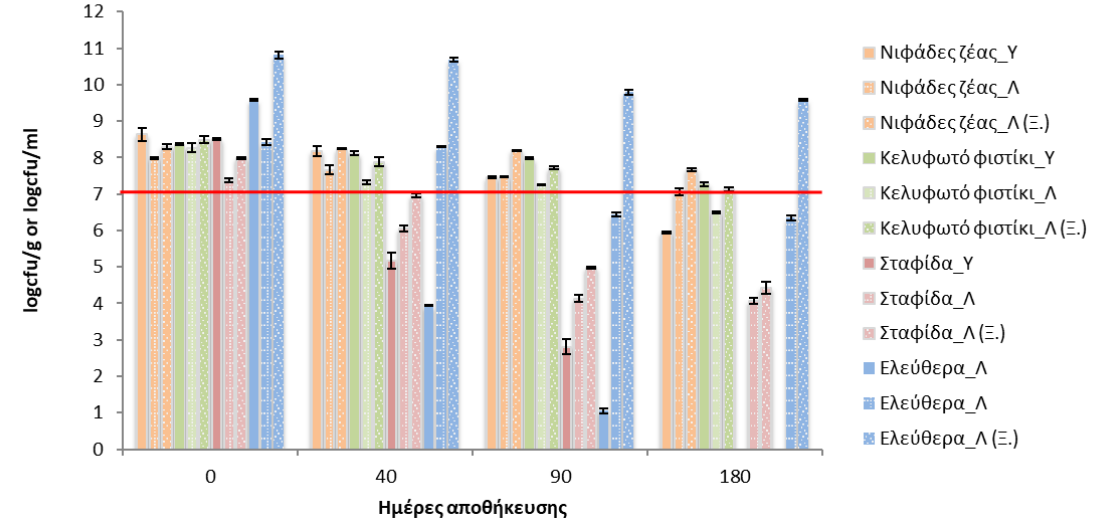
*: $P < 0.05$ συγκριτικά με Υγρά κύτταρα, **: $P < 0.05$ συγκριτικά με ελεύθερα κύτταρα.

Επίδραση της αποθήκευσης στα κυτταρικά επίπεδα

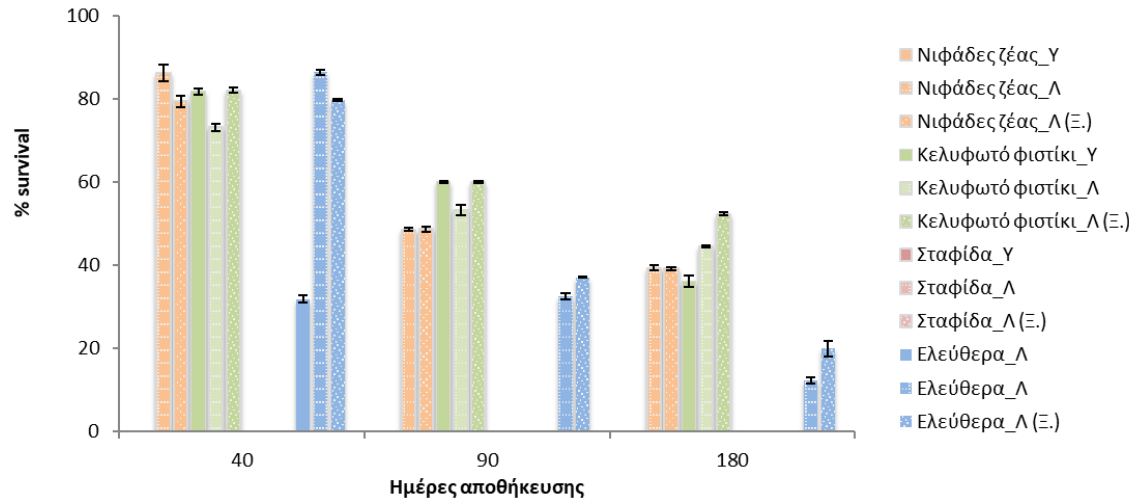
Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου *L. plantarum* B282



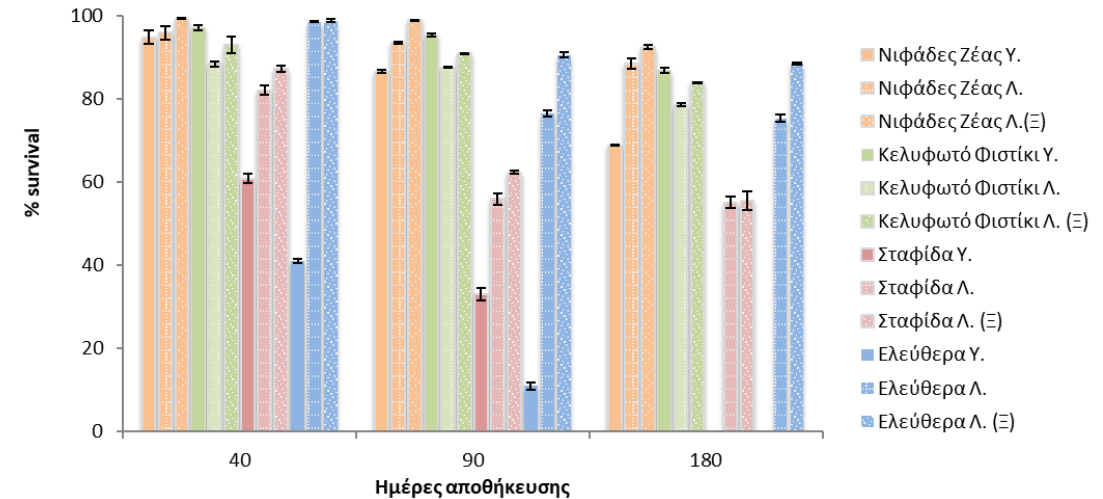
Αποθήκευση στους 4°C *L. plantarum* B282



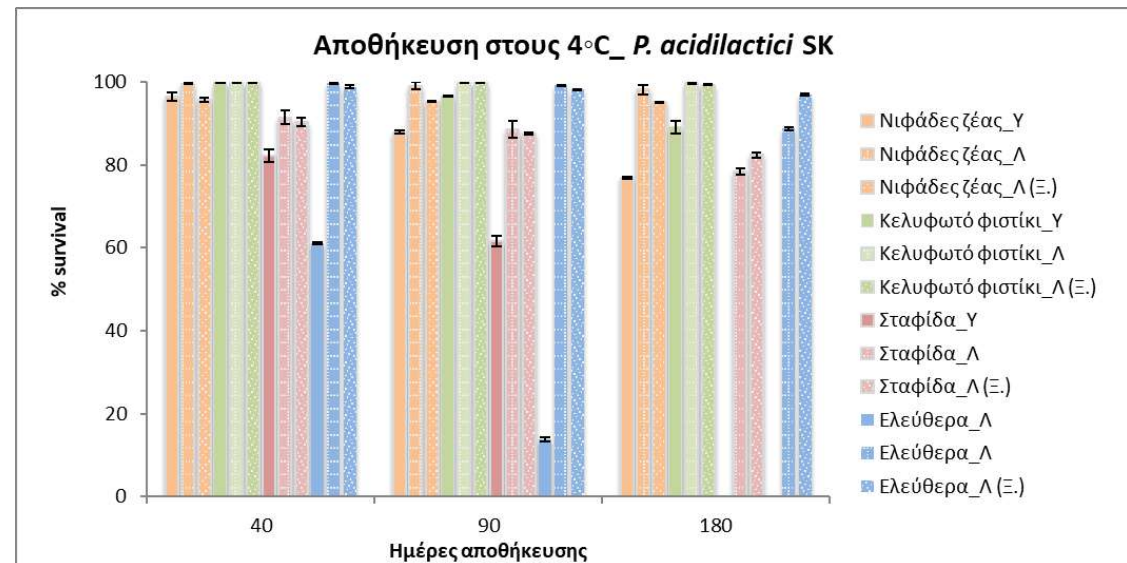
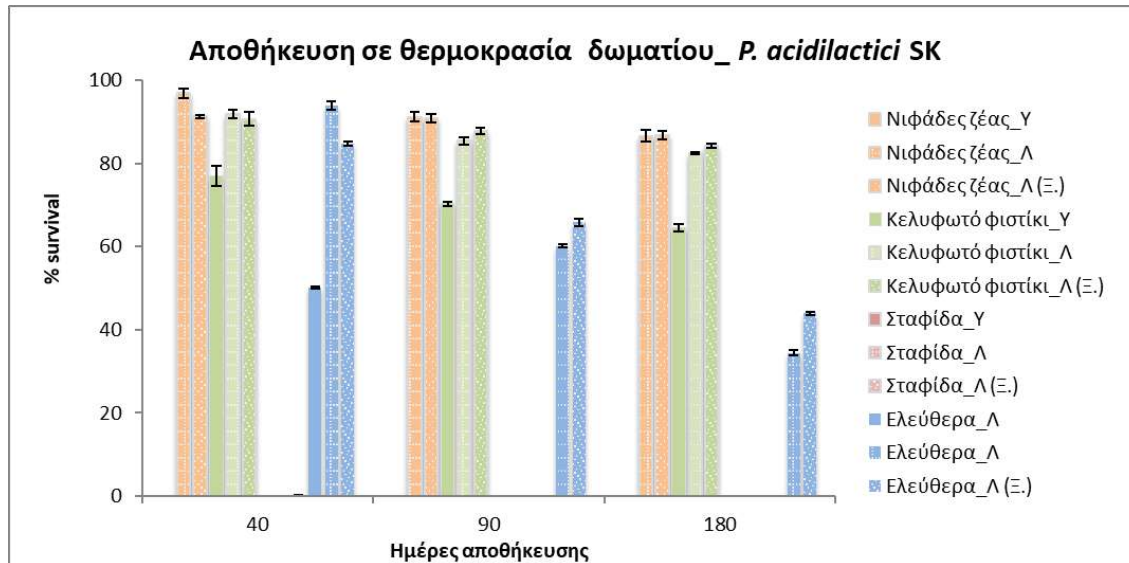
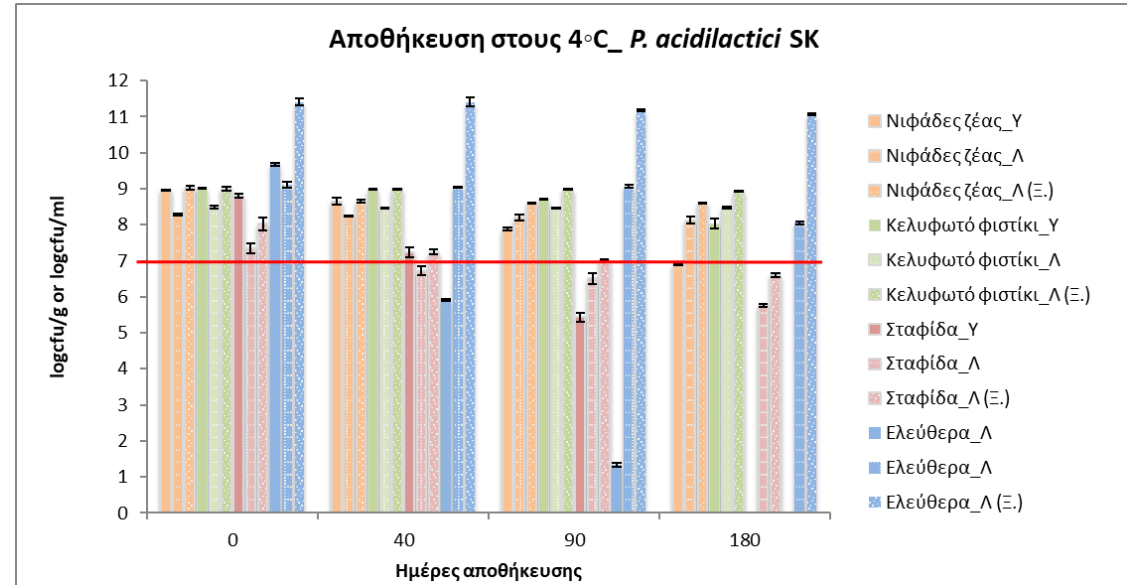
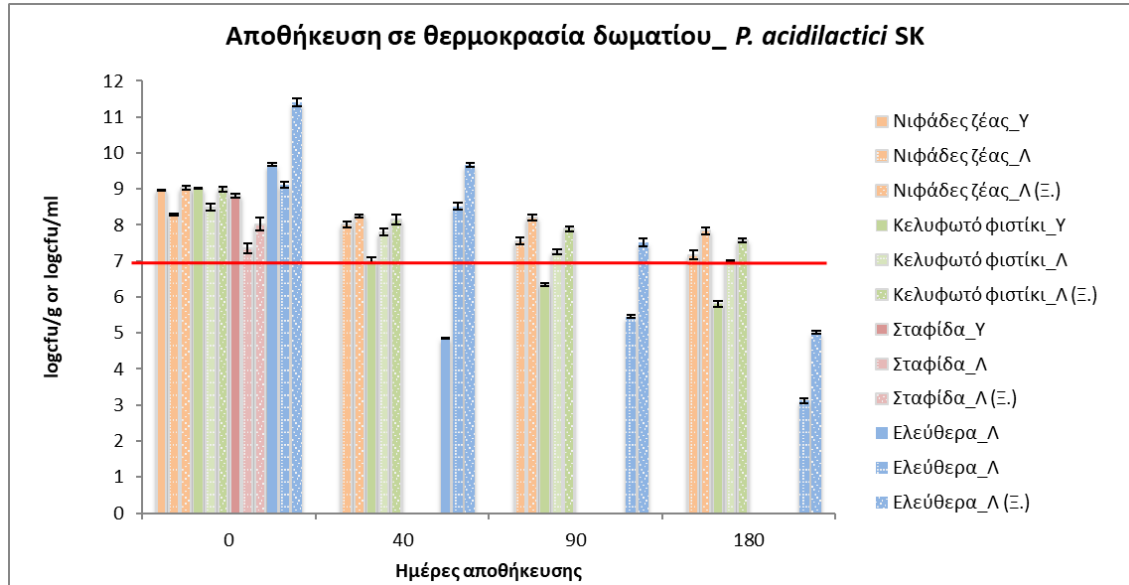
Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου *L. plantarum* B282



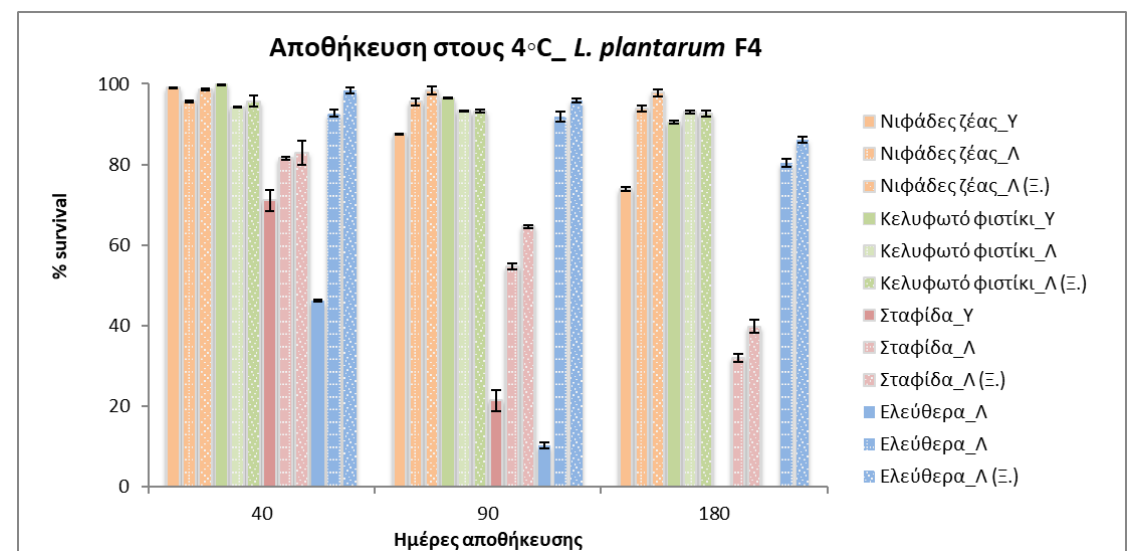
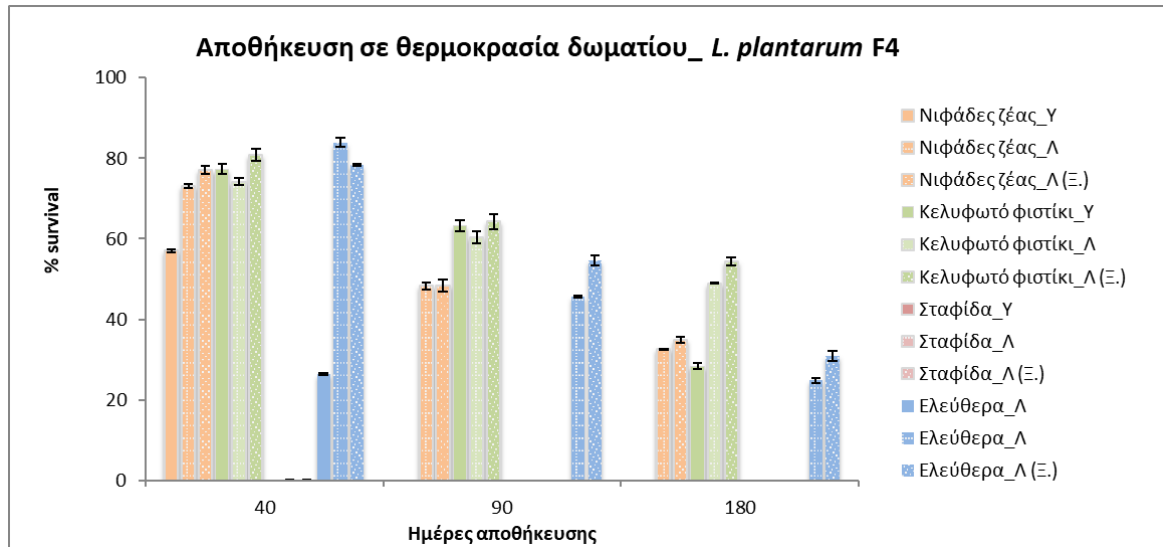
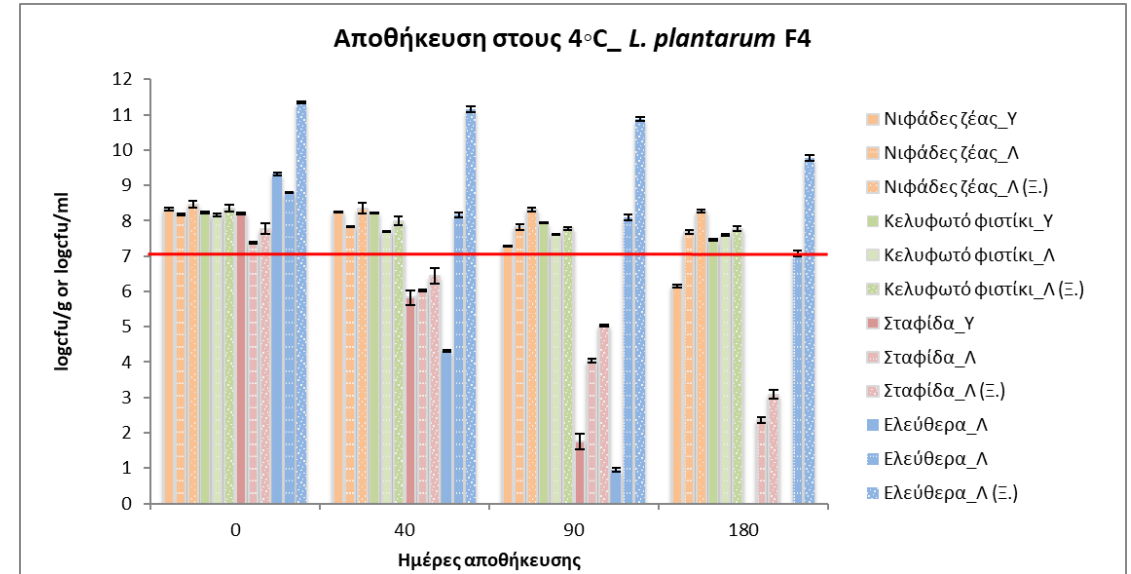
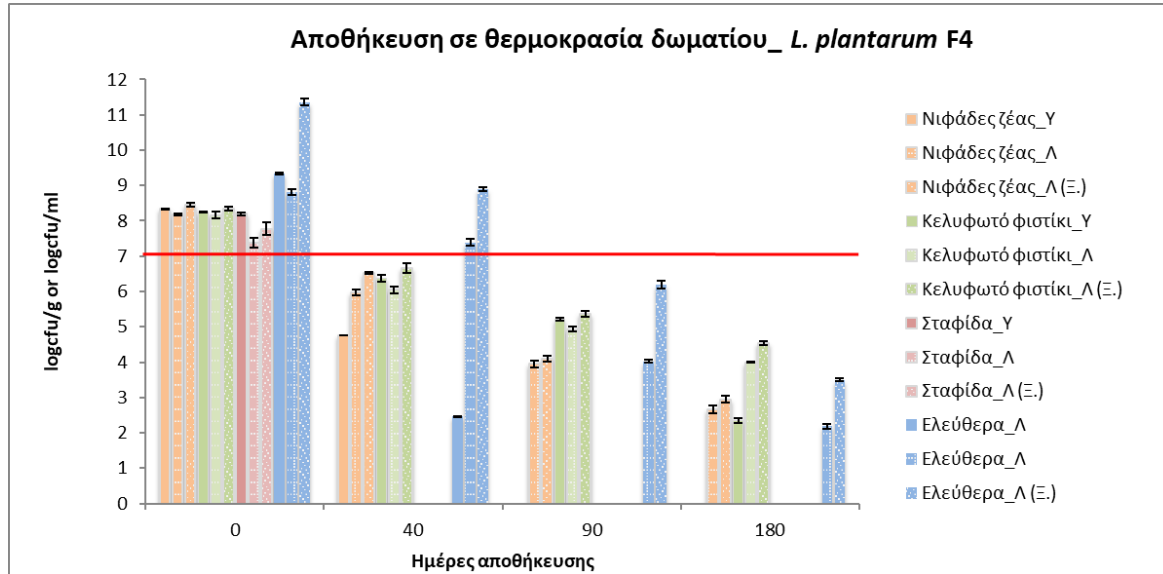
Αποθήκευση στους 4°C *L. plantarum* B282



Επίδραση της αποθήκευσης στα κυτταρικά επίπεδα



Επίδραση της αποθήκευσης στα κυτταρικά επίπεδα



Συμπεράσματα

- Η ακινητοποίηση κυττάρων *L. plantarum* B282, *P. acidilactici* SK και *L. plantarum* F4 σε νιφάδες ζέας, κελυφωτό φιστίκι και σταφίδα οδήγησε σε συγκεντρώσεις $>7 \log \text{cfu/g}$
- Υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης στα ακινητοποιημένα σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα, κατά την αποθήκευση έως 6 μήνες.
- Η ακινητοποίηση σε κελυφωτό φιστίκι και σε νιφάδες ζέας οδήγησε σε υψηλή βιωσιμότητα για διάστημα έως και 6 μήνες αποθήκευσης.
- Τα υψηλότερα κυτταρικά επίπεδα ακινητοποιημένων κυττάρων καταγράφηκαν για το στέλεχος *P. acidilactici* SK σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις.
- Η λυοφιλίωση ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι οδήγησε στο υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης (99.7%) σε θερμοκρασία ψυγείου, σε σχέση με τους υπόλοιπους φορείς και με τα ελεύθερα κύτταρα.

Δημοσίευση



Article

Developing Stable Freeze-Dried Functional Ingredients Containing Wild-Type Presumptive Probiotic Strains for Food Systems

Ioanna Prapa ^{1,*} , Anastasios Nikolaou ¹ , Panayiotis Panas ², Chrysoula Tassou ³ and Yiannis Kourkoutas ^{1,*}

¹ Laboratory of Applied Microbiology and Biotechnology, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Dragana, 68100 Alexandroupolis, Greece

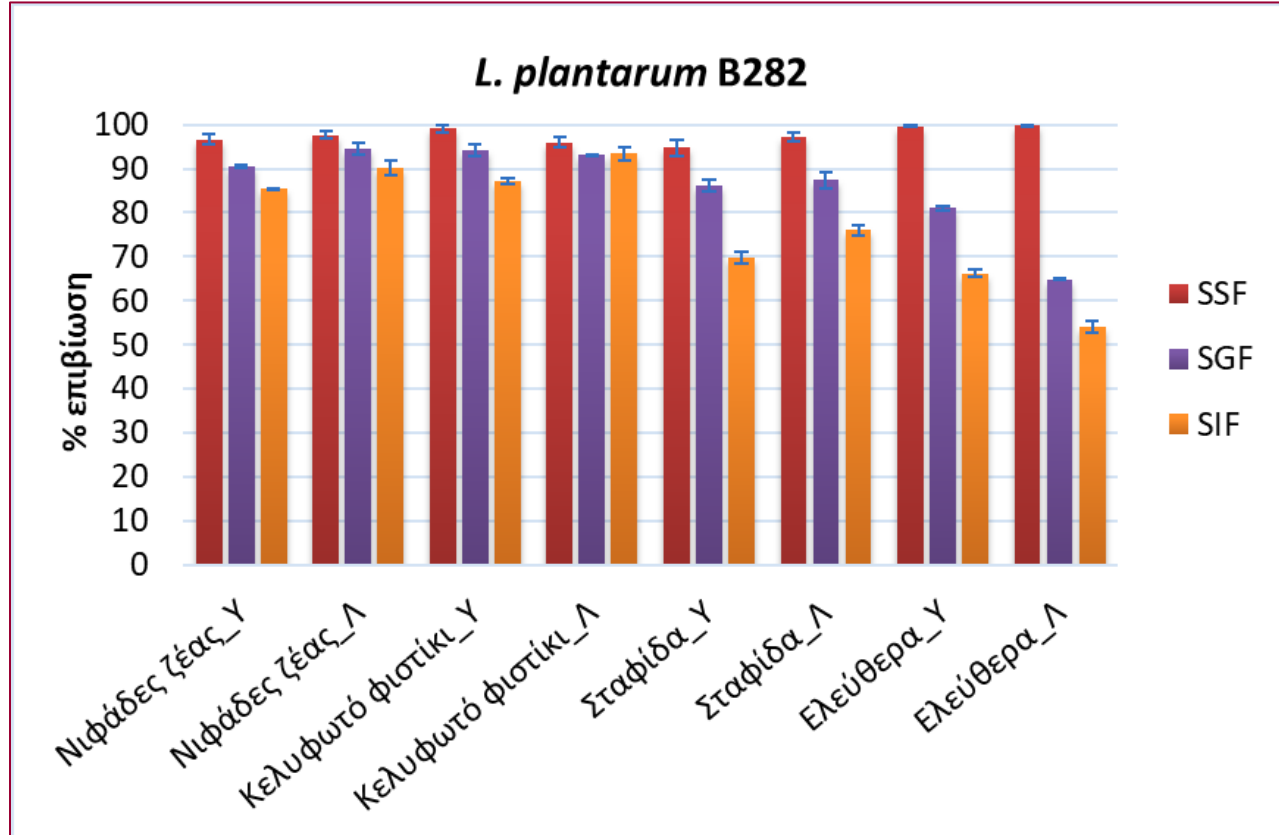
² QLCon, N.E.O. Patron-Athinon 57, 26442 Patras, Greece

³ Institute of Technology of Agricultural Products, Hellenic Agricultural Organization DIMITRA, 14123 Lycovrissi, Greece

* Correspondence: iprapa@mbg.duth.gr (I.P.); ikourkou@mbg.duth.gr (Y.K.); Tel.: +30-2551-030-703 (I.P.); +30-2551-030-633 (Y.K.)

<https://doi.org/10.3390/app13010630>

Έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης μετά από *in vitro* στατικό μοντέλο γαστρεντερικής πέψης

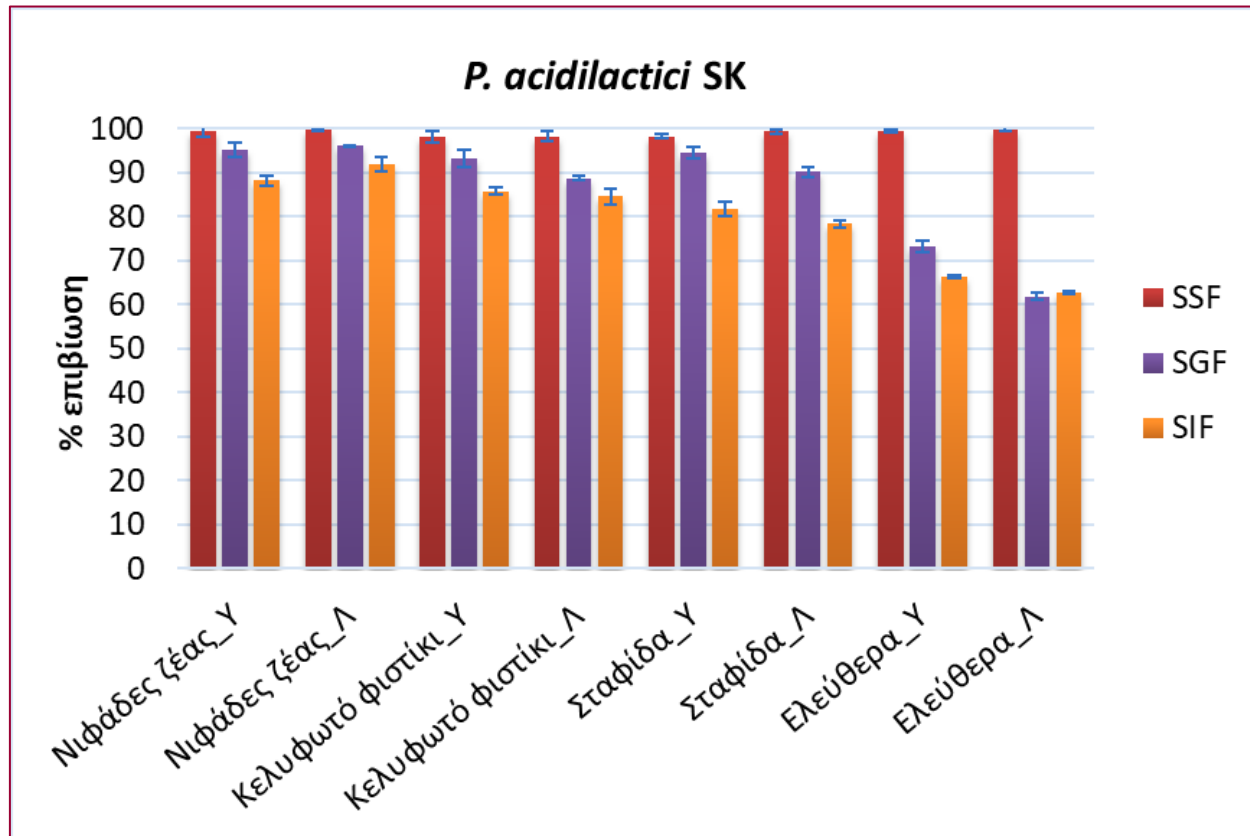


SSF: Simulated Salivary Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στοματικής κοιλότητας),
SGF: Simulated Gastric Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στόμαχου),
SIF: Simulated Intestinal Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης εντερικής φάσης).

- Μετά το SGF:
υγρά ελεύθερα > λυοφιλιωμένα
ελεύθερα
Ακίνητοποιημένα > ελεύθερα
- Μετά το SIF:
Λυοφιλιωμένα ακίνητοποιημένα > Υγρά
υγρά ελεύθερα > λυοφιλιωμένα
ελεύθερα

90.17% και 93.47% επιβίωση στα λυοφιλιωμένα ακίνητοποιημένα κύτταρα *L. plantarum* B282 σε νιφάδες ζέας και κελυφωτό φιστίκι, αντίστοιχα.

Έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης μετά από *in vitro* στατικό μοντέλο γαστρεντερικής πέψης



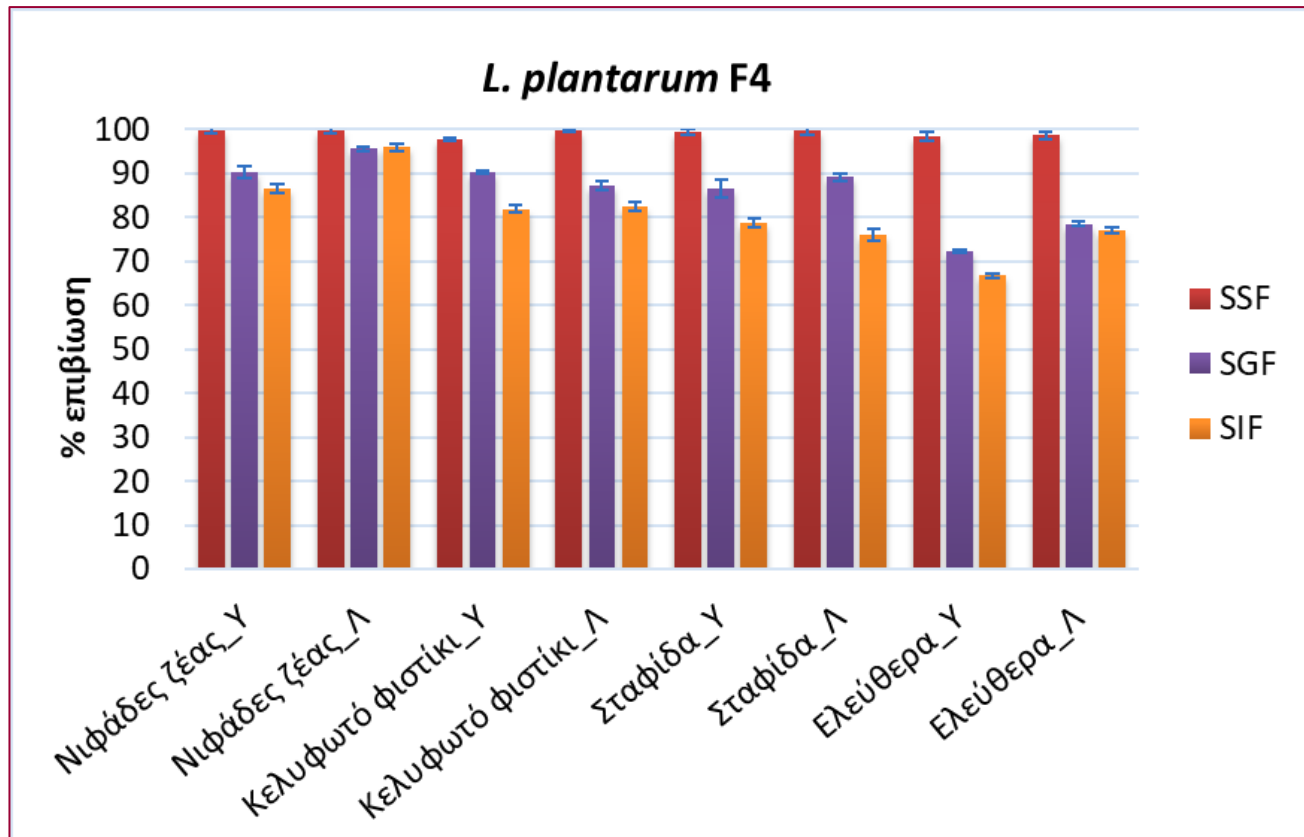
SSF: Simulated Salivary Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στοματικής κοιλότητας),
SGF: Simulated Gastric Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στόμαχου),
SIF: Simulated Intestinal Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης εντερικής φάσης).

- Μετά το SGF:
υγρά ελεύθερα > λυοφιλιωμένα
ελεύθερα

- Μετά το SIF:
ακίνητοποιημένα > ελεύθερα

91.97% στα λυοφιλιωμένα
ακίνητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici*
SK σε νιφάδες ζέας

Έλεγχος της κυτταρικής επιβίωσης μετά από *in vitro* στατικό μοντέλο γαστρεντερικής πέψης



SSF: Simulated Salivary Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στοματικής κοιλότητας),
SGF: Simulated Gastric Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης στόμαχου),
SIF: Simulated Intestinal Fluid (Διάλυμα προσομοίωσης εντερικής φάσης).

- Μετά το SGF:
Ακίνητοποιημένα > ελεύθερα
Λυοφιλιωμένα > Υγρά
- Μετά το SIF:
Λυοφιλιωμένα ελεύθερα > υγρά
ελεύθερα
ακίνητοποιημένα (νιφάδες ζέας,
κελυφωτό φιστίκι) > ελεύθερα

95.91% στα λυοφιλιωμένα
ακίνητοποιημένα κύτταρα *L. plantarum*
F4 σε νιφάδες ζέας

Συμπεράσματα

- Η επώαση στο διάλυμα προσομοίωσης στοματικής κοιλότητας δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης ανεξάρτητα από την κατάσταση ή την φύση των κυττάρων.
- Η επώαση στα διαλύματα προσομοίωσης στομάχου και εντέρου οδήγησε στην εμφάνιση σημαντικά υψηλότερων ποσοστών επιβίωσης στα ακινητοποιημένα σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, ενώ μεταξύ υγρών και λυοφιλιωμένων εμφανίστηκαν διαφορές σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.
- Παρατηρήθηκαν διαφορές ανάλογα με τον φορέα ακινητοποίησης, όπου τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα σε νιφάδες ζέας ή κελυφωτό φιστίκι.
- Τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης ήταν 95.91% για τα λυοφιλιωμένα κύτταρα σε νιφάδες ζέας, 91.97% για τα λυοφιλιωμένα κύτταρα σε νιφάδες ζέας και 90.17- 93.47% για τα λυοφιλιωμένα κύτταρα σε νιφάδες ζέας / κελυφωτό φιστίκι, για τα στελέχη *L. plantarum* F4, *P. acidilactici* SK και *L. plantarum* B282, αντίστοιχα.

Οργανοληπτική
αξιολόγηση
δημητριακών
πρωινού τύπου
muesli με
ακινητοποιημένα
κύτταρα *P.
acidilactici* SK



Συστατικό	Ακινητοποιημένα κύτταρα <i>P. acidilactici</i> SK	
		%
Νιφάδες ζέας	+	20
Κελυφωτό φιστίκι	+	15
Σταφίδα	+	5
Νιφάδες βρώμης	-	40
Γκότζι μπέρι	-	10
Ηλιόσπορος	-	10



Εργαστήριο Εφαρμοσμένης
Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Διδακτορική διατριβή Πράπα Ιωάννα

Οργανοληπτικός έλεγχος δημητριακών τύπου muesli

Ηλικία:

Φύλο:

Καταναλώνετε muesli: ποτέ/σπάνια/συχνά/καθημερινά

Γενική αξιολόγηση	142	Παρατηρήσεις	217	Παρατηρήσεις
Εμφάνιση (1-10)				
Χρώμα (1-10)				
Άρωμα (1-10)				
Υφή (1-10)				
Τραγανότητα (1-10)				

Γεύση	142	Παρατηρήσεις	217	Παρατηρήσεις
Γλυκό (1-10)				
Πικρό (1-10)				
Αλμυρό (1-10)				
Ξινό (1-10)				
Ουδέτερο (1-10)				
Στυφό (1-10)				

	142	Παρατηρήσεις	217	Παρατηρήσεις
Συνολική εκτίμηση (1-10)				

Θα αγοράζατε το προϊόν 142; Ναι/Όχι

Θα αγοράζατε το προϊόν 217; Ναι/Όχι

Οργανοληπτική αξιολόγηση δημητριακών πρωινού τύπου muesli με ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK

Γενικά χαρακτηριστικά	Δημητριακά τύπου muesli	
	χωρίς κύτταρα	με <i>P.acidilactici</i> SK
Εμφάνιση	7.85 ± 1.52	8.77 ± 1.30
Χρώμα	7.85 ± 1.72	8.69 ± 1.49
Άρωμα	5.23 ± 3.22	5.15 ± 3.34
Υφή	7.92 ± 1.66	7.77 ± 1.96
Τραγανότητα	7.85 ± 1.68	7.38 ± 2.43
Συνολική εκτίμηση	8.15 ± 0.90	8.00 ± 1.63

Χαρακτηριστικό γεύσης	Δημητριακά τύπου muesli	
	χωρίς κύτταρα	με <i>P. acidilactici</i> SK
Γλυκό	5.31 ± 2.14	5.38 ± 2.18
Πικρό	1.69 ± 1.18	1.69 ± 1.38
Αλμυρό	2.62 ± 2.22	2.77 ± 2.62
Ξινό	1.77 ± 1.17	1.54 ± 0.88
Ουδέτερο	5.00 ± 3.11	4.62 ± 2.69
Στυφό	4.62 ± 3.10	4.08 ± 2.84



Επίδραση της αποθήκευσης στα επίπεδα κυττάρων *P. acidilactici* SK σε δημητριακά πρωινού τύπου muesli.

Ημέρες αποθήκευσης	Θερμοκρασία δωματίου		Θερμοκρασία ψυγείου (4°C)	
	logcfu/g	% επιβίωση	logcfu/g	% επιβίωση
0	8.73±0.06	ΔΥ	8.73±0.06	ΔΥ
15	8.64±0.04	99.22±0.16	8.68±0.00	99.67±0.32
30	8.57±0.01 ^α	98.21±0.09	8.72±0.01 ^β	99.89±0.07 ^β
60	8.50±0.03 ^α	97.34±0.34	8.67±0.01 ^β	99.28±0.08 ^β
90	8.33±0.04 ^α	95.43±0.49	8.48±0.01 ^{α,β}	97.15±0.16 ^β
180	8.06±0.03 ^α	92.33±0.31	8.29±0.02 ^{α,β}	94.96±0.18 ^β

α: $p < 0.05$ συγκριτικά ημέρα 0, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου την αντίστοιχη ημέρα.



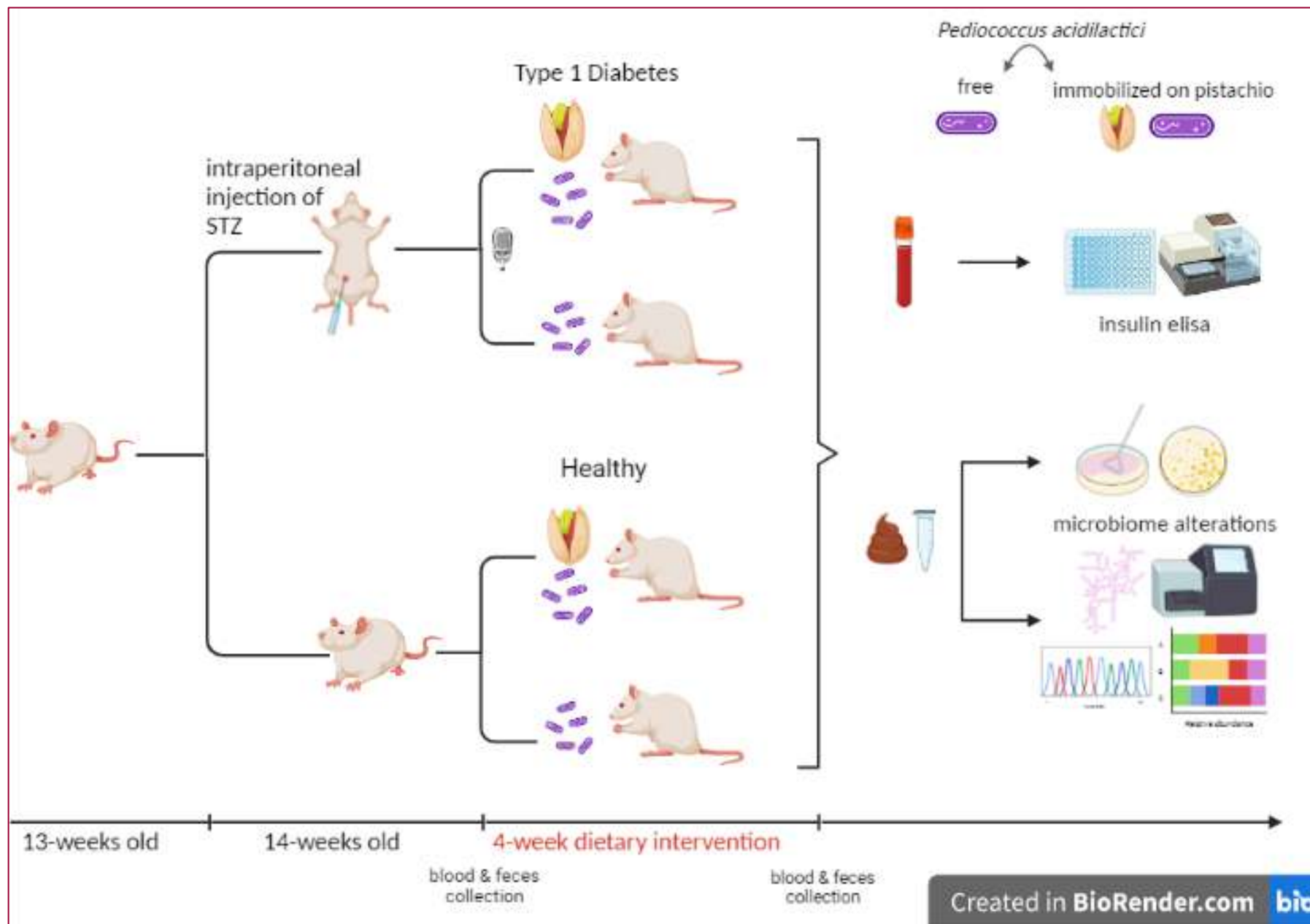
Συμπεράσματα

- Την ημέρα παραγωγής επιτεύχθηκε υψηλή συγκέντρωση κυττάρων ($8.73 \log_{cfu} / g$), η οποία μειώθηκε σημαντικά στις 30 και 90 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου ($8.57 \log_{cfu} / g$) και ψυγείου ($8.48 \log_{cfu} / g$), αντίστοιχα.
- Μετά από 6 μήνες αποθήκευσης, τα ποσοστά επιβίωσης κυμάνθηκαν 92.33% σε θερμοκρασία δωματίου και 94.96% σε θερμοκρασία ψυγείου.
- Τα δημητριακά πρωινού απέσπασαν θετικές βαθμολογίες κατά την οργανοληπτική αξιολόγησή τους και δεν διαφοροποιήθηκαν σε σχέση με τα δημητριακά που δεν περιείχαν ακινητοποιημένες καλλιέργειες.

Πειραματικός σχεδιασμός (2)

Η ημερήσια δόση των
κυττάρων γαλακτικών
βακτηρίων ορίστηκε στα
 2×10^9 cfu

Proof of concept



Σωματικό βάρος, Επίπεδα Ινσουλίνης & Γλυκόζης πλάσματος Βιοχημικές αναλύσεις

	ΦΔ+P		ΣΔ+P		ΔΦΔ+P		ΔΣΔ+P	
Εβδομάδα	0	4	0	4	0	4	0	4
Σωματικό βάρος (g)	422.2±14.0	450.7±11.8	396.6±9.4	434.1±8.4	381.3±14.6	302.7±10.3 ^{α,β,γ}	402.1±11.9	334.6±10.3 ^{α,β,γ}
Γλυκόζη (mg/dL)	124.83±5.71	133.00±5.40	100.33±5.58	123.17±9.72	360.67±3.06 ^{β,γ}	407.00±14.36 ^{β,γ}	324.67±22.70 ^{β,γ}	392.83±29.65 ^{β,γ}
Ινσουλίνη (ng/mL)	5.07± 0.47	5.75±0.64	4.74±0.51	4.61±0.82	1.28±0.13 ^{β,γ}	1.43±0.23 ^{β,γ}	1.15±0.07 ^{β,γ}	1.74±0.13 ^{β,γ}
TC (mg/dL)	116.17±6.63	122.50±7.53	101.50±4.19	110.17±5.27	88.67±9.07	96.33±5.64	89.00±8.84	106.67±4.88
HDL-c (mg/dL)	93.83±4.32	95.00±5.67	96.00±7.94	100.17±7.63	52.17±2.91 ^{β,γ}	78.33±4.19 ^α	57.33±4.77 ^{β,γ}	86.50±3.98 ^α
LDL-c (mg/dL)	20.83±3.11	18.50±2.38	25.83±3.16	28.50±2.92	12.50±3.60	12.67±1.45	12.00±4.31	16.33±1.99
TAG (mg/dL)	154.67±20.75	150.00±14.16	87.00±3.79	91.33±4.65	176.33±19.00	120.67±35.33	161.17±42.22	138.50±17.13

α: $p<0.05$ συγκριτικά με τιμές της ίδιας ομάδας στην έναρξη της παρέμβασης, β: $p<0.05$ συγκριτικά με ΦΔ+P, γ: $p<0.05$ συγκριτικά με ΣΔ+P

Παράγοντες φλεγμονής

	TNF-a (pg/mL)	IL-1b (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
ΦΔ+P	26.91±2.64	26.27±2.62	15.6±1.65
ΣΔ+P	26.37±1.96	24.38±8.00	14.03±1.43
ΔΦΔ+P	24.32±3.24	57.59±0.99 ^{α,β}	14.46±1.10
ΔΣΔ+P	23.04±0.68	67.91±4.82 ^{α,β}	16.02±1.43

α: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΦΔ+P, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΣΔ+P

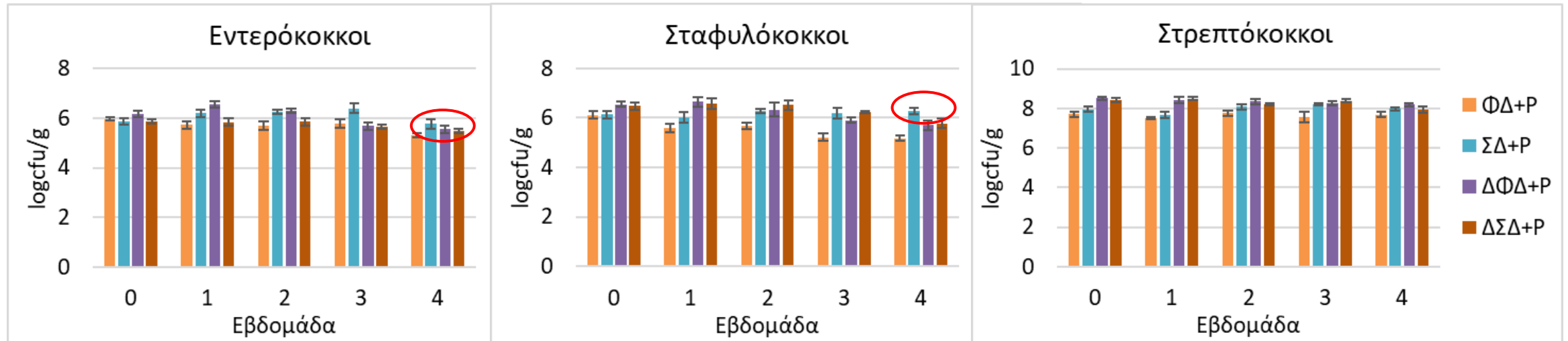
↑IL-1b στις διαβητικές

ομάδες (ΔΦΔ+P και ΔΣΔ+P)

σε σύγκριση με τις ομάδες

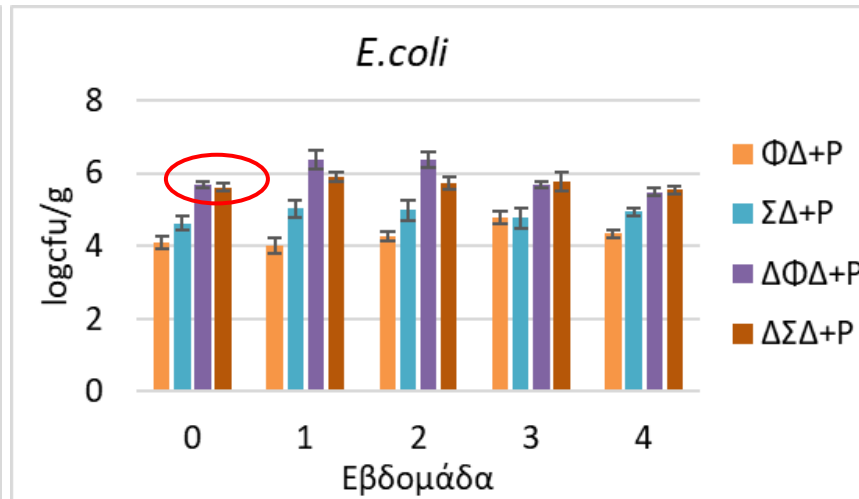
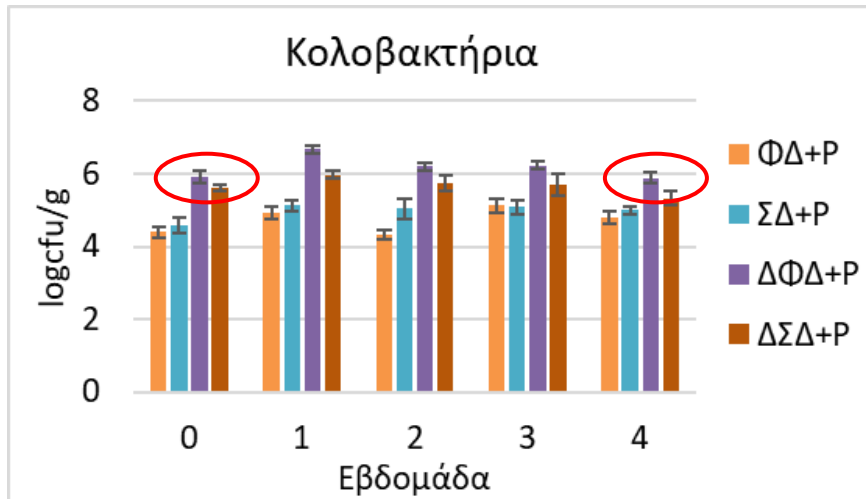
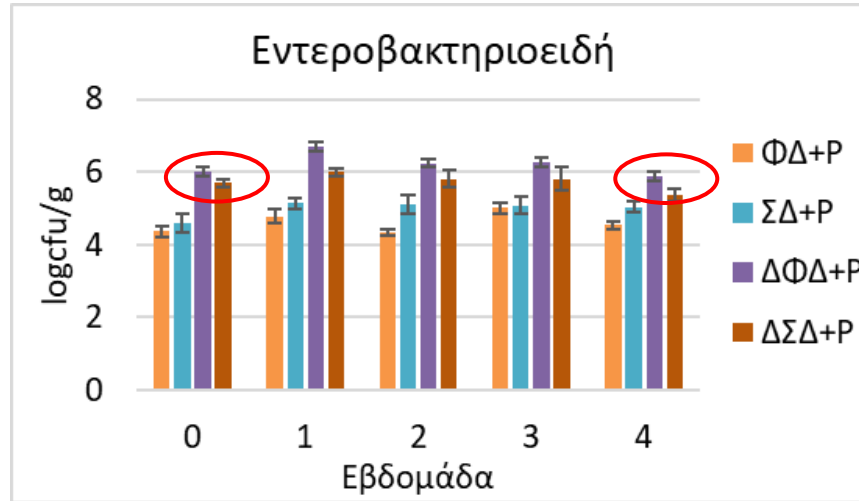
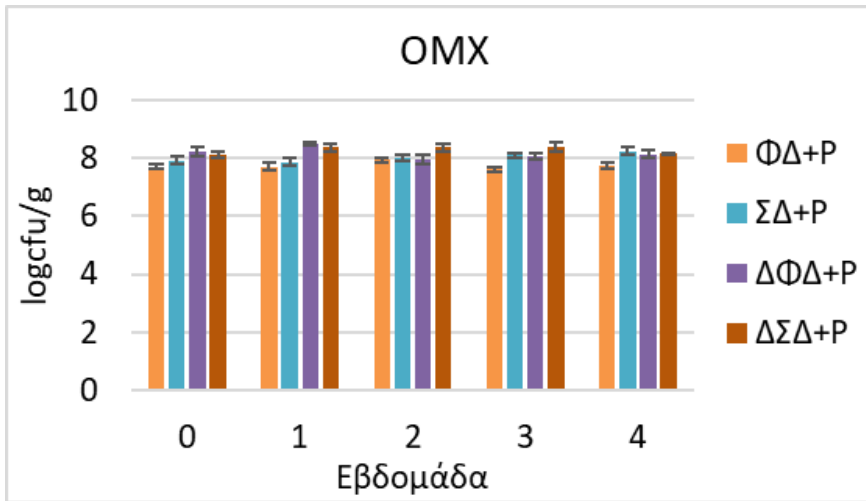
υγιών ζώων (ΦΔ+P και ΣΔ+P)

Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



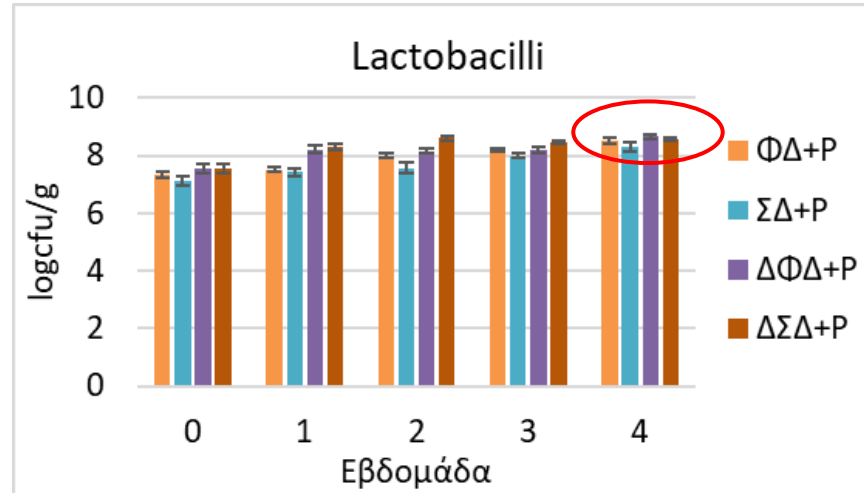
- ↓ Staphylococci σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα που κατανάλωσαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι (4^η εβδομάδα)
- ↓ Enterococci στους επίμυες που κατανάλωσαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα

Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων

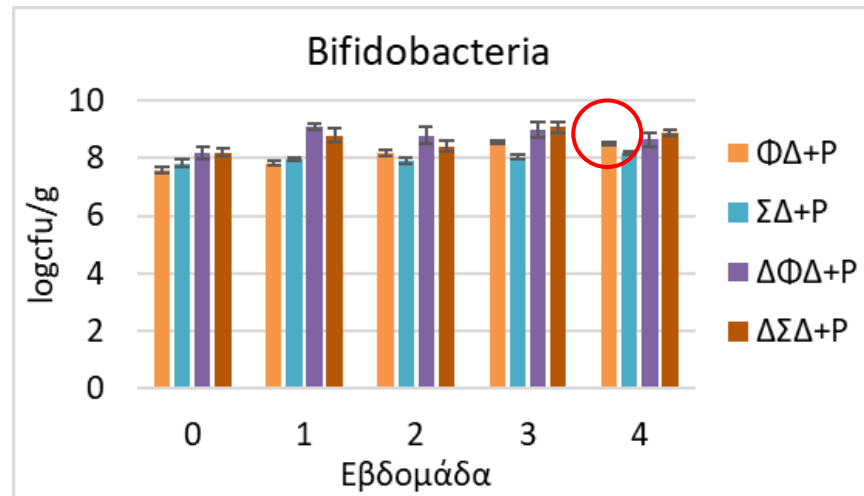


- ↑ *Enterobacteriaceae* & coliforms στα διαβητικά ζωικά πρότυπα (εβδομάδες 0 & 4)
- ↑ *E. coli* στα διαβητικά ζωικά πρότυπα (εβδομάδα 0)

Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων

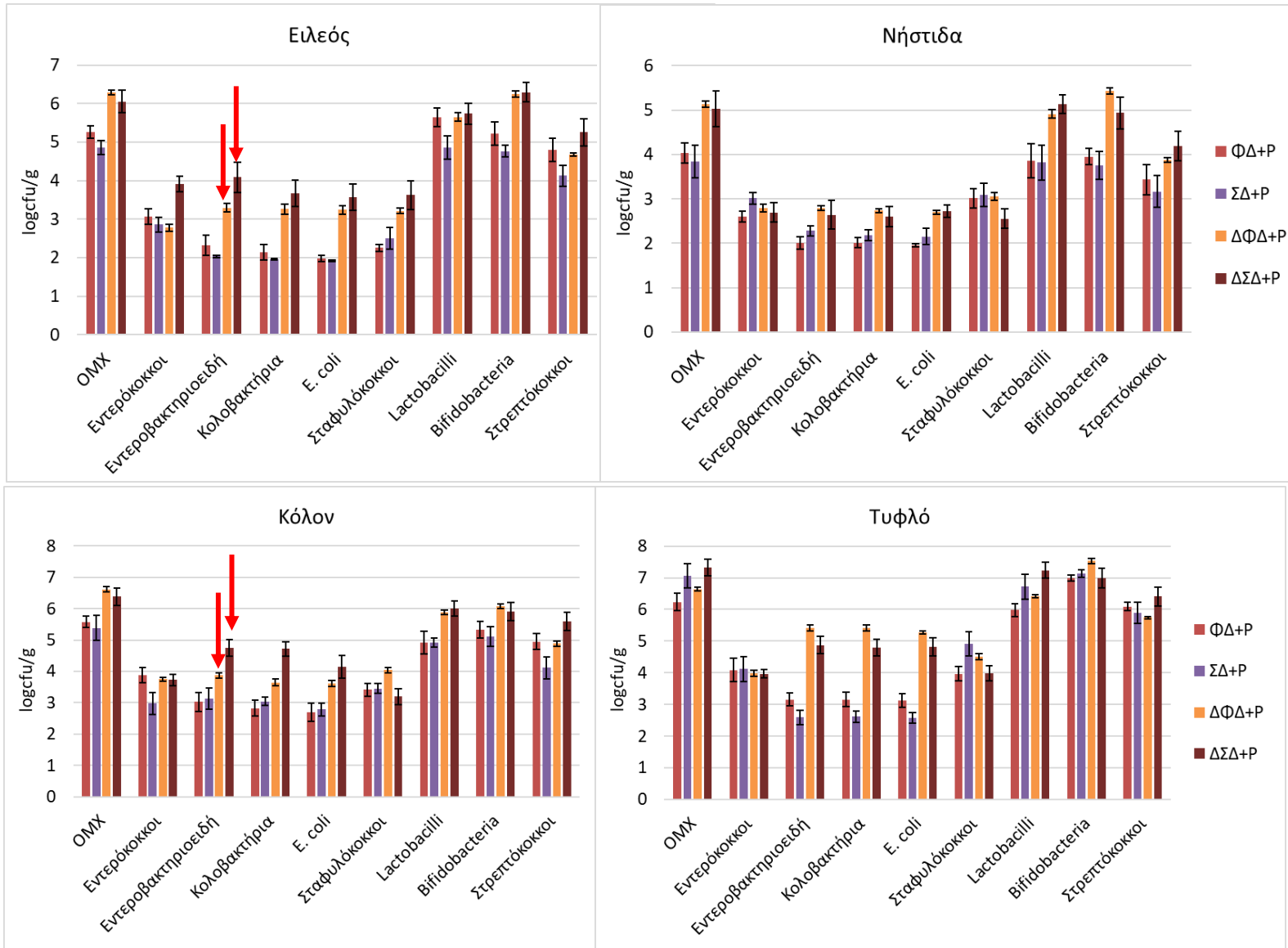


- ↑ Lactobacilli σε όλες τις ομάδες(4^η εβδομάδα)



- ↑ Bifidobacteria στα υγιή ζωικά πρότυπα(4^η εβδομάδα)

Μικροβιολογικές αναλύσεις εντερικού ιστού

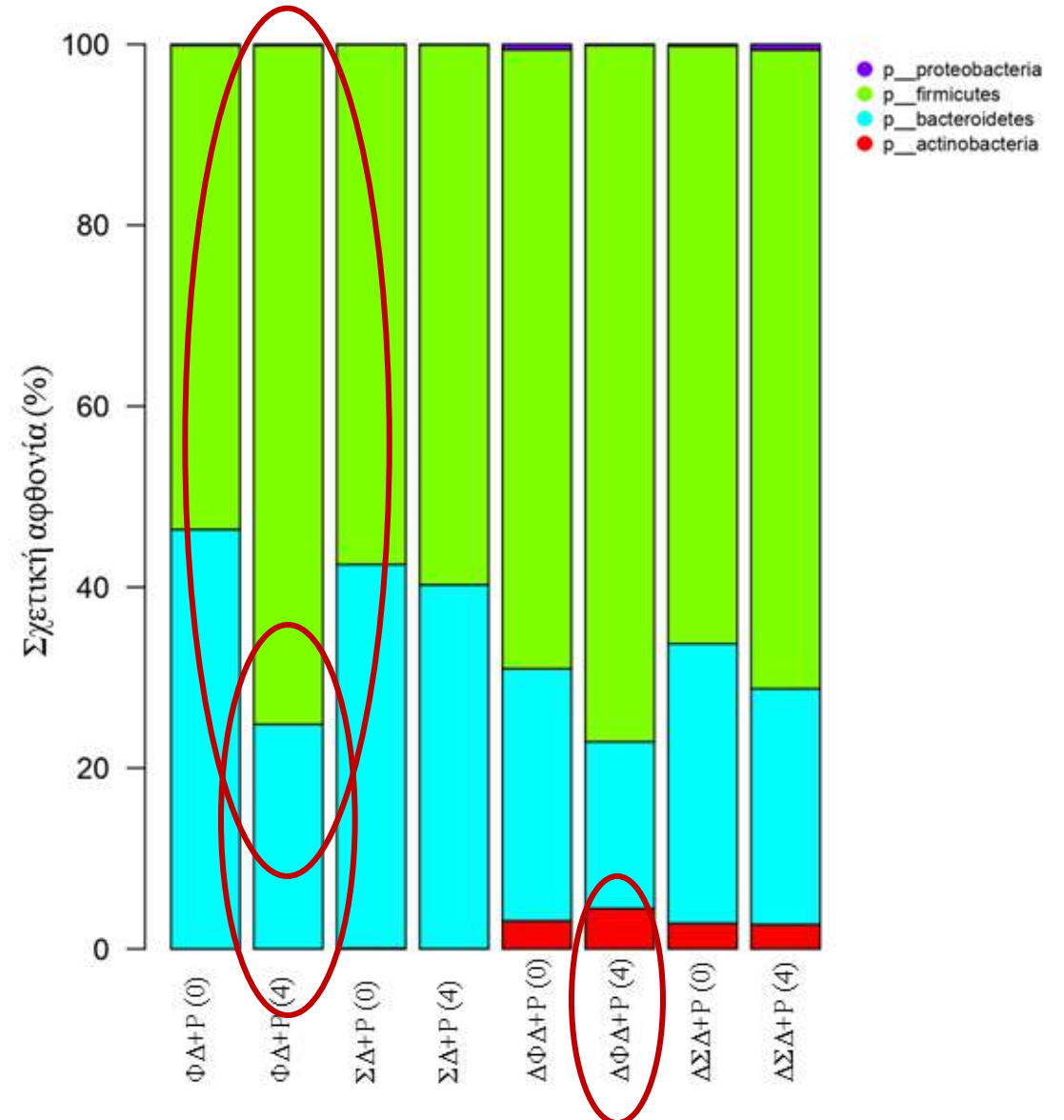


- Στα εντερικά τμήματα του ειλεού και στο κόλον των διαβητικών ζωικών προτύπων παρατηρήθηκε μια μείωση στα επίπεδα των εντεροβακτηρίων μετά την κατανάλωση ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι.

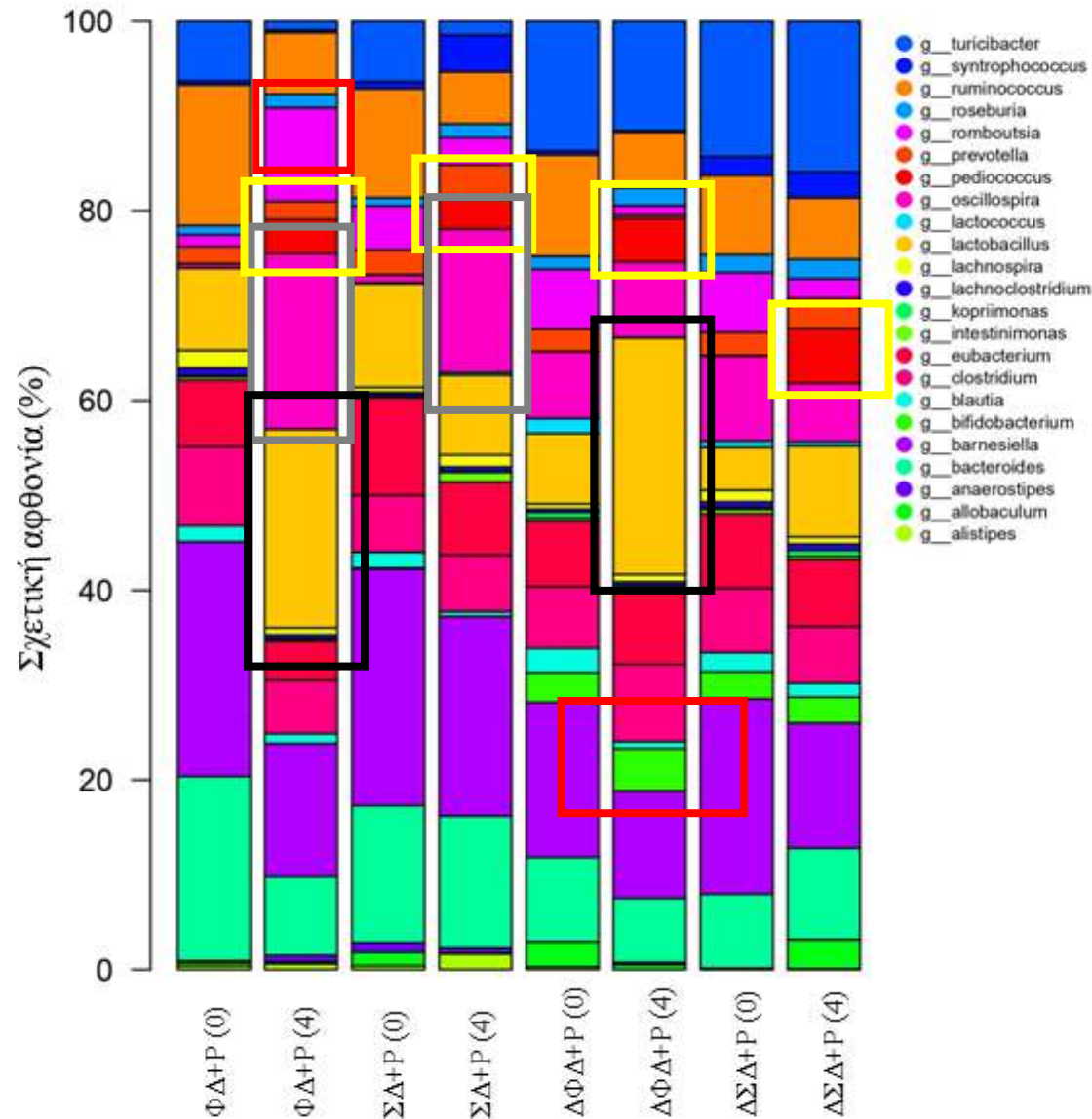
Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο phylum

↑ Firmicutes &
↓ Bacteroidetes στην ομάδα ΦΔ+Ρ

↑ Actinobacteria στην ομάδα των
διαβητικών ζώων που χορηγήθηκαν
ακινητοποιημένα κύτταρα *P.*
acidilactici SK σε κελυφωτό φιστίκι



Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο genus



- ↑ *Pediococcus* σε όλες τις ομάδες
- ↑ *Lactobacillus* in ΦΔ+P και ΔΦΔ+P συγκριτικά με έναρξη και με ομάδες ΣΔ+P και ΔΣΔ+P
- ↑ *Oscillospira* στις ομάδες υγιών (ΣΔ+P και ΦΔ+P)
- ↑ *Romboutsia* στην ομάδα ΦΔ+P
- ↑ *Bifidobacterium* στην ομάδα ΔΦΔ+P

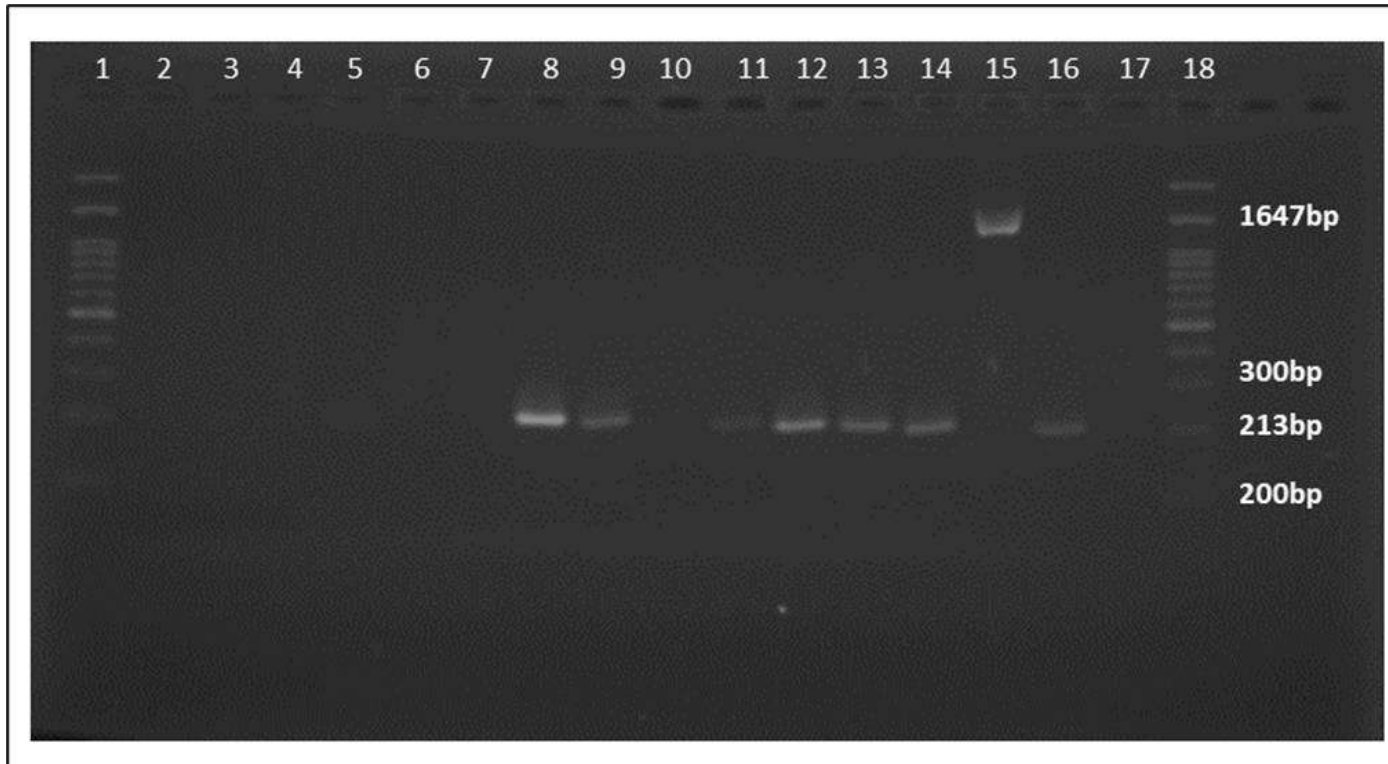
Ποσοτικοποίηση SCFAs & γαλακτικού οξέος

	ΦΔ+P		ΣΔ+P		ΔΦΔ+P		ΔΣΔ+P	
Εβδομάδα	0	4	0	4	0	4	0	4
Γαλακτικό οξύ	0.647±0.080	0.592±0.105	0.823±0.047	0.697±0.087	1.522±0.088 ^{β,γ}	0.997±0.105 ^α	1.310±0.085 ^{β,γ}	0.759±0.077 ^α
Οξικό οξύ	6.912±0.424	6.919±0.525	6.894±0.546	5.832±0.882	9.739±0.867	7.895±0.711	9.405±0.873	7.476±0.637
Προπιονικό οξύ	1.022±0.181	1.170±0.271	0.972±0.109	0.892±0.157	0.954±0.149	0.935±0.195	0.922±0.101	0.959±0.096
Ισοβουτυρικό οξύ	0.054±0.007	0.073±0.008	0.088±0.018	0.100±0.019	0.069±0.015	0.057±0.007	0.043±0.006	0.062±0.008
Βουτυρικό οξύ	0.417±0.017	0.853±0.127	0.624±0.071	0.921±0.236	0.477±0.062	0.532±0.131	0.582±0.034	0.738±0.294
Ισοβαλερικό οξύ	0.034±0.008	0.050±0.006	0.048±0.017	0.061±0.015	0.022±0.003	0.031±0.005	0.031±0.006	0.034±0.010
Βαλερικό οξύ	0.04±0.007	0.067±0.012	0.077±0.021	0.086±0.017	0.025±0.007	0.057±0.015	0.065±0.011	0.040±0.010

ΦΔ+P: Υγιή ζώα με διατροφική παρέμβαση με ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι, ΣΔ+P: Υγιή ζώα με διατροφική παρέμβαση με ελεύθερα κύτταρα *P. acidilactici* SK, ΔΦΔ+P: Διαβητικά ζώα με διατροφική παρέμβαση με ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι, ΔΣΔ+P: Διαβητικά ζώα με διατροφική παρέμβαση με ελεύθερα κύτταρα *P. acidilactici* SK.

α: $p < 0.05$ συγκριτικά με εβδομάδα 0 στο αντίστοιχο δείγμα, β: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΣΔ+P, γ: $p < 0.05$ συγκριτικά με ΦΔ+P.

Multiplex PCR για επιβεβαίωση παρουσίας του *P. acidilactici* SK



1: DNA ladder

2: negative

3: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΣΔ+Ρ την εβδομάδα 0

4: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΦΔ+Ρ την εβδομάδα 0

5: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΔΣΔ+Ρ την εβδομάδα 0

6: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΔΦΔ+Ρ την εβδομάδα 0

7: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΦΔ την εβδομάδα 4

8: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΣΔ+Ρ την εβδομάδα 4

9: δείγματα κοπράνων της ομάδας ΔΦΔ+Ρ την εβδομάδα 4

10: δείγματα τυφλού της ομάδας ΣΔ

11: δείγματα τυφλού της ομάδας ΣΔ+Ρ

12: δείγματα τυφλού της ομάδας ΦΔ+Ρ

13: δείγματα τυφλού της ομάδας ΔΣΔ+Ρ

14: δείγματα τυφλού της ομάδας ΔΦΔ+Ρ

15: *P. pentosaceus* G22NM13 (δείγμα ελέγχου)

16: *P. acidilactici* SK (δείγμα ελέγχου)

17: *L. plantarum* F4 (δείγμα ελέγχου)

18: DNA ladder

Συμπεράσματα

- Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων στα εντερικά τμήματα του ειλεού και στο κόλον των διαβητικών ζωικών προτύπων φανερώνουν μια μείωση στα επίπεδα των εντεροβακτηρίων μετά την κατανάλωση ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι.
- Οι πληθυσμοί των γαλακτικών βακτηρίων στα κόπρανα αυξήθηκαν σε όλες τις ομάδες, ενώ τα bifidobacteria αυξήθηκαν σε υγιή ζωικά πρότυπα που έλαβαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα σε κελυφωτό φιστίκι. Παράλληλα, στα ζωικά πρότυπα οι πληθυσμοί δυνητικά παθογόνων μικροβίων μειώθηκαν ή επανήλθαν στα επίπεδα των υγιών ζώων μετά την χορήγηση ελεύθερων ή ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK.
- Σε επίπεδο γένους, το *Pediorococcus* spp. αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες ζωικών προτύπων, ενώ το γένος *Lactobacillus* αυξήθηκε στις ομάδες που έλαβαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα.
- Η κατανάλωση (ελεύθερων ή ακινητοποιημένων) κυττάρων *P. acidilactici* SK οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα HDL-c στο πλάσμα των διαβητικών ζωικών προτύπων

Τελικά Συμπεράσματα

1. Το κελυφωτό φιστίκι που αποτελεί έναν ξηρό καρπό που εντάσσεται στην μεσογειακή διατροφή μπορεί να επιδρά θετικά στο εντερικό μικροβίωμα ζωικών προτύπων ΣΔτ1.
2. Η ακινητοποίηση λειτουργικών καλλιέργειών σε κελυφωτό φιστίκι και νιφάδες ζέας είχε θετική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα τόσο κατά την αποθήκευση αλλά και κατά την επώαση σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρεντερικής πέψης.
3. Τα ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς παρουσιάζουν προοπτικές εφαρμογής τους σε συστήματα τροφίμων και αναμένεται να προσελκύσουν το καταναλωτικό κοινό.
4. Η διατροφική παρέμβαση με λειτουργικές καλλιέργειες *P. acidilactici* SK σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή επιδρά θετικά στο εντερικό μικροβίωμα ζωικών προτύπων ΣΔτ1, αλλά και στο προφίλ των λιπιδίων του αίματος.

«Σχεδιασμός λειτουργικών τροφίμων με θετικές δράσεις στην υγεία και με έμφαση στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου-1»



Πράπα Ιωάννα, Μοριακή Βιολόγος & Γενετίστρια, PhD
Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
ΤΜΒΓ, ΔΠΘ
iprapa@mbg.duth.gr