



# Σχεδιάζοντας καινοτόμα λειτουργικά συστατικά τροφίμων

**Κουρκουτάς Ιωάννης**  
**Καθηγητής Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας**

Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας  
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής  
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

[ikourkou@mbg.duth.gr](mailto:ikourkou@mbg.duth.gr)



# Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

## Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής

### Δημοκρίτειο Παν/μιο Θράκης

<http://lamb.mbg.duth.gr>



**Διευθυντής:**  
**Κουρκουτάς Ιωάννης**  
**Καθηγητής ΔΠΘ**

email: [ikourkou@mbg.duth.gr](mailto:ikourkou@mbg.duth.gr)

**Τηλ: 25510 30633**



Εργαστήριο Εφαρμοσμένης  
Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

# Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

- Ανήκει στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής του Δημοκρίτειου Παν/μίου Θράκης.
- Ιδρύθηκε το 2015 (ΦΕΚ 1575/27-07-2015).

<https://lamb.mbg.duth.gr>



# Ερευνητικά ενδιαφέροντα

## Βιοτεχνολογία τροφίμων και περιβάλλοντος

Ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών για την παραγωγή:

(α) νέων λειτουργικών τροφίμων με πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία (προβιοτικά και πρεβιοτικά, φυσικά προϊόντα με θετικές δράσεις, φαρμακευτικά τρόφιμα, κλπ),

(β) υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντων μέσω της εκμετάλλευσης διάφορων αποβλήτων της αγροτικής βιομηχανίας και της βιομηχανίας τροφίμων.

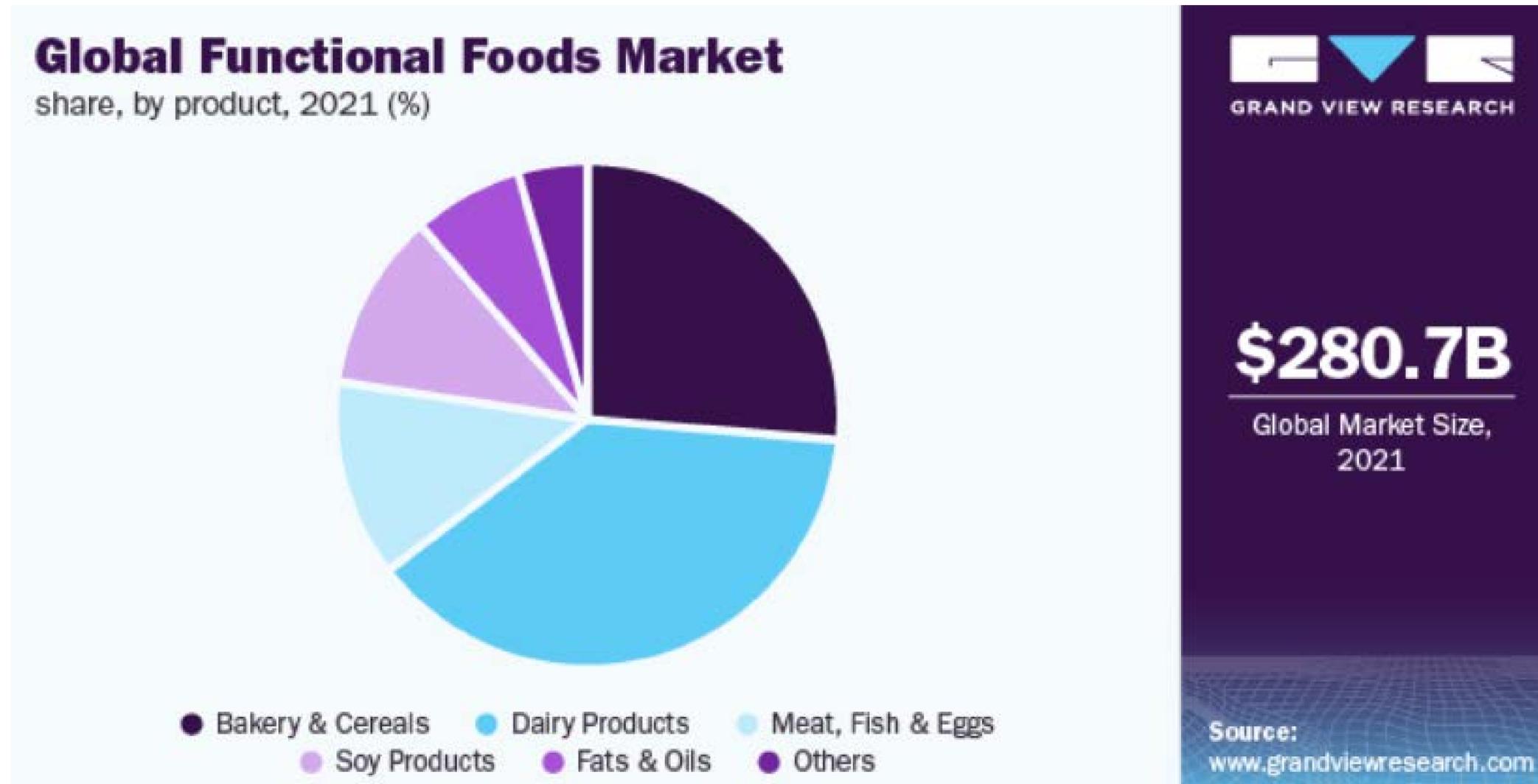


# Λειτουργικά τρόφιμα

«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*

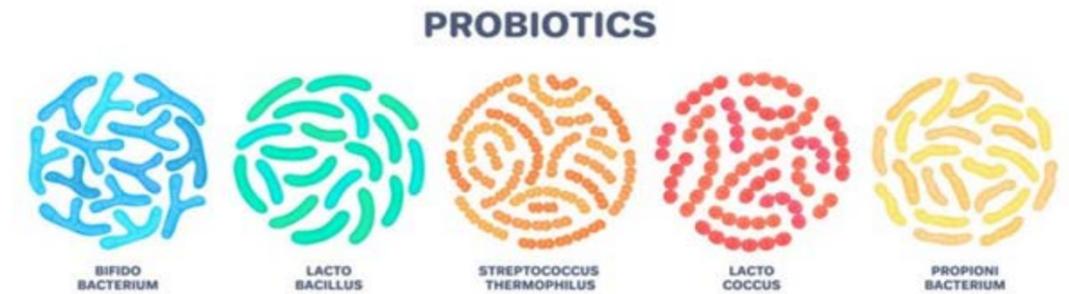
# Λειτουργικά τρόφιμα



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

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

# Προβιοτικά

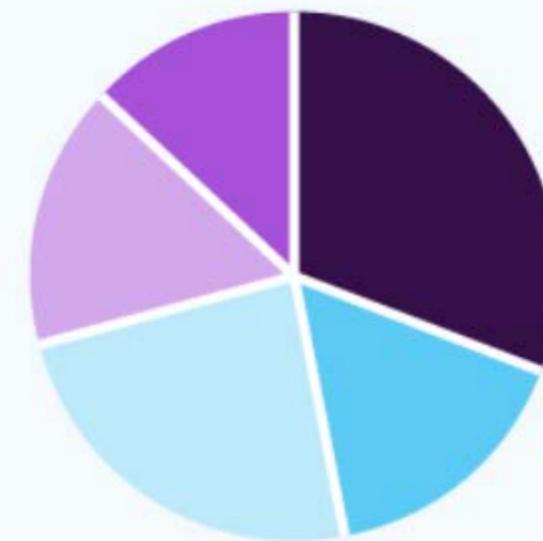


«Ζωντανοί μικροοργανισμοί (βακτήρια ή ζύμες), οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή».

*FAO/WHO, 2001*

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

**Global Probiotics Market**  
Share, by Distribution Channel, 2022 (%)



● Hypermarkets / Supermarkets ● Pharmacies / Drugstores  
● Specialty Stores ● Online Stores ● Others

GRAND VIEW RESEARCH

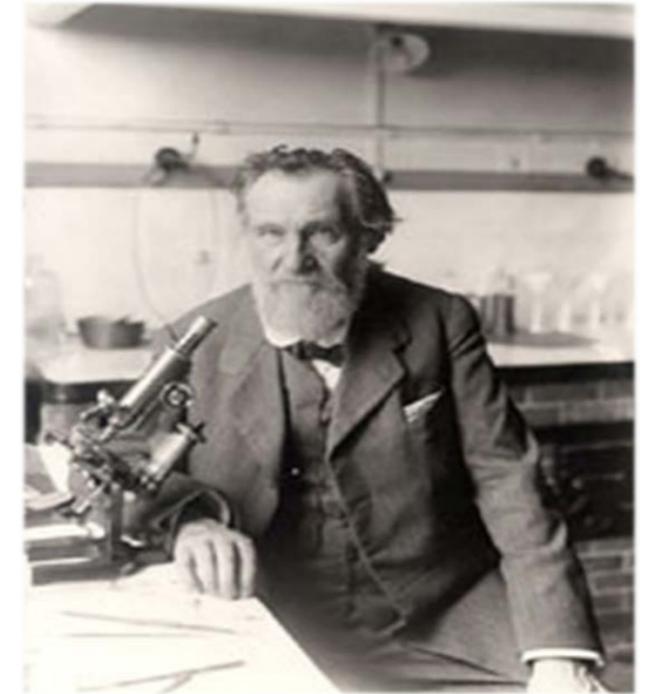
**\$77.1B**  
Global Market Size,  
2022

Source:  
[www.grandviewresearch.com](http://www.grandviewresearch.com)

Grand View Research, 2023

# Λίγη ιστορία...

- **1908.** Elie Metchnikof: υπέθεσε ότι η υγιής ζωή των αγροτών της Βουλγαρίας ήταν αποτέλεσμα της κατανάλωσης ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.
- **1989.** Füller: όρισε τα προβιοτικά ως προϊόντα που περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς που επηρεάζουν<sup>8</sup> ευεργετικά τον ξενιστή βελτιώνοντας τη μικροβιακή εντερική χλωρίδα.
- **1989.** Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα ευεργετικά οφέλη δύναται να οφείλονται ακόμα και σε συστατικά κυττάρων (π.χ. συστατικά κυτταρικών τοιχωμάτων) και όχι αποκλειστικά σε ζωντανά κύτταρα (Ouwehand and Salminen 1998, Salminen et al. 1999).
- **2015.** Ιδρύεται ο International Probiotics Association (IPA) από τις ηγέτιδες εταιρείες τροφίμων (Nestle, Du Pont, κλπ).



*Elie Metchnikof*

# Κριτήρια επιλογής

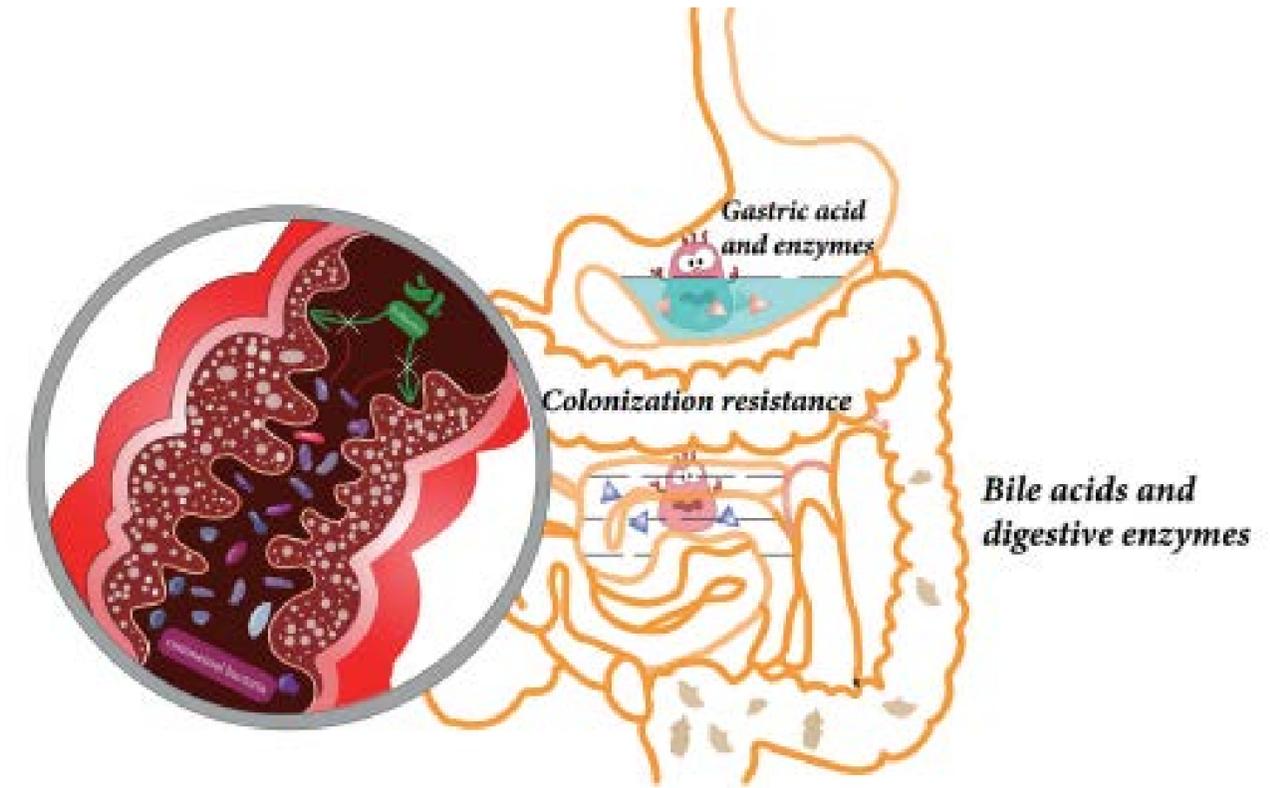
Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός **πρέπει** να:

- 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

# Κριτήρια επιλογής - 1

Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός πρέπει να είναι ζωντανός τη στιγμή της κατανάλωσης

- Ικανότητα επιβίωσης στην παρουσία πεπτικών ενζύμων, χολικών αλάτων και όξινων συνθηκών
- Επιβίωση κατά την αποθήκευση (τρόφιμα/χάπια)

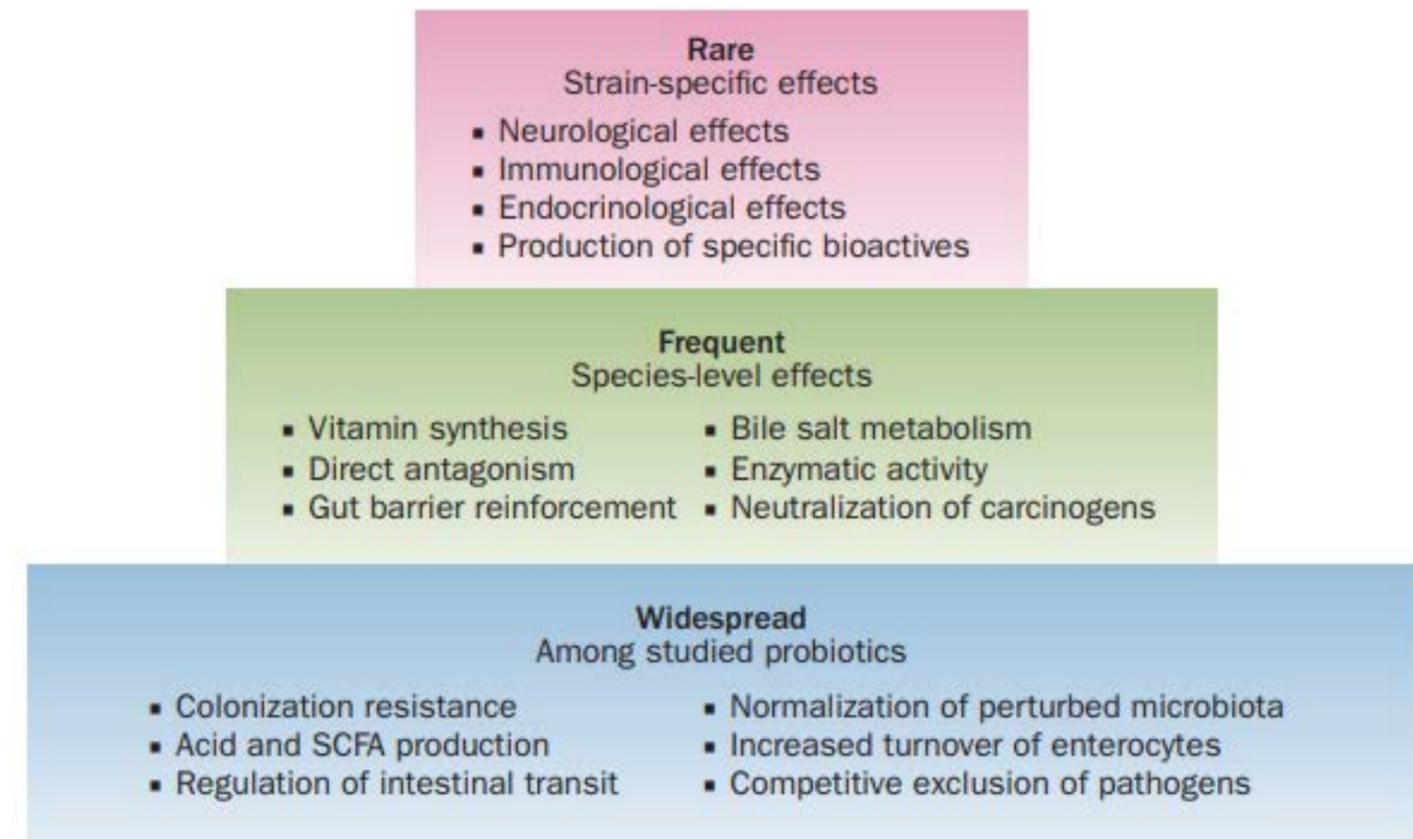


Han et al., 2021; *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>

# Κριτήρια επιλογής - 2

**Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός πρέπει να διαθέτει επιστημονικά τεκμηριωμένο όφελος στην υγεία του ξενιστή**

- Ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος
- Άμυνα έναντι παθογόνων
- Ικανότητα μείωσης επιπέδων χοληστερόλης/γλυκόζης
- Ομοιοστάση του εντερικού μικροβιώματος

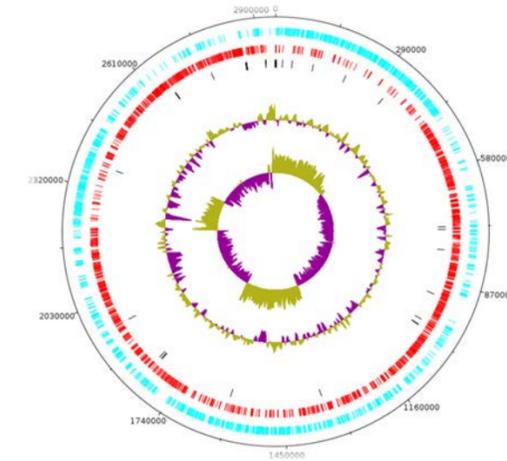


Hill et al., 2014; *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

# Κριτήρια επιλογής - 3

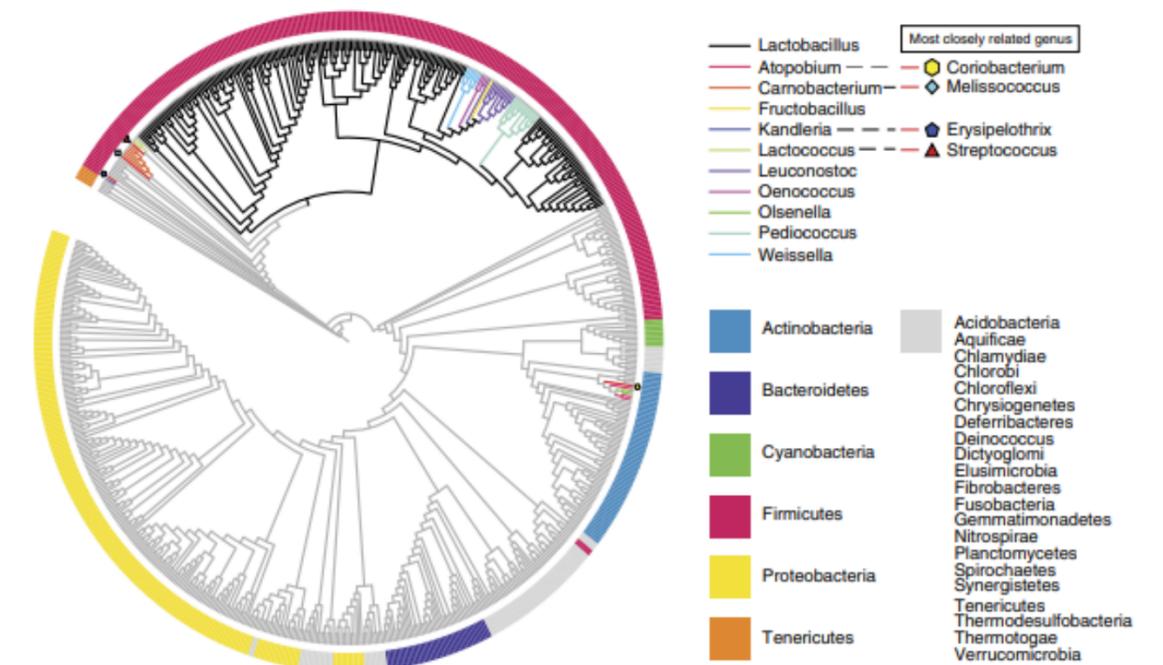
Ένας προβιοτικός μικροοργανισμός πρέπει να έχει ταξινομηθεί σε επίπεδο γένους, είδους, και στελέχους

Μοριακές τεχνικές Επόμενης Γενιάς (Next generation) επιτρέπουν τον πλήρη χαρακτηρισμό του μικροοργανισμού μέσω ανάγνωσης ολόκληρου του γονιδιώματος



NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms9322

ARTICLE



Sun et al., 2015; *Nature Communications* <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>

# Κριτήρια επιλογής - 4

Ένας προβιοτικός  
μικροοργανισμός πρέπει να  
είναι ασφαλής για την  
προβλεπόμενη χρήση του

- Απουσία αιμολυτικής δράσης
- Ευαισθησία στα αντιβιοτικά
- Να θεωρείται γενικά ασφαλής  
(Generally recognized as safe, GRAS)



EFSA Journal 20YY:volume(issue):NNNN

## SCIENTIFIC OPINION<sup>1</sup>

**Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of  
human and veterinary importance<sup>2</sup>**

**EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
(FEEDAP)<sup>3,4</sup>**

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

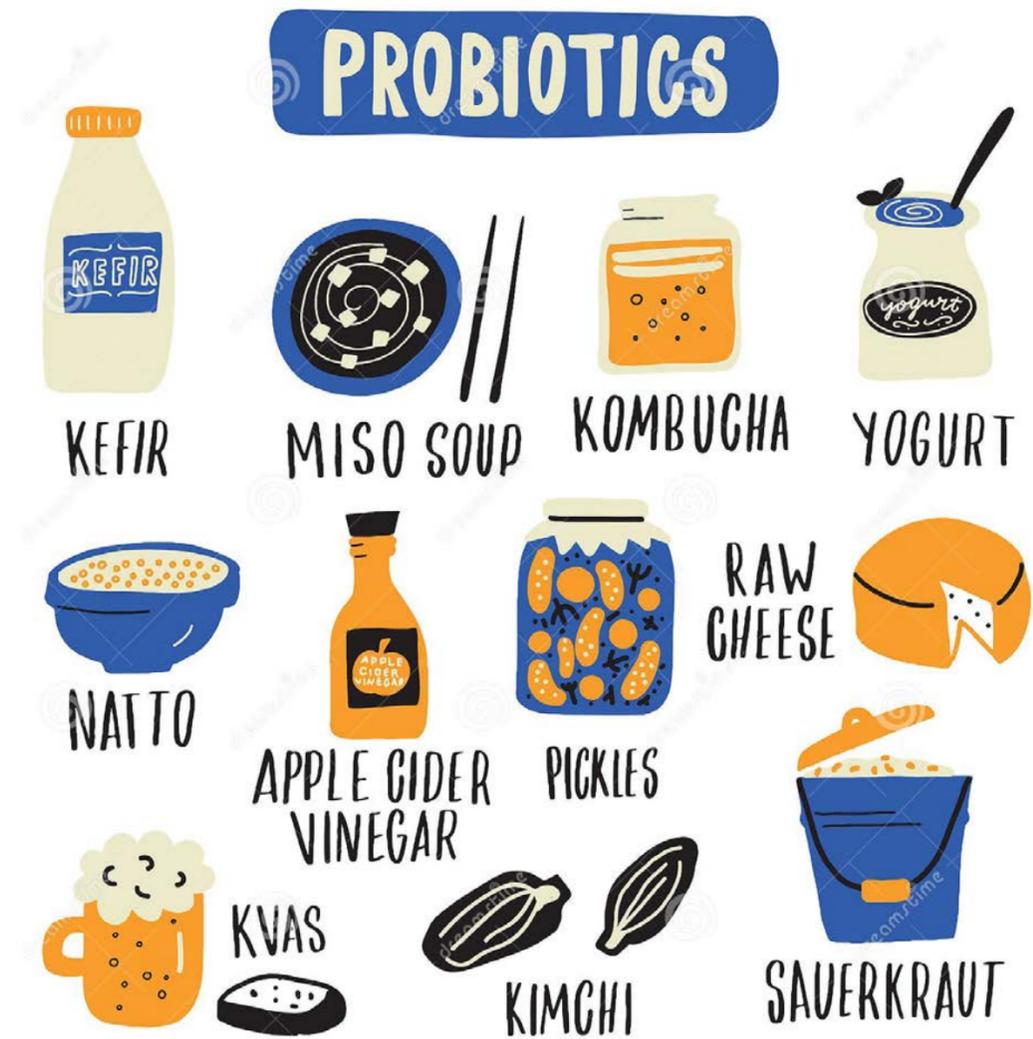
Endorsed for public consultation on 1 February 2012

© European Food Safety Authority, 2012

# Απομόνωση νέων αγρίου τύπου στελεχών

Ζυμωμένα τρόφιμα  
(γαλακτοκομικά και μη)

Ανθρώπινη προέλευση (μητρικό  
γάλα, εντερικός ιστός, κόπρανα)



## Ταυτοποίηση

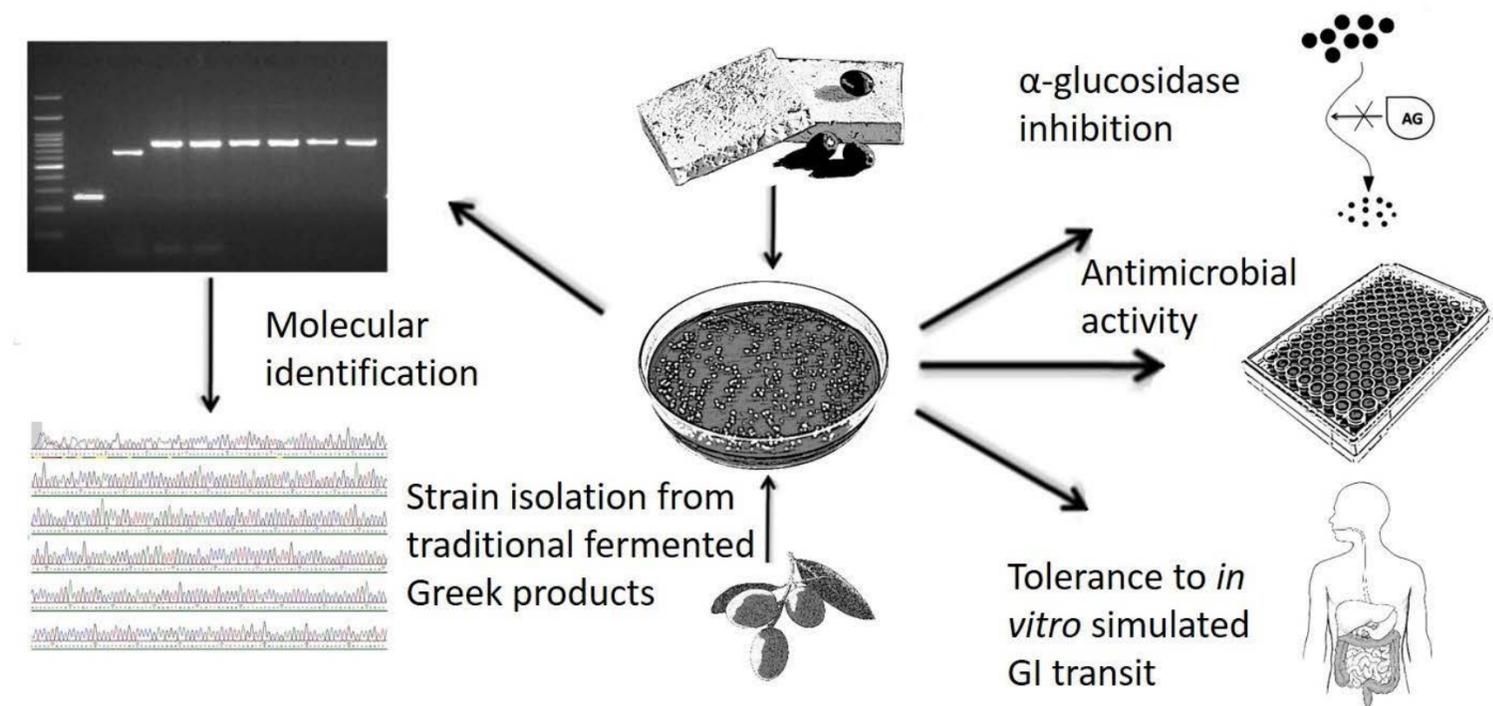
- Βιοχημικά
- Μοριακά

## Προβιοτικές ιδιότητες

- Ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης
- Έκκριση του ενζύμου BSH
- Έκκριση του ενζύμου α-γλυκοσιδάση

## Ασφάλεια

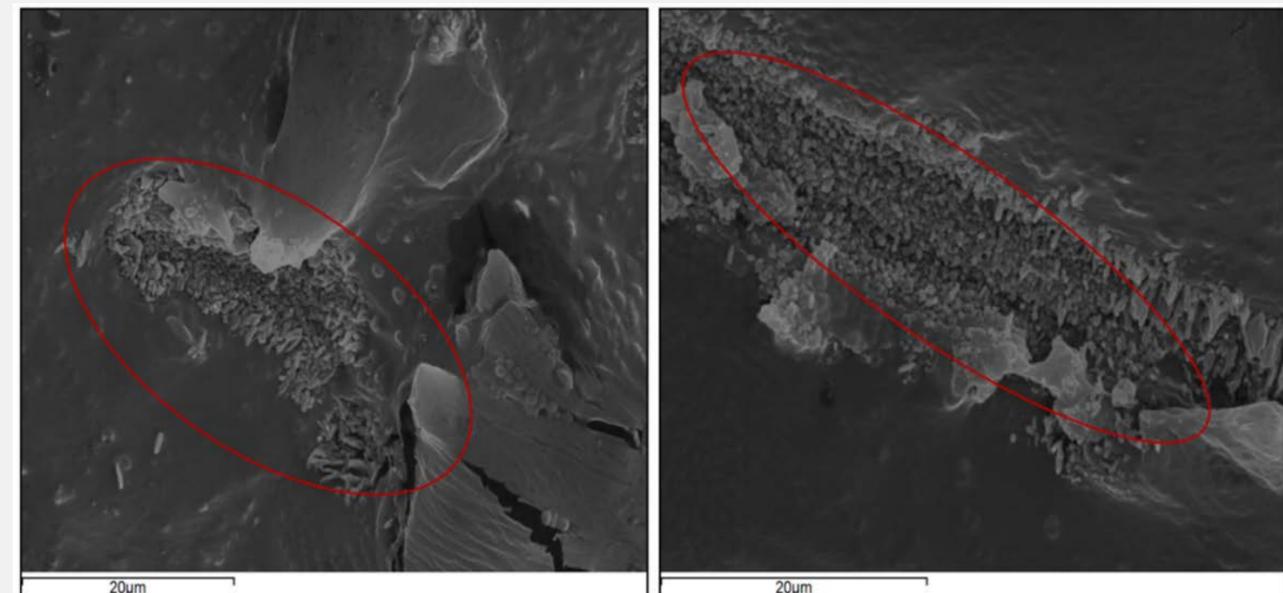
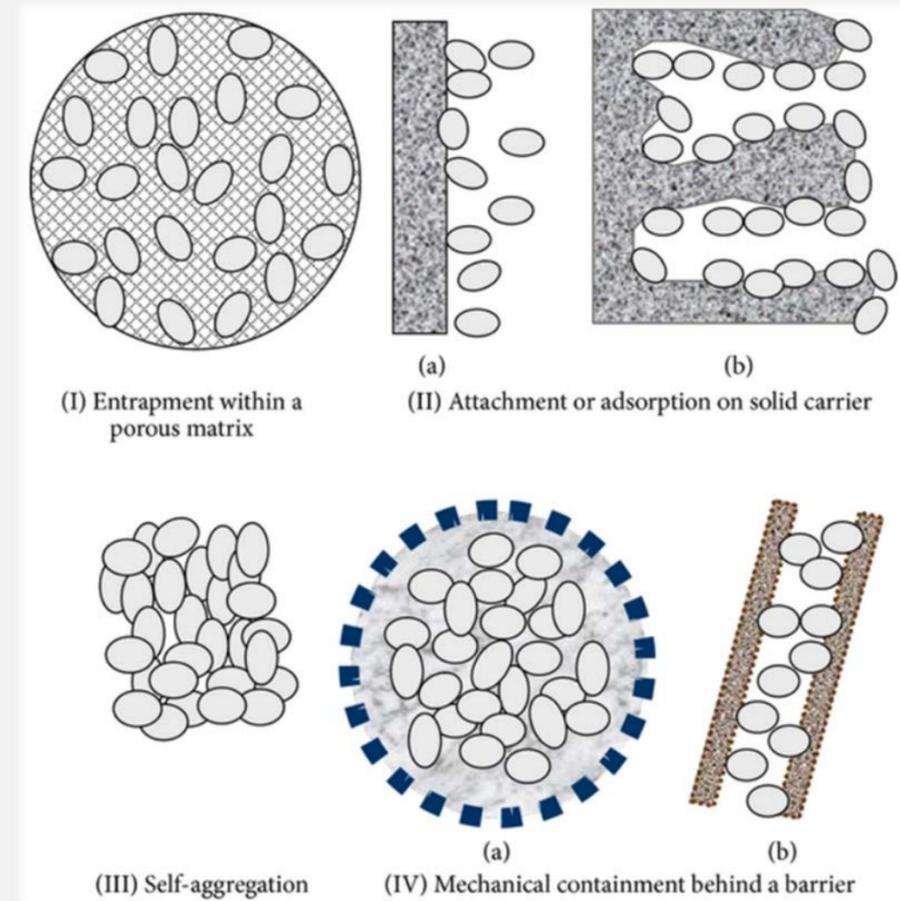
- Αιμόλυση
- Αντιβιοτικά (MIC)



# Ακίνητοποίηση προβιοτικών κυττάρων

## Πλεονεκτήματα

- Ελεγχόμενη και συνεχής μεταφορά κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο.
- Προστασία έναντι των φυσικοχημικών μεταβολών κατά την αποθήκευση.
- Υψηλά επίπεδα κυτταρικής συγκέντρωσης (>9 log CFU/g).
- Μειωμένο ρίσκο μικροβιακής επιμόλυνσης.
- Προστασία έναντι των οξέων του στομάχου.



# Εισαγωγή

## Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1 (ΣΔτ1)

Αυτοάνοση νόσος η οποία οφείλεται σε **καταστροφή των β-κυττάρων** του παγκρέατος, που συνοδεύεται από **απώλεια παραγωγής ινσουλίνης** και εκδηλώνεται κλινικά με υπεργλυκαιμία.

### Κύρια Σημεία:

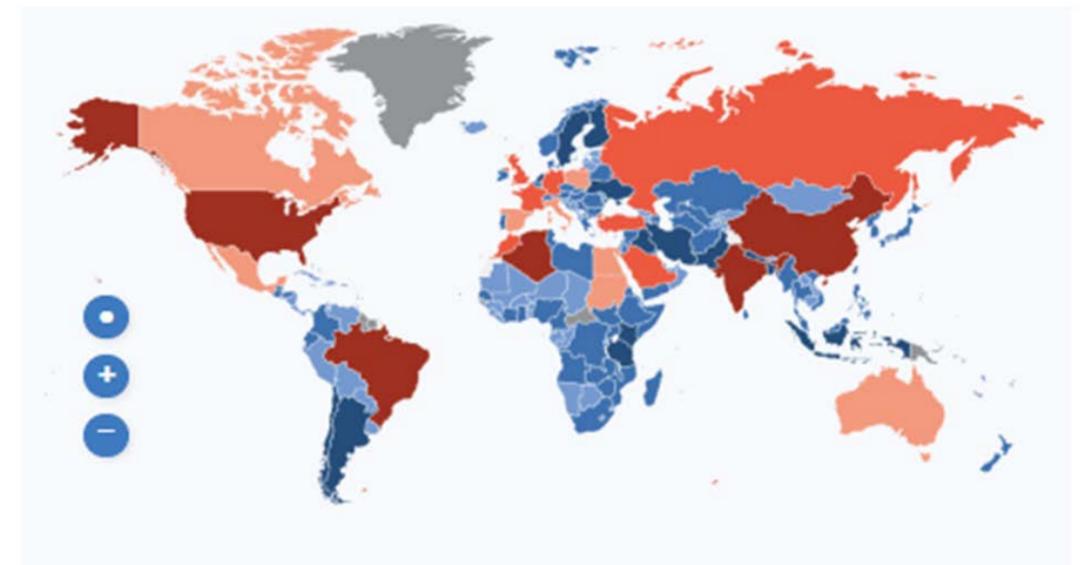
- Απώλεια ινσουλίνης συνεπάγεται υψηλά επίπεδα σακχάρου, κάτι που αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την υγεία των ασθενών
- Η διάγνωση συνήθως γίνεται στην παιδική ηλικία ή την εφηβεία
- Απαραίτητη θεραπεία με ινσουλίνη καθ' όλη τη διάρκεια της νόσου
- Απαιτείται ειδική διατροφή για έλεγχο της γλυκόζης



# Εισαγωγή

## Επιδημιολογικά στοιχεία ΣΔτ1

- Αποτελεί το **5-15%** των διαβητικών ατόμων.
- **Ετησίως**, διαγιγνώσκονται περίπου **184,100 νέοι** με ΣΔτ1.
- **1.2 εκ. νέοι** ηλικίας <20 ετών με ΣΔτ1.
- **> 9 εκ. άνθρωποι όλων των ηλικιών** πάσχουν παγκοσμίως με ΣΔτ1.



International Diabetes Federation (IDF) Atlas 2021:  
<https://diabetesatlas.org/>

# Εισαγωγή

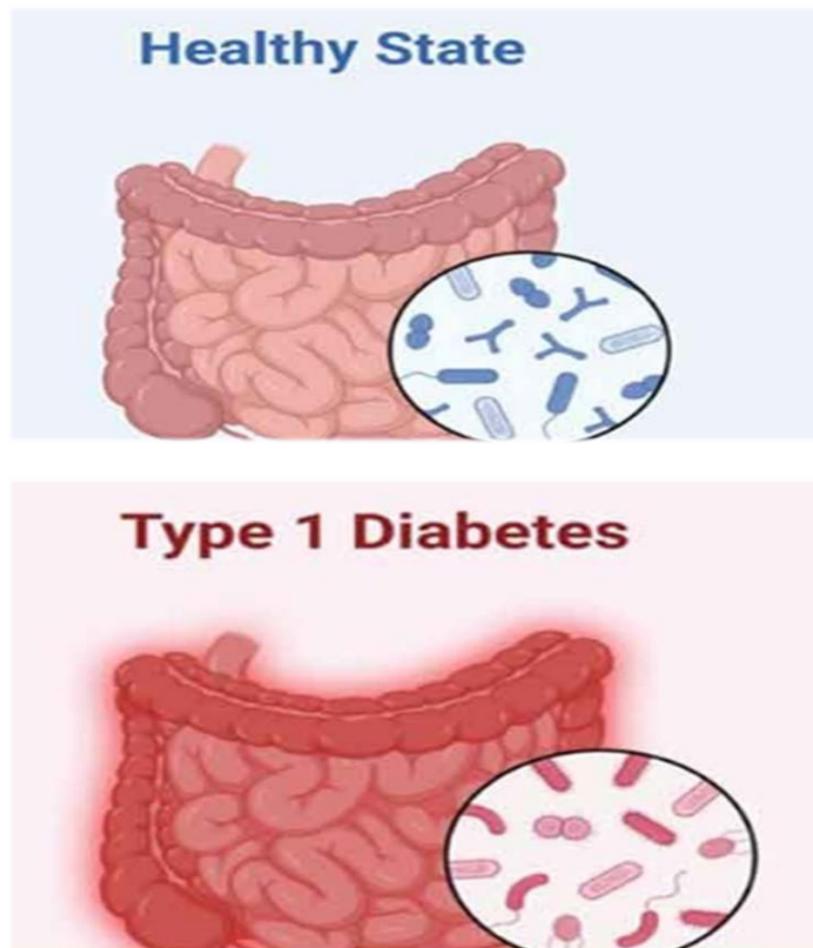
## Εντερικό Μικροβίωμα



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

# Εισαγωγή

## ΣΔτ1 και Εντερικό 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 διαταραγμένο εντερικό μικροβίωμα δύναται να επηρεάσει τη φυσιολογική αλληλεπίδραση του εντέρου με το ανοσοποιητικό σύστημα και να οδηγήσει σε ανοσολογικές αποκρίσεις, με αντίκτυπο στον ΣΔτ1.



**Συνεπώς, η αποκατάσταση της φυσιολογικής ισορροπίας του μικροβιώματος αποτελεί νέο στόχο για την πρόληψη και τη διαχείριση της ασθένειας**

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

# 1<sup>η</sup> μελέτη

# 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



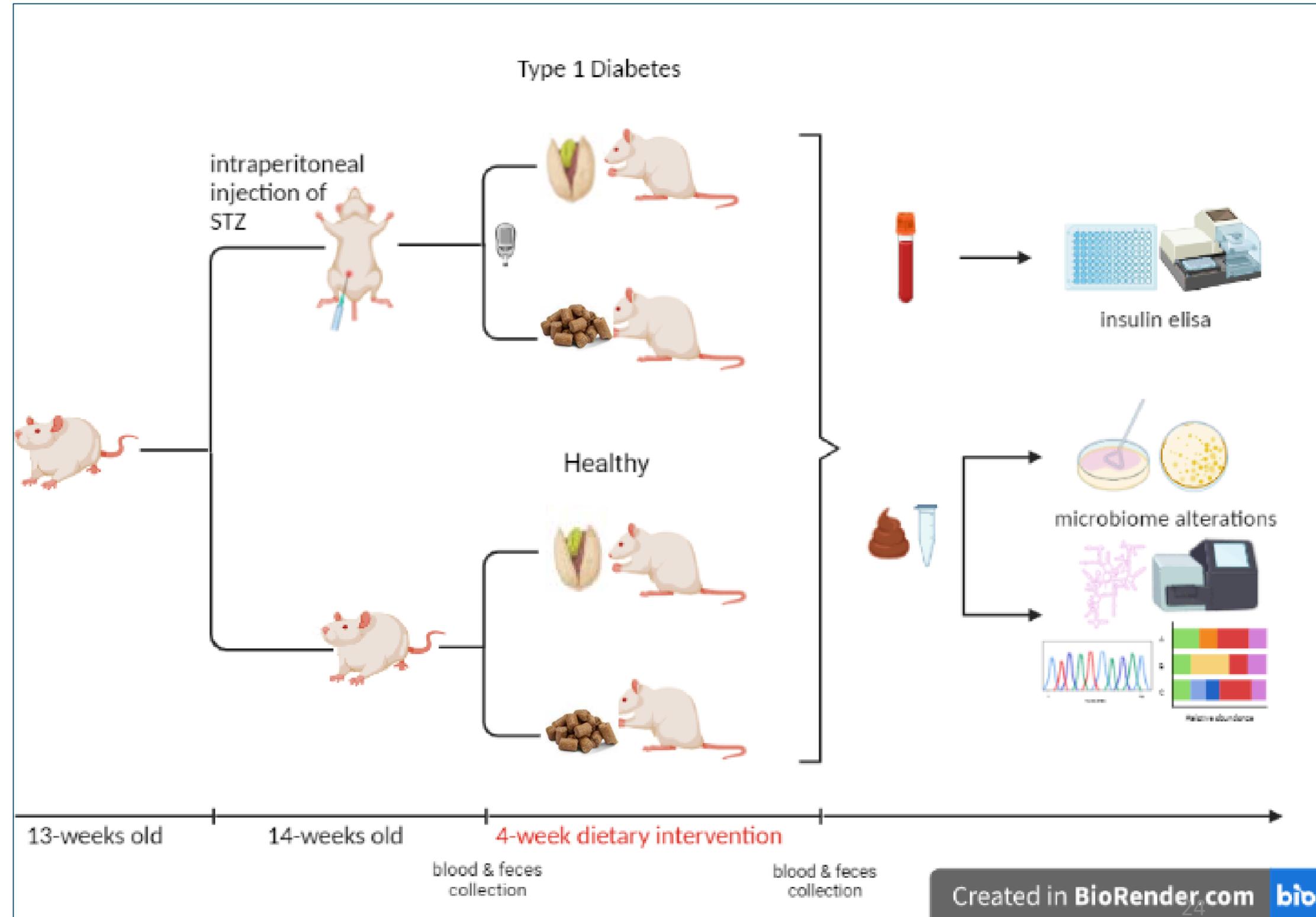
**Πρεβιοτικά:** πολύτιμα διατροφικά στοιχεία, μη αφομοιώσιμες ίνες που, μέσω του μεταβολισμού τους από μικροοργανισμούς στο έντερο,



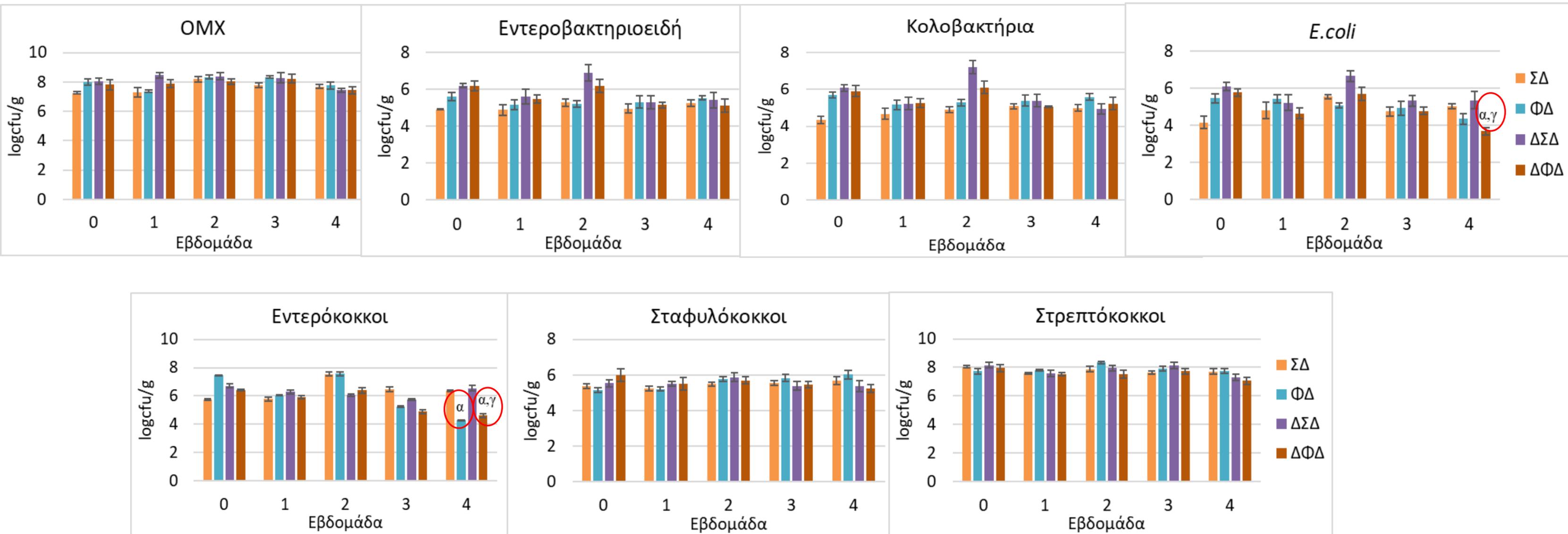
ρυθμίζουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, ενισχύοντας την ανάπτυξη και τη δράση ευεργετικών ειδών.

# Πειραματικός σχεδιασμός (1)

<b>ΣΔ</b> Υγιή με συμβατική δίαιτα	<b>ΦΔ</b> Υγιή με δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι
<b>ΔΣΔ</b> Διαβητικά με συμβατική δίαιτα	<b>ΔΦΔ</b> Διαβητικά με δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι

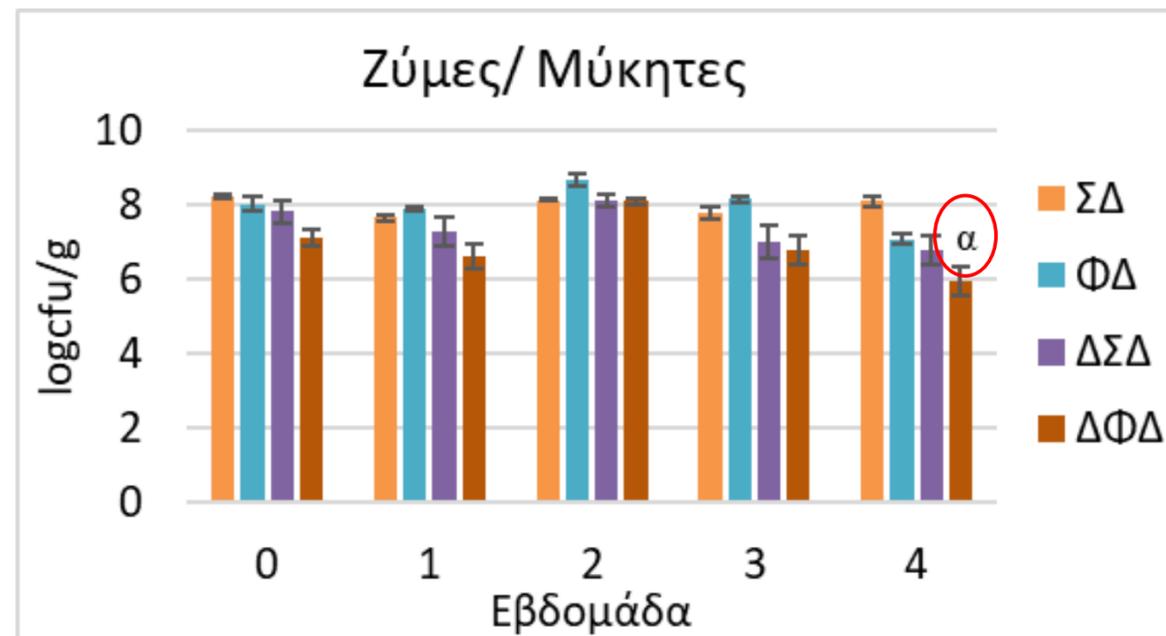
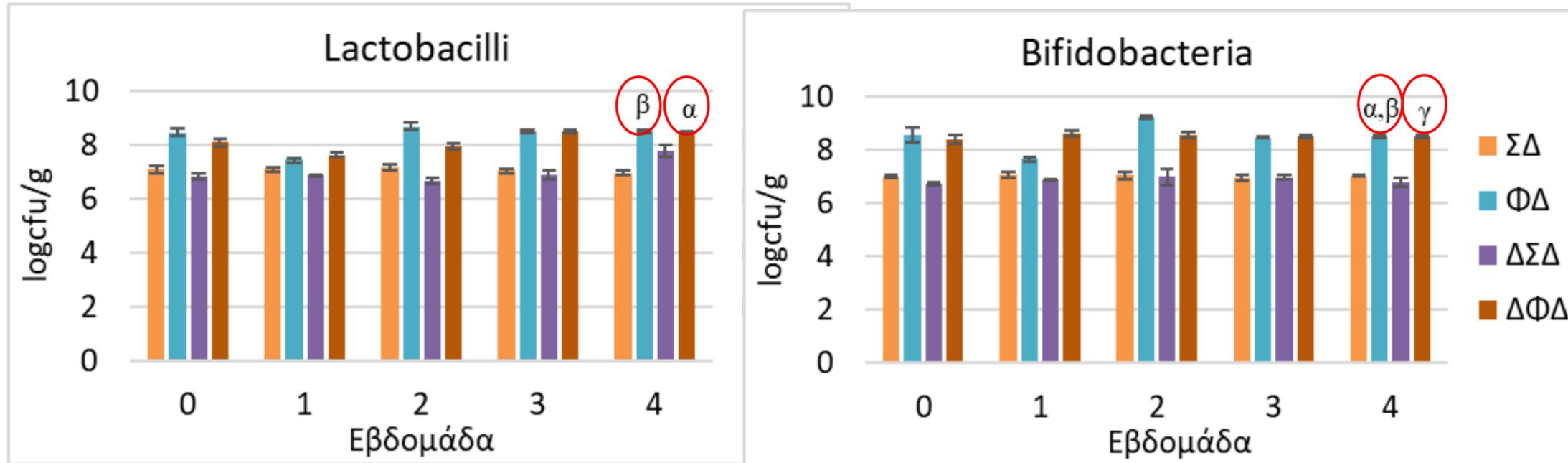


# Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



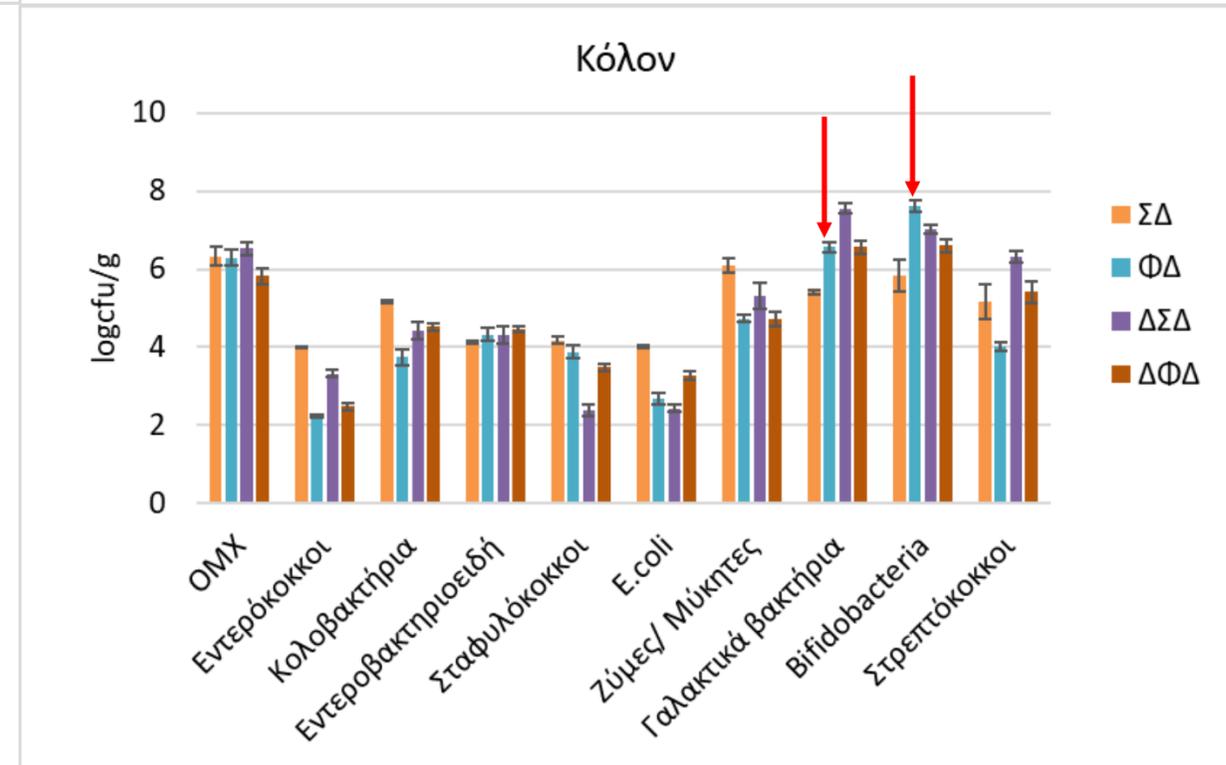
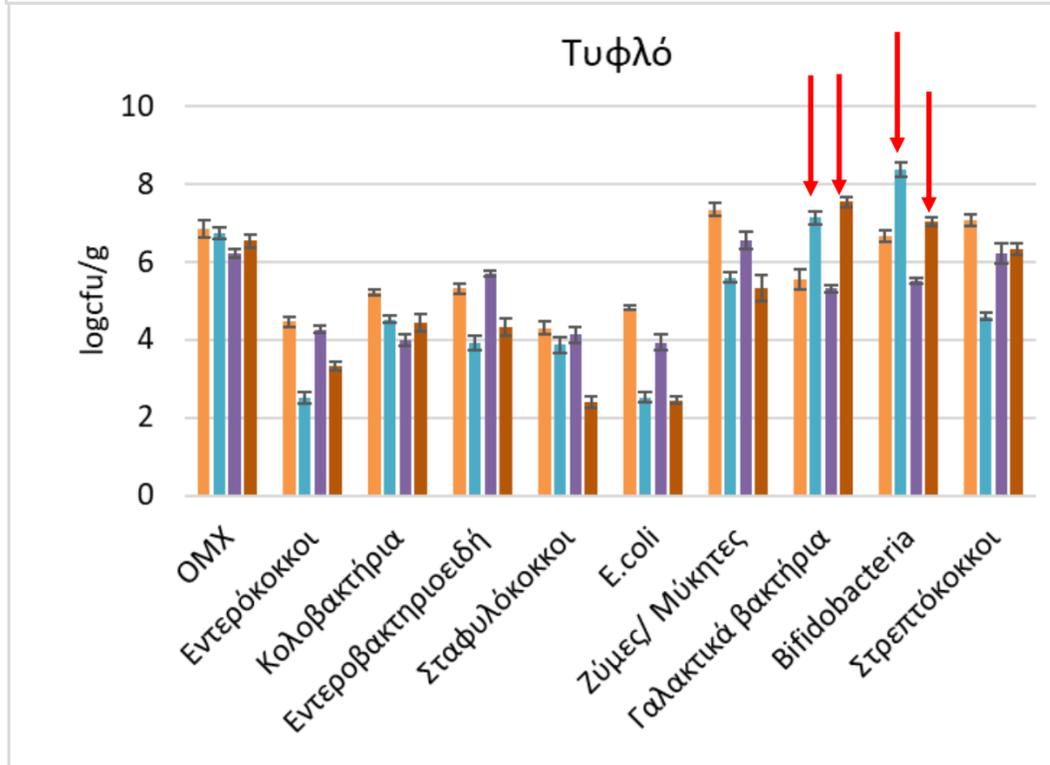
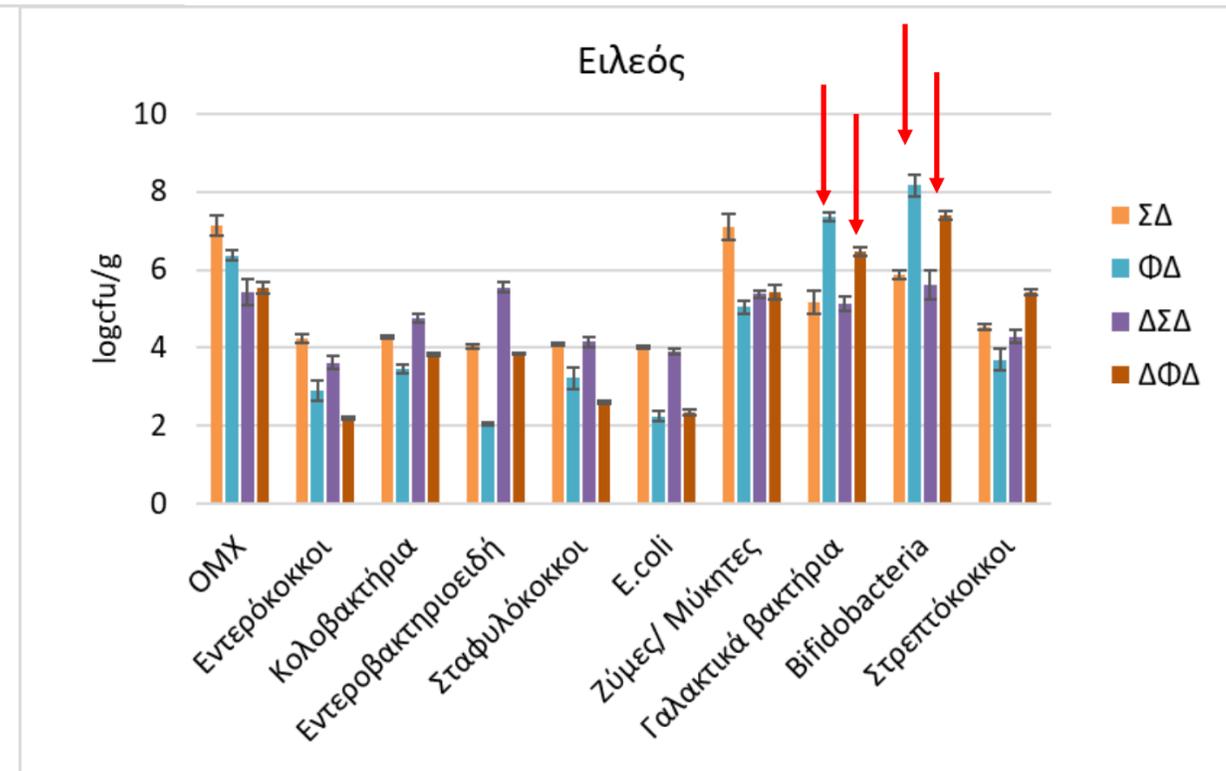
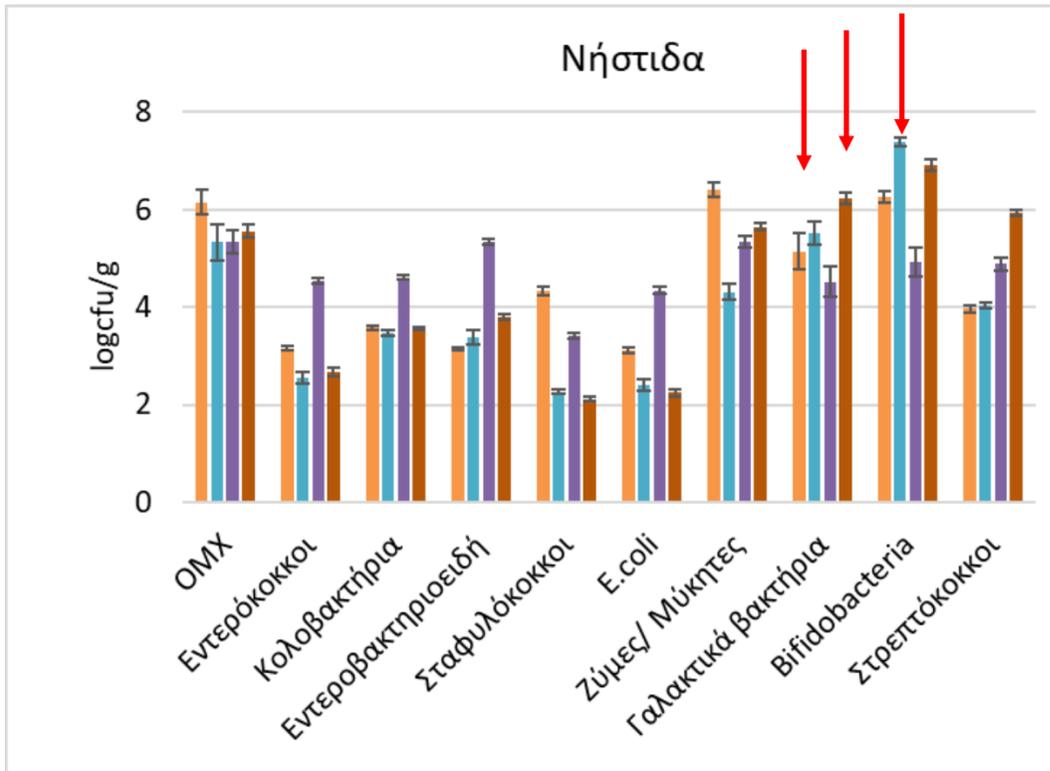
↓ Enterococci & *E. coli* στα υγιή και διαβητικά ζώα, τα οποία ακολούθησαν τη διατροφική παρέμβαση με κελυφωτό φιστίκι (εβδομάδα 4)

# Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



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

# Μικροβιολογικές αναλύσεις εντερικού ιστού



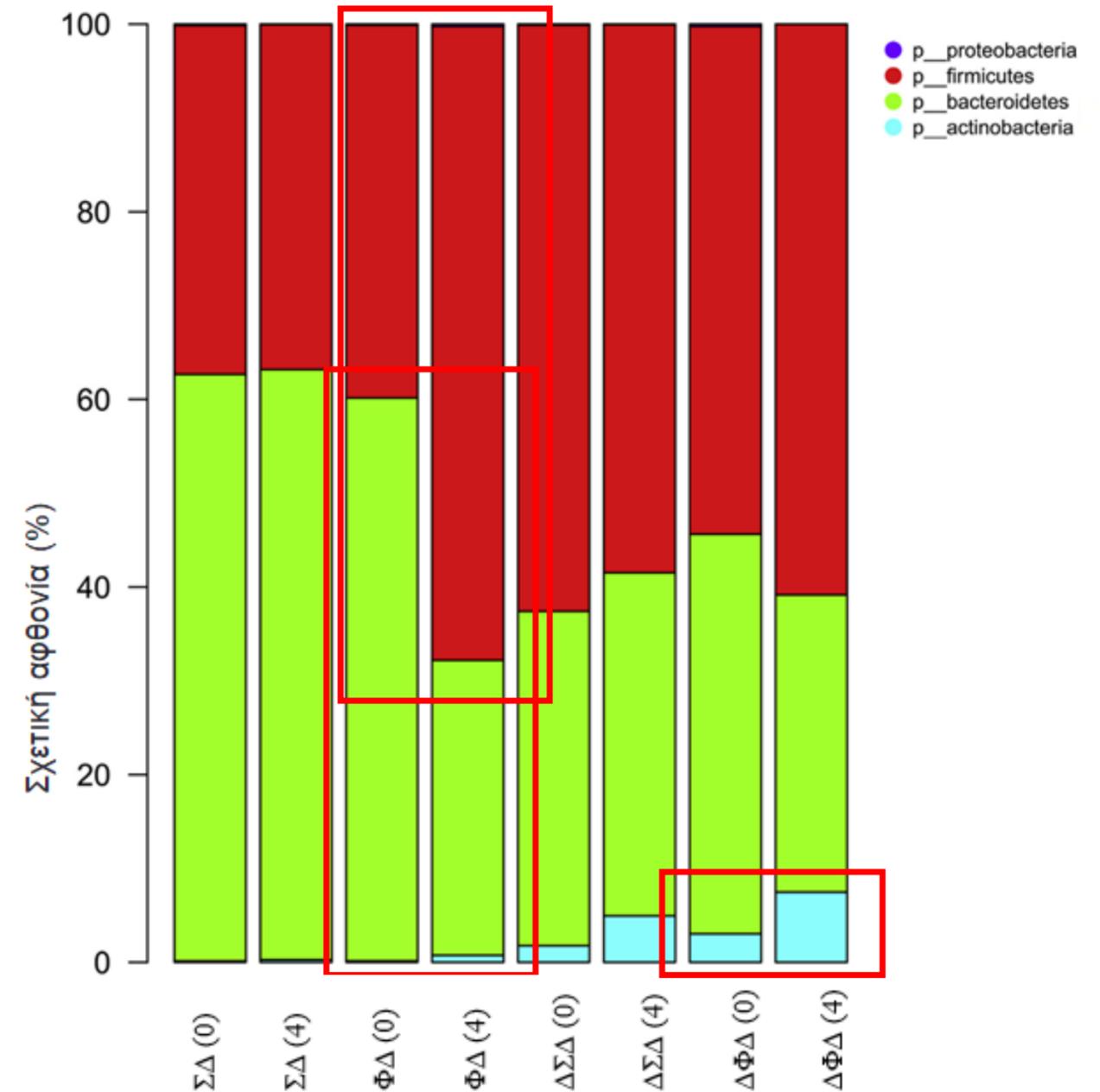
❖ ↑ bifidobacteria & lactobacilli στη νήστιδα, στον ειλεό, και στο τυφλό σε υγιή και διαβητικά ζώα που ακολούθησαν δίαιτα με κελυφωτό φιστίκι.

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

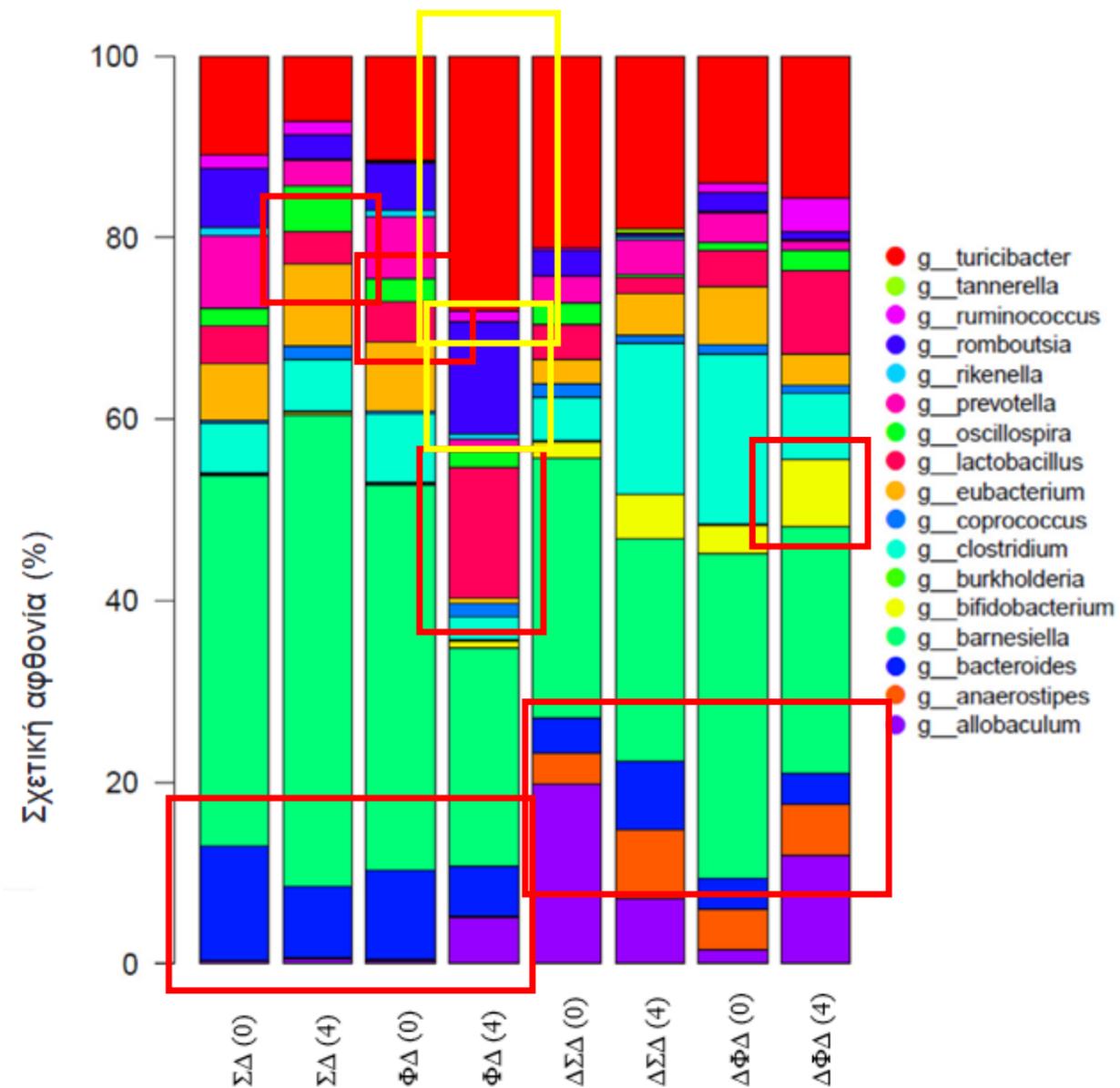
# Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο phylum

↑ Firmicutes &  
↓ Bacteroidetes στην ομάδα ΦΔ

↑ Actinobacteria στην ομάδα ΔΦΔ



# 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)

## SCFAs & γαλακτικό οξύ

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 <sup>α</sup>	1.429±0.128	0.819±0.044 <sup>α</sup>	1.508±0.200	0.711±0.030 <sup>α</sup>
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 <sup>α</sup>	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 <sup>β</sup>	0.030±0.007	0.068±0.020	0.033±0.005	0.026±0.006 <sup>γ</sup>
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](http://www.journals.elsevier.com/metabolism-open)





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

Amalia E. Yanni <sup>a,\*</sup>, Gregoria Mitropoulou <sup>b</sup>, Ioanna Prapa <sup>b</sup>, Georgios Agrogiannis <sup>c</sup>, Nikolaos Kostomitsopoulos <sup>d</sup>, Eugenia Bezirtzoglou <sup>e</sup>, Yiannis Kourkoutas <sup>b</sup>, Vaios T. Karathanos <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Physical Chemistry of Foods, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, Athens, Greece  
<sup>b</sup> Laboratory of Applied Microbiology and Biotechnology, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, GR, 68100, Greece  
<sup>c</sup> First Department of Pathology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece  
<sup>d</sup> Laboratory Animal Facility, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece  
<sup>e</sup> 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**



Article

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

Ioanna Prapa <sup>1</sup>, Amalia E. Yanni <sup>2,\*</sup>, Anastasios Nikolaou <sup>1</sup>, Nikolaos Kostomitsopoulos <sup>3</sup>, Nick Kalogeropoulos <sup>2</sup>, Eugenia Bezirtzoglou <sup>4</sup>, Vaios T. Karathanos <sup>2</sup> and Yiannis Kourkoutas <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> 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.)
  - <sup>2</sup> 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.)
  - <sup>3</sup> Laboratory Animal Facility, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece; nkostom@bioacademy.gr
  - <sup>4</sup> 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.)

<https://doi.org/10.3390/app12094606>

# Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης

## Μικροβιακό στέλεχος

*Pediococcus acidilactici* SK που επιλέχθηκε μετά από *in vitro* αξιολόγηση των προβιοτικών του ιδιοτήτων, στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Καινοτόμα

Λειτουργικά Τρόφιμα: Ανάπτυξη, Παραγωγή, Χαρακτηρισμός, Ιδιότητες-

iFUNFoods»

# Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης



Νιφάδες ζέας

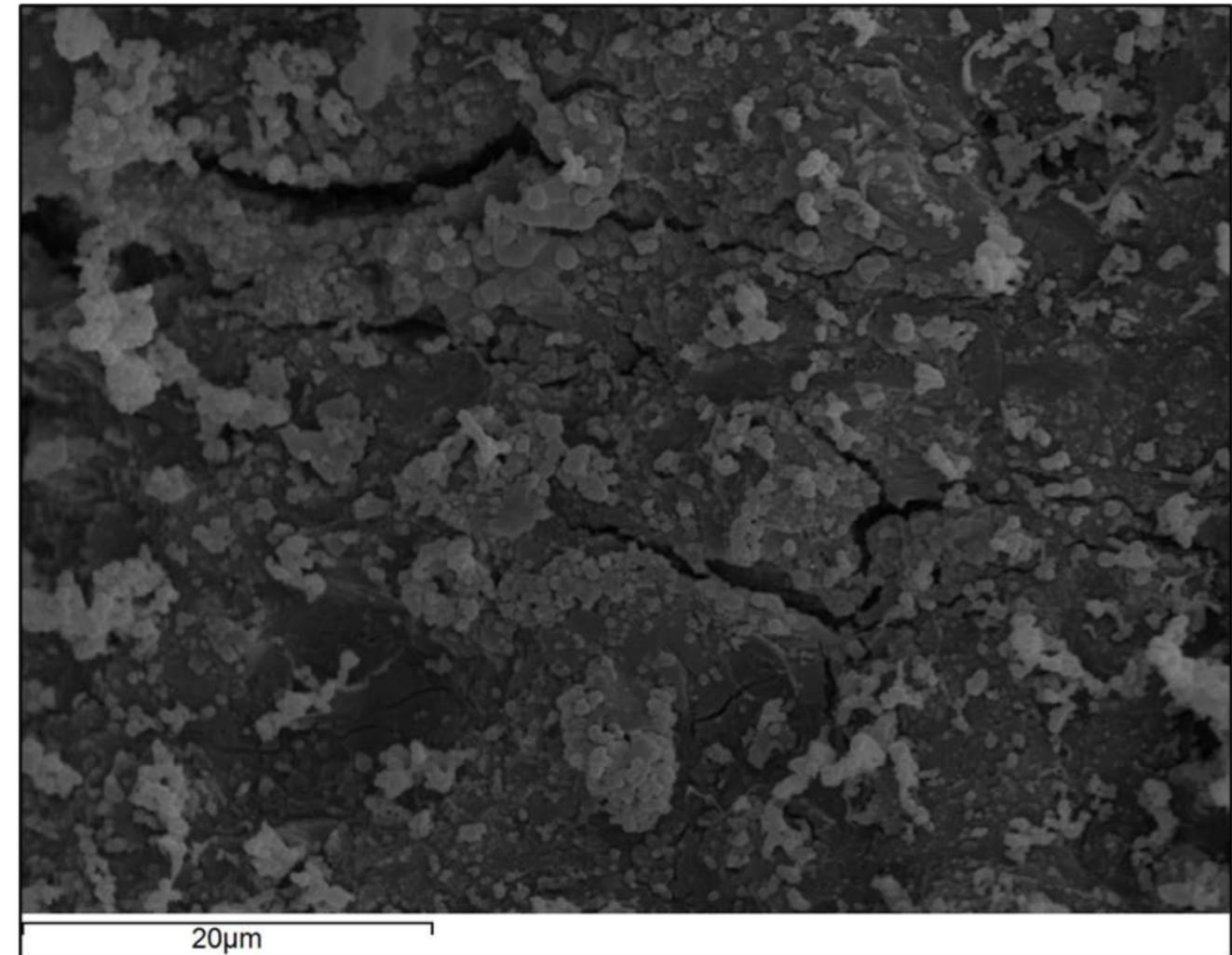
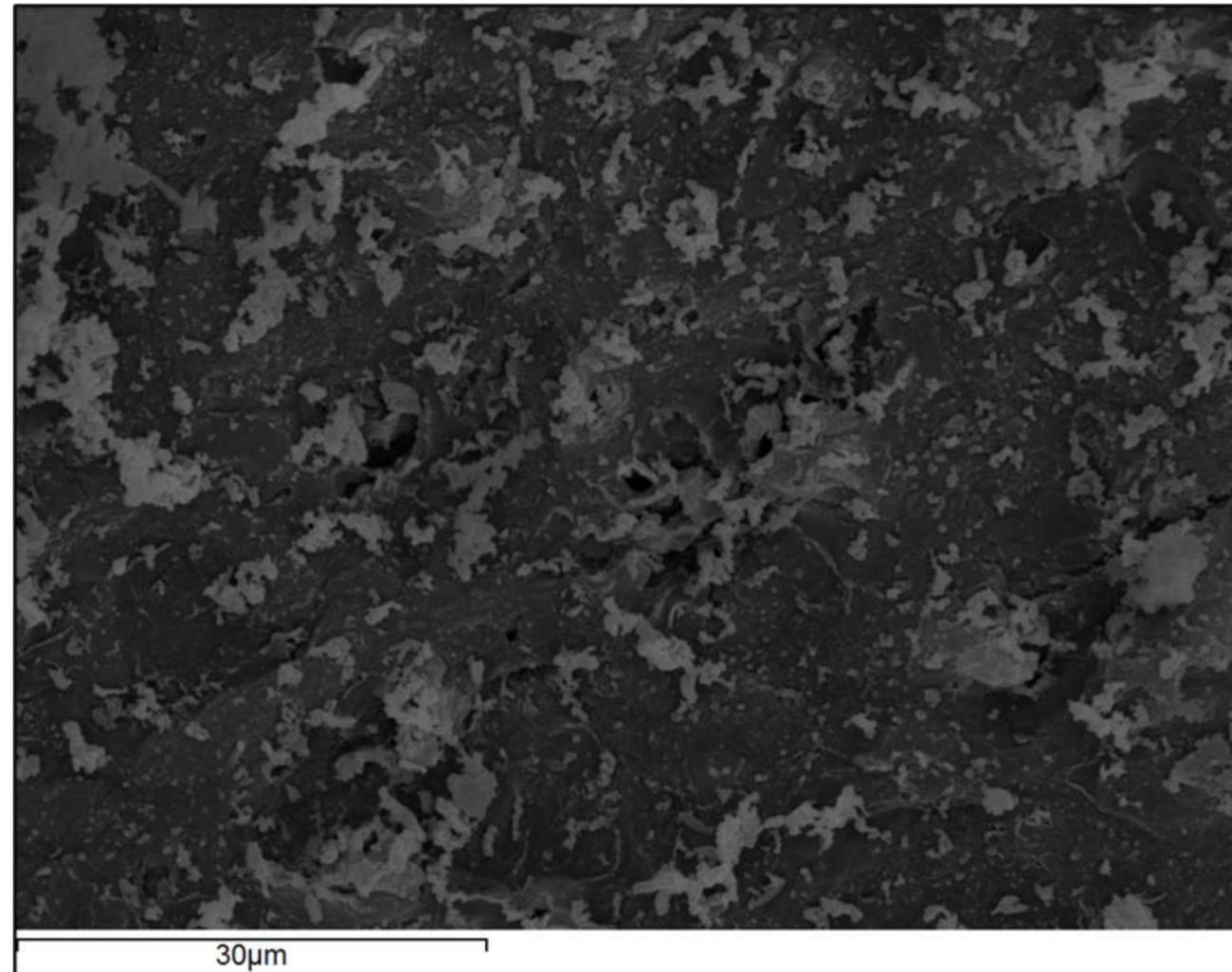


Κελυφωτό φιστίκι



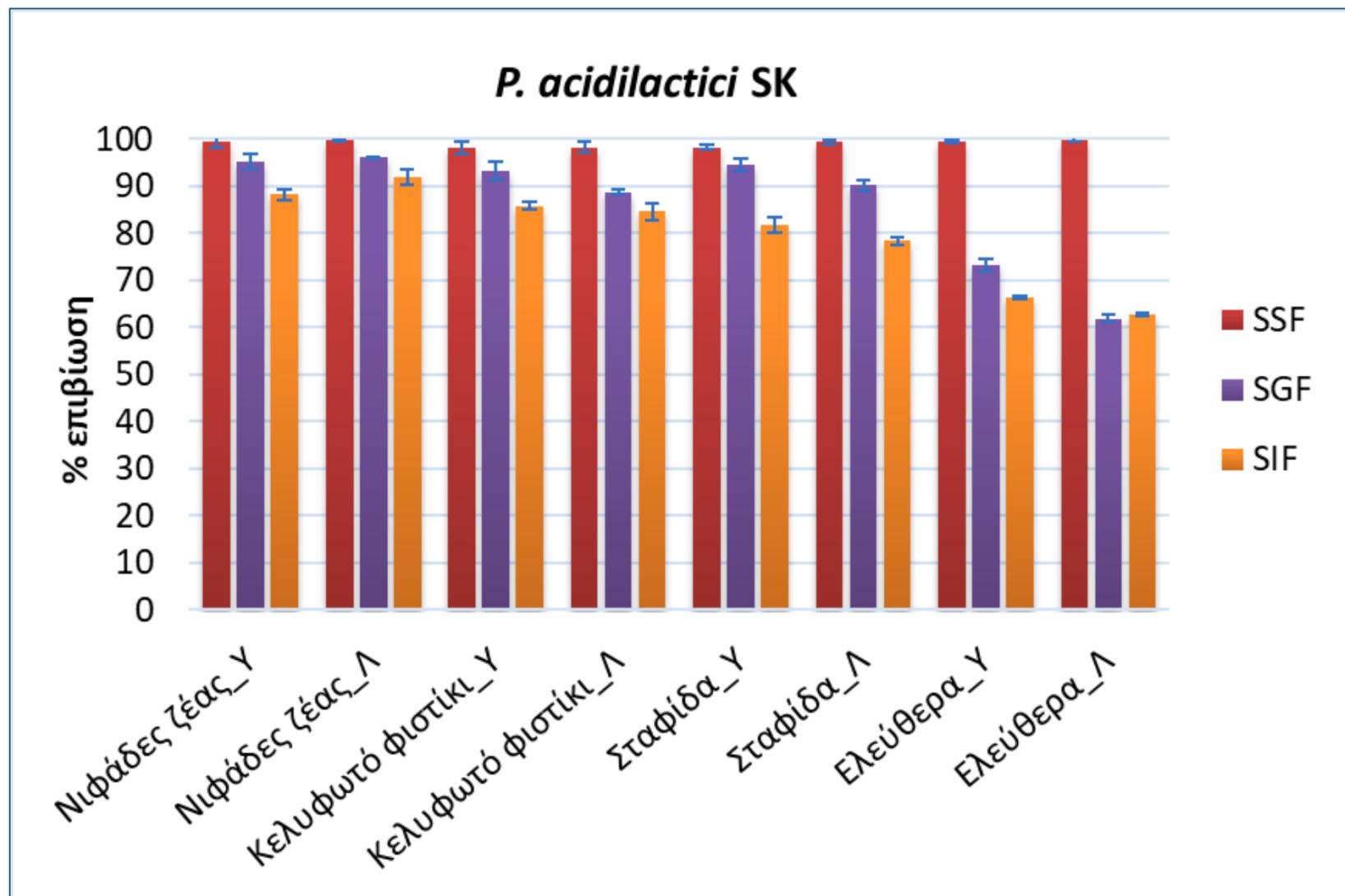
Σταφίδα

# Ξηρά ακινητοποιημένα κύτταρα σε φυσικούς φορείς ακινητοποίησης



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

# 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:  
ακινητοποιημένα > ελεύθερα

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

# Πειραματικός σχεδιασμός (2)

Η ημερήσια δόση των κυττάρων γαλακτικών βακτηρίων ορίστηκε στα  $2 \times 10^9$  cfu

## ΣΔ+P

Υγιή με συμβατική διαίτα & ελεύθερα κύτταρα *P. acidilactici* SK

## ΦΔ+P

Υγιή με διαίτα με ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε φιστίκι

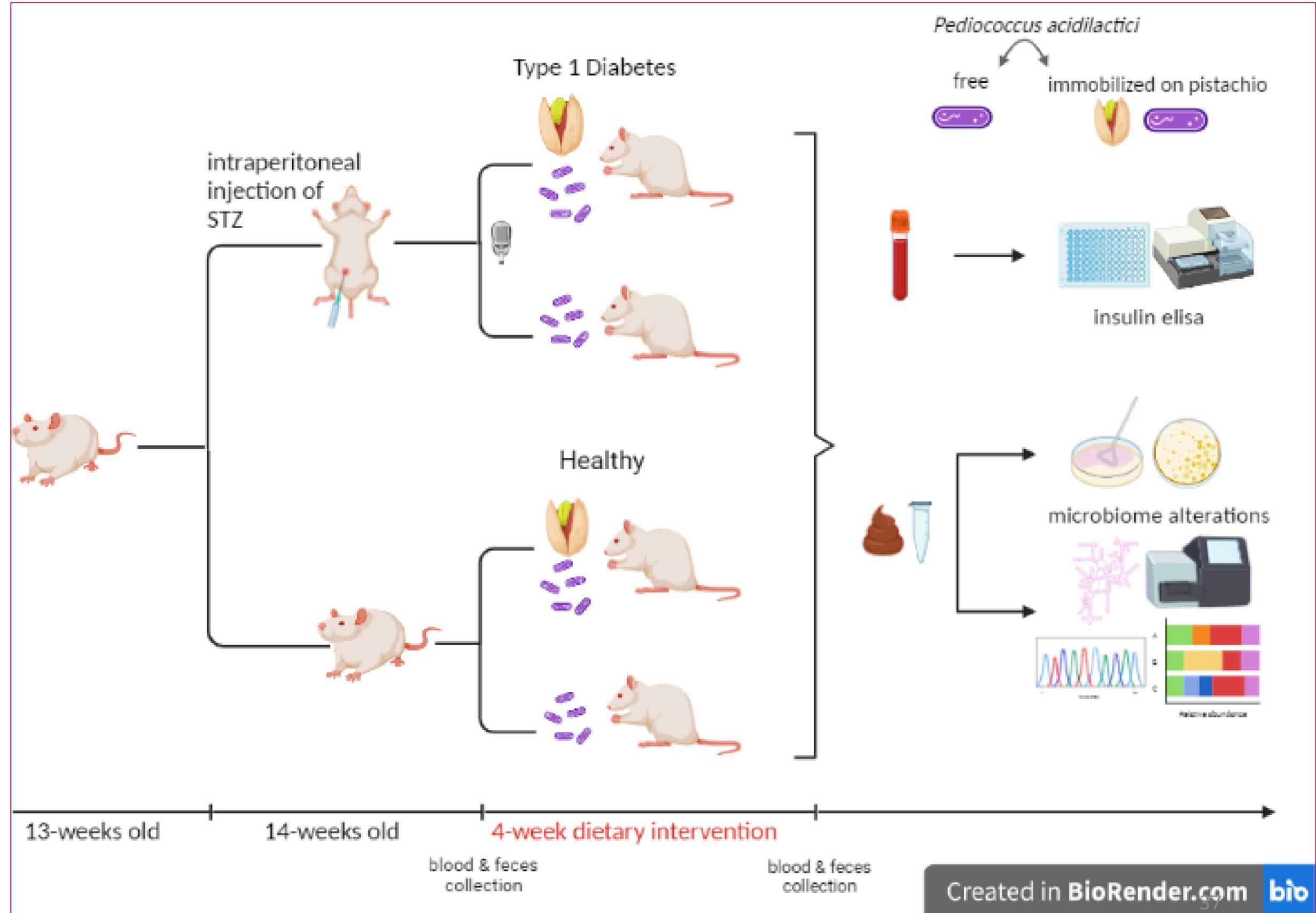
## ΔΣΔ+P

Διαβητικά συμβατική διαίτα & ελεύθερα κύτταρα *P. acidilactici* SK

## ΔΦΔ+P

Διαβητικά με διαίτα με ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε φιστίκι

*Proof of concept*



# Σωματικό βάρος, Επίπεδα Ινσουλίνης & Γλυκόζης πλάσματος

## Βιοχημικές αναλύσεις

Εβδομάδα	ΦΔ+P		ΣΔ+P		ΔΦΔ+P		ΔΣΔ+P	
	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 <sup>α,β,γ</sup>	402.1±11.9	334.6±10.3 <sup>α,β,γ</sup>
Γλυκόζη (mg/dL)	124.83±5.71	133.00±5.40	100.33±5.58	123.17±9.72	360.67±3.06 <sup>β,γ</sup>	407.00±14.36 <sup>β,γ</sup>	324.67±22.70 <sup>β,γ</sup>	392.83±29.65 <sup>β,γ</sup>
Ινσουλίνη (ng/mL)	5.07± 0.47	5.75±0.64	4.74±0.51	4.61±0.82	1.28±0.13 <sup>β,γ</sup>	1.43±0.23 <sup>β,γ</sup>	1.15±0.07 <sup>β,γ</sup>	1.74±0.13 <sup>β,γ</sup>
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 <sup>β,γ</sup>	78.33±4.19 <sup>α</sup>	57.33±4.77 <sup>β,γ</sup>	86.50±3.98 <sup>α</sup>
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)
<b>ΦΔ+P</b>	26.91±2.64	26.27±2.62	15.6±1.65
<b>ΣΔ+P</b>	26.37±1.96	24.38±8.00	14.03±1.43
<b>ΔΦΔ+P</b>	24.32±3.24	57.59±0.99 <sup>α,β</sup>	14.46±1.10
<b>ΔΣΔ+P</b>	23.04±0.68	67.91±4.82 <sup>α,β</sup>	16.02±1.43

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

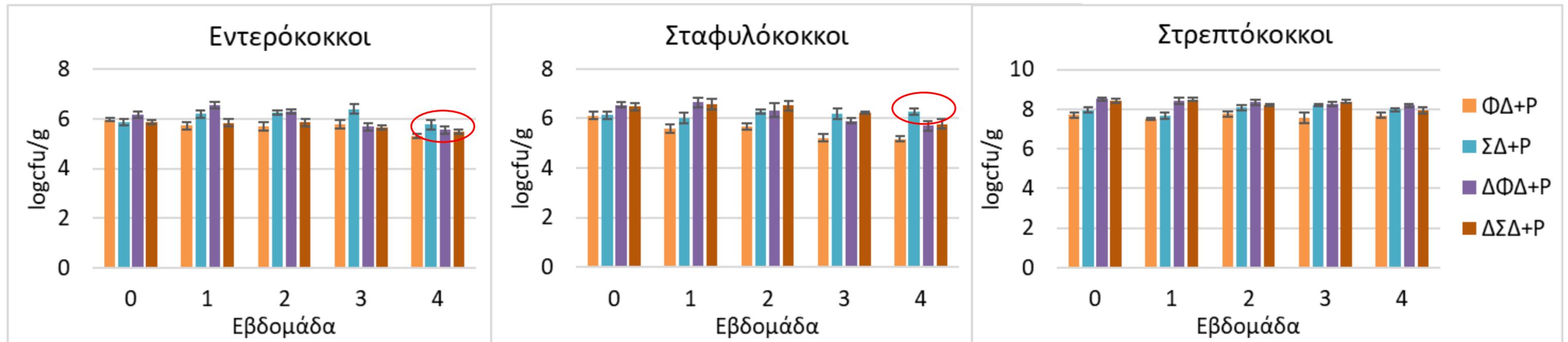
↑IL-1b στις διαβητικές

ομάδες (ΔΦΔ+P και ΔΣΔ+P) σε

σύγκριση με τις ομάδες υγιών

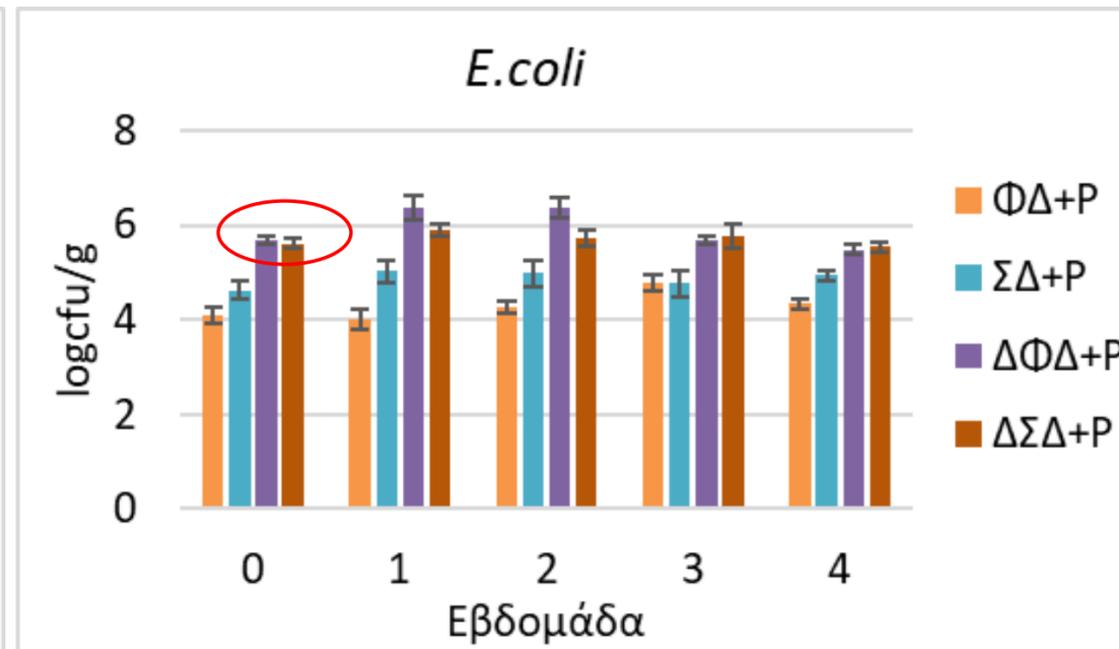
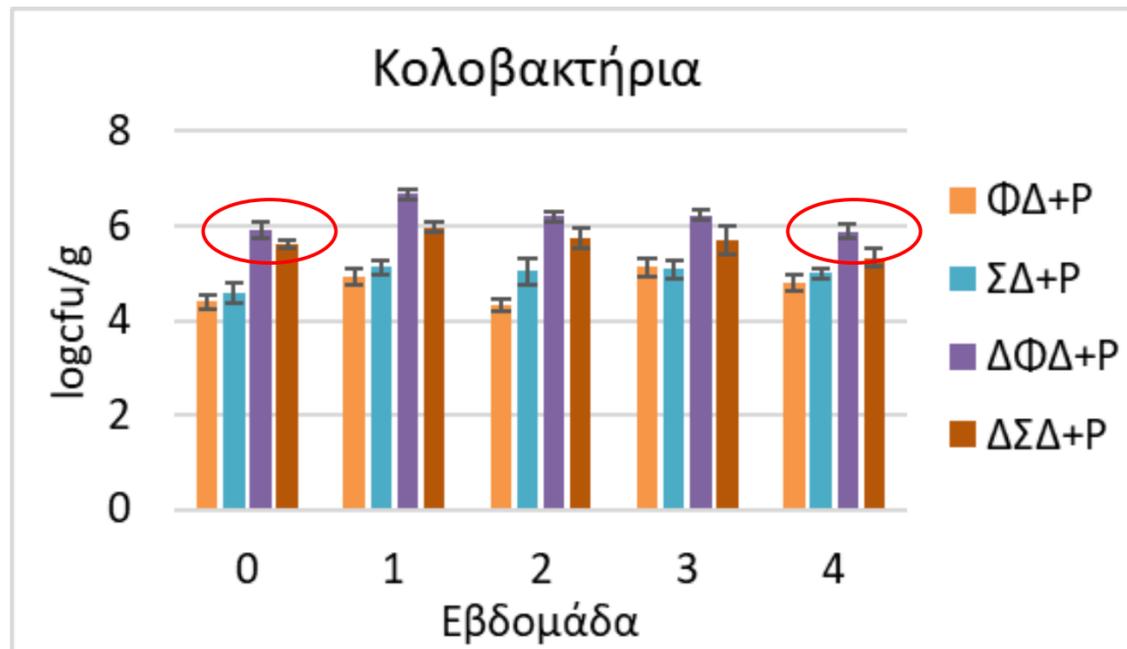
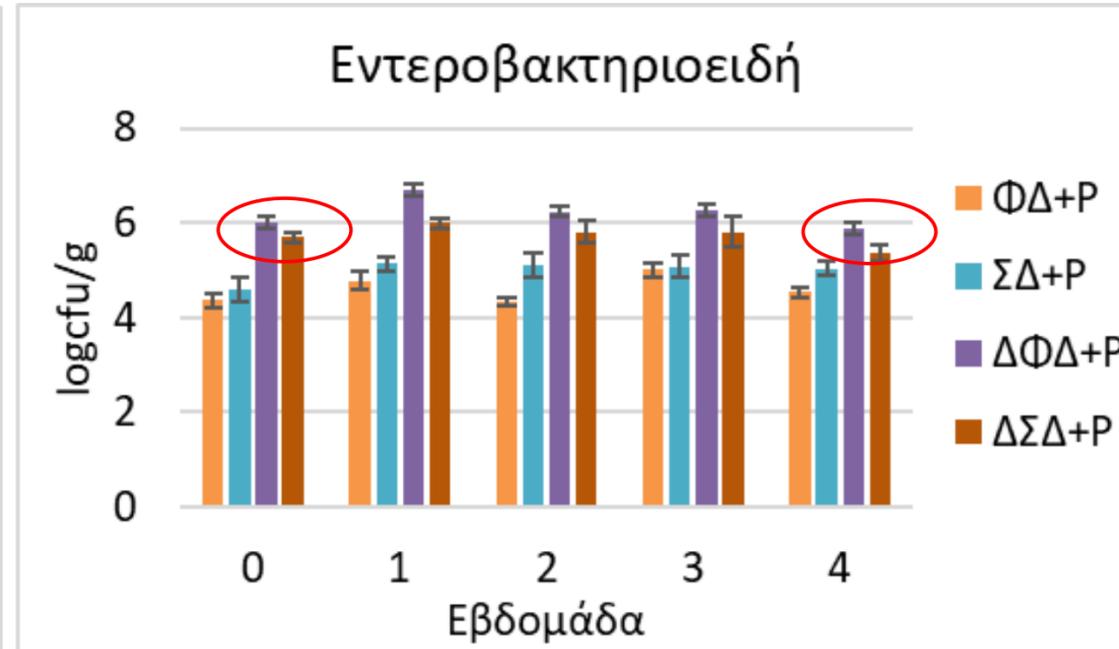
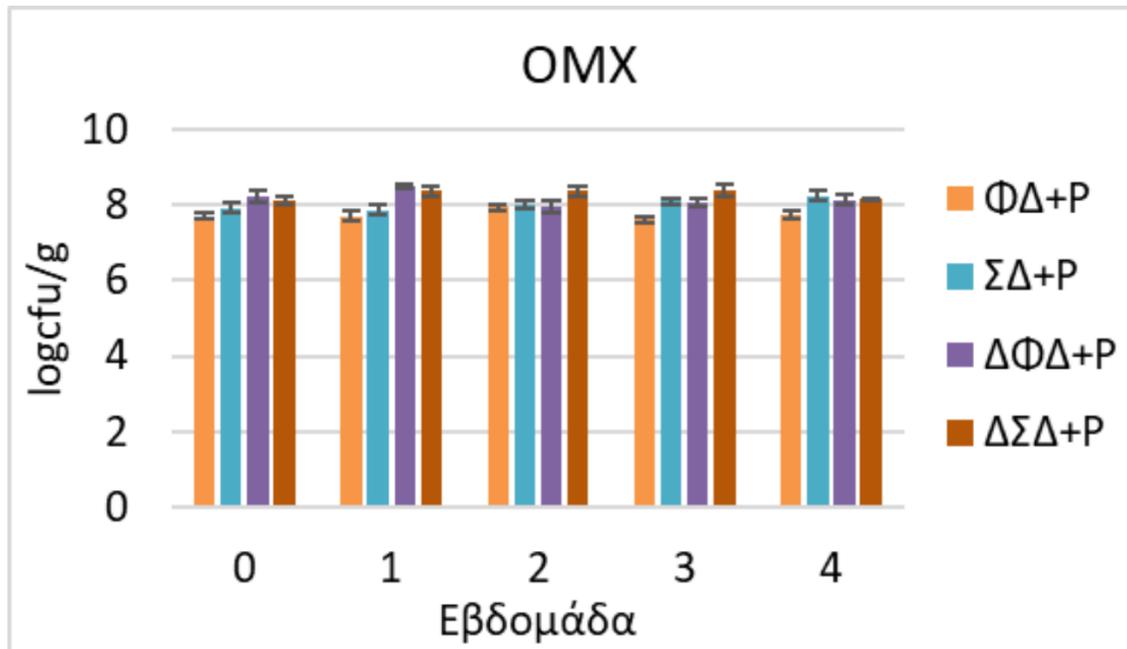
ζώων (ΦΔ+P και ΣΔ+P)

# Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων



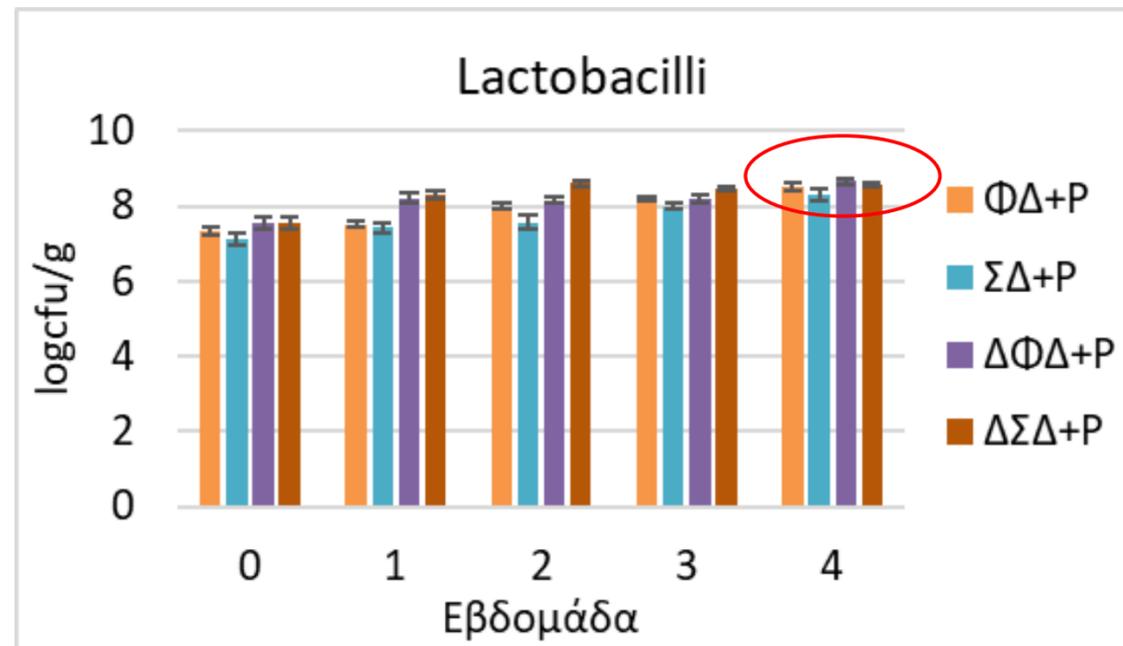
- ↓ Enterococci στους επίμυες που κατανάλωσαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι (εβδομάδα 4).
- ↓ Staphylococci σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα που κατανάλωσαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι (εβδομάδα 4).

# Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων

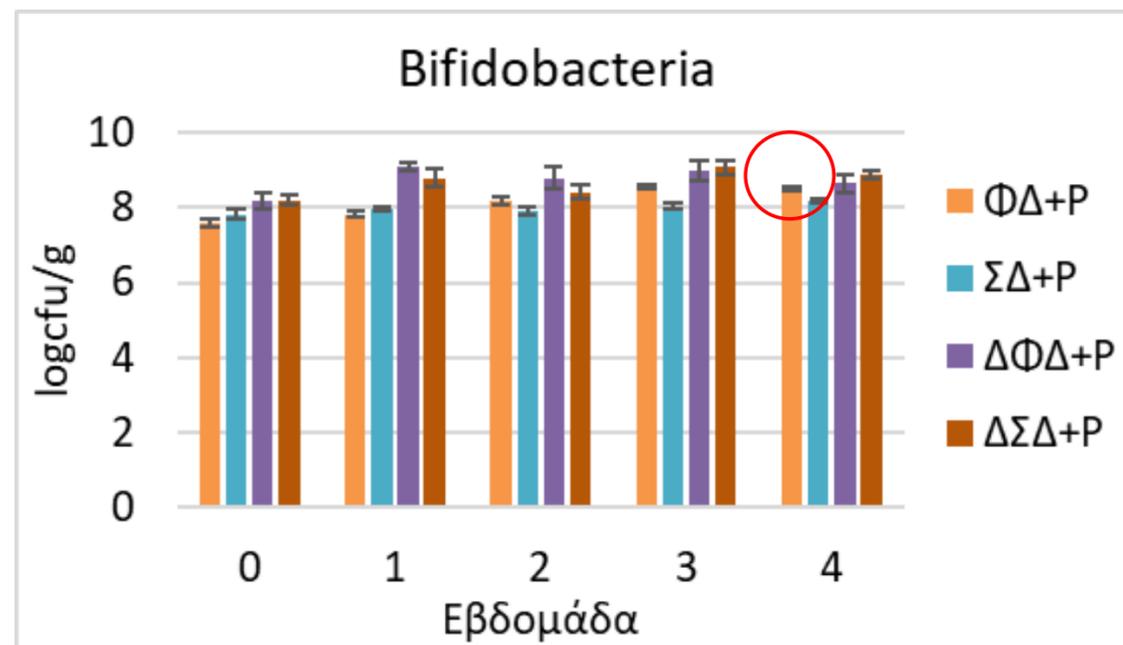


- ↑ *Enterobacteriaceae* & coliforms στα διαβητικά ζωικά πρότυπα (εβδομάδες 0 & 4)
- ↑ *E. coli* στα διαβητικά ζωικά πρότυπα (εβδομάδα 0)

# Μικροβιολογικές αναλύσεις κοπράνων

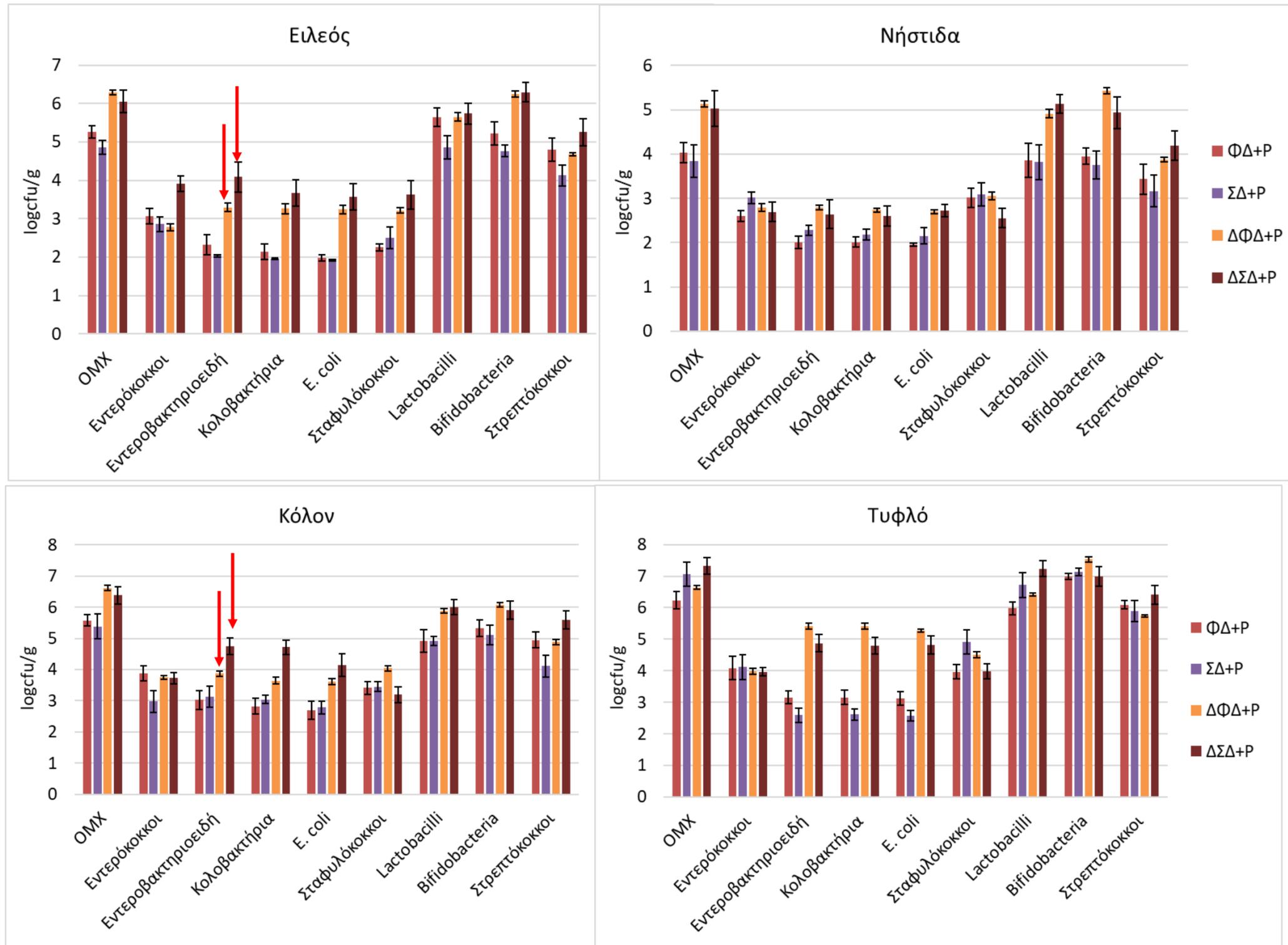


- ↑ Lactobacilli σε όλες τις ομάδες (εβδομάδα 4)



- ↑ Bifidobacteria στα υγιή ζωικά πρότυπα (εβδομάδα 4)

# Μικροβιολογικές αναλύσεις εντερικού ιστού

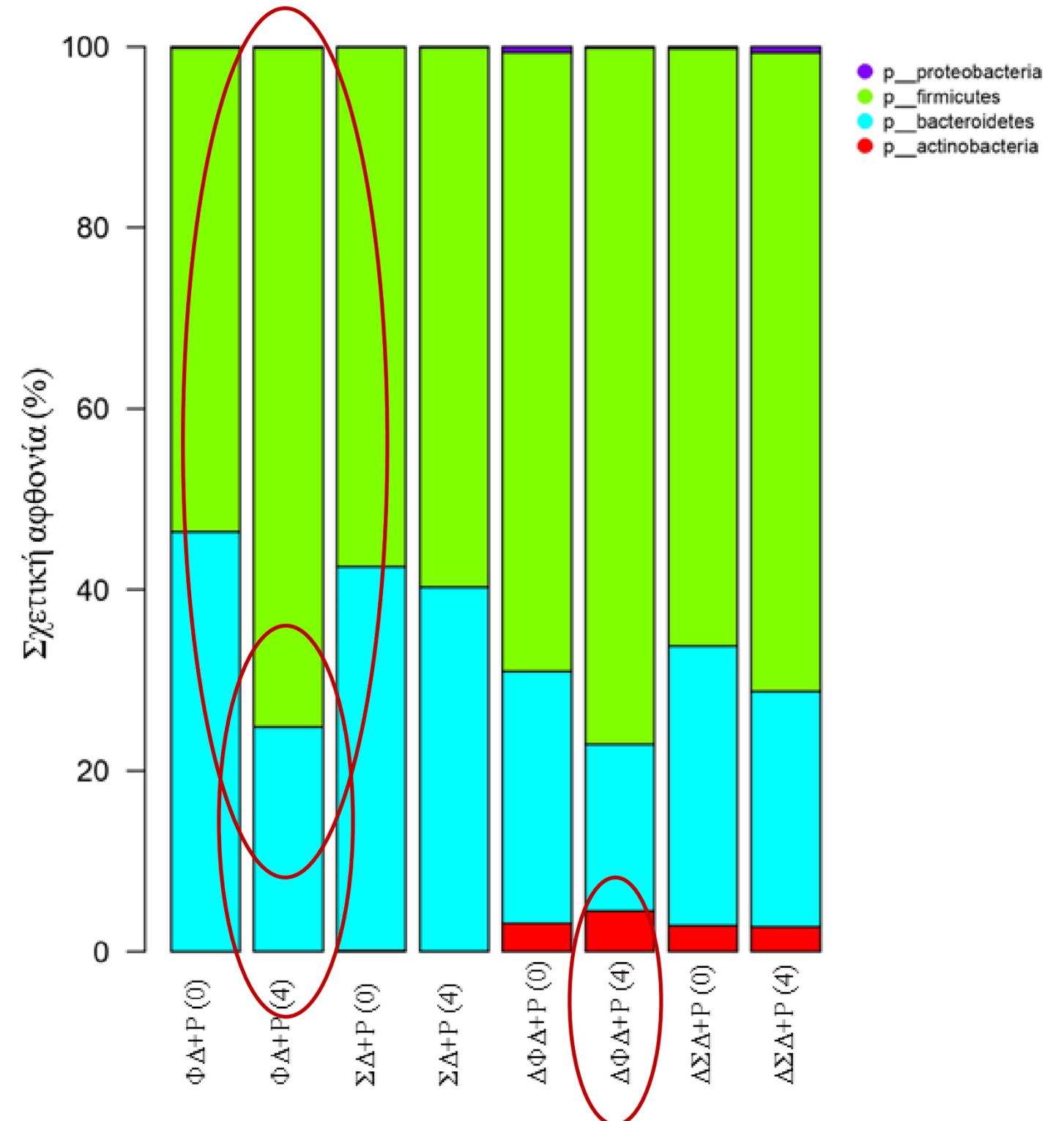


Στα εντερικά τμήματα του ειλεού και στο κόλον των διαβητικών ζωικών προτύπων παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα των εντεροβακτηρίων μετά την κατανάλωση ακινητοποιημένων κυττάρων *P. acidilactici* SK σε κελυφωτό φιστίκι.

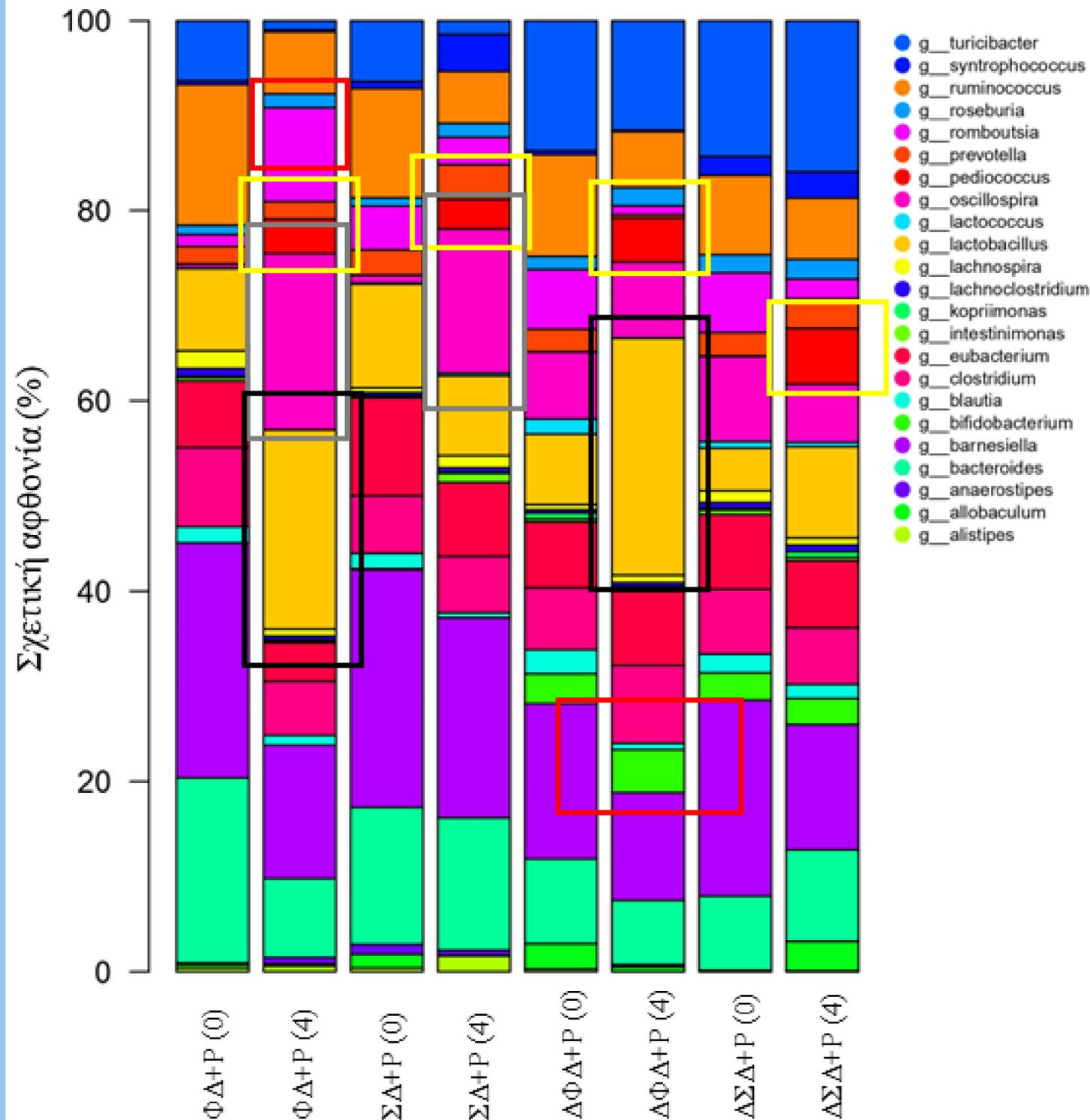
# Αποτελέσματα NGS ανάλυσης - Επίπεδο phylum

↑ Firmicutes &  
↓ Bacteroidetes στην ομάδα ΦΔ+P

↑ 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* στις ομάδες ΦΔ+P και ΔΦΔ+P συγκριτικά με την έναρξη του πρωτοκόλλου και με τις ομάδες ΣΔ+P και ΔΣΔ+P
- ↑ *Oscillospira* στις ομάδες υγιών πειραματοζώων (ΣΔ+P και ΦΔ+P)
- ↑ *Romboutsia* στην ομάδα ΦΔ+P
- ↑ *Bifidobacterium* στην ομάδα ΔΦΔ+P

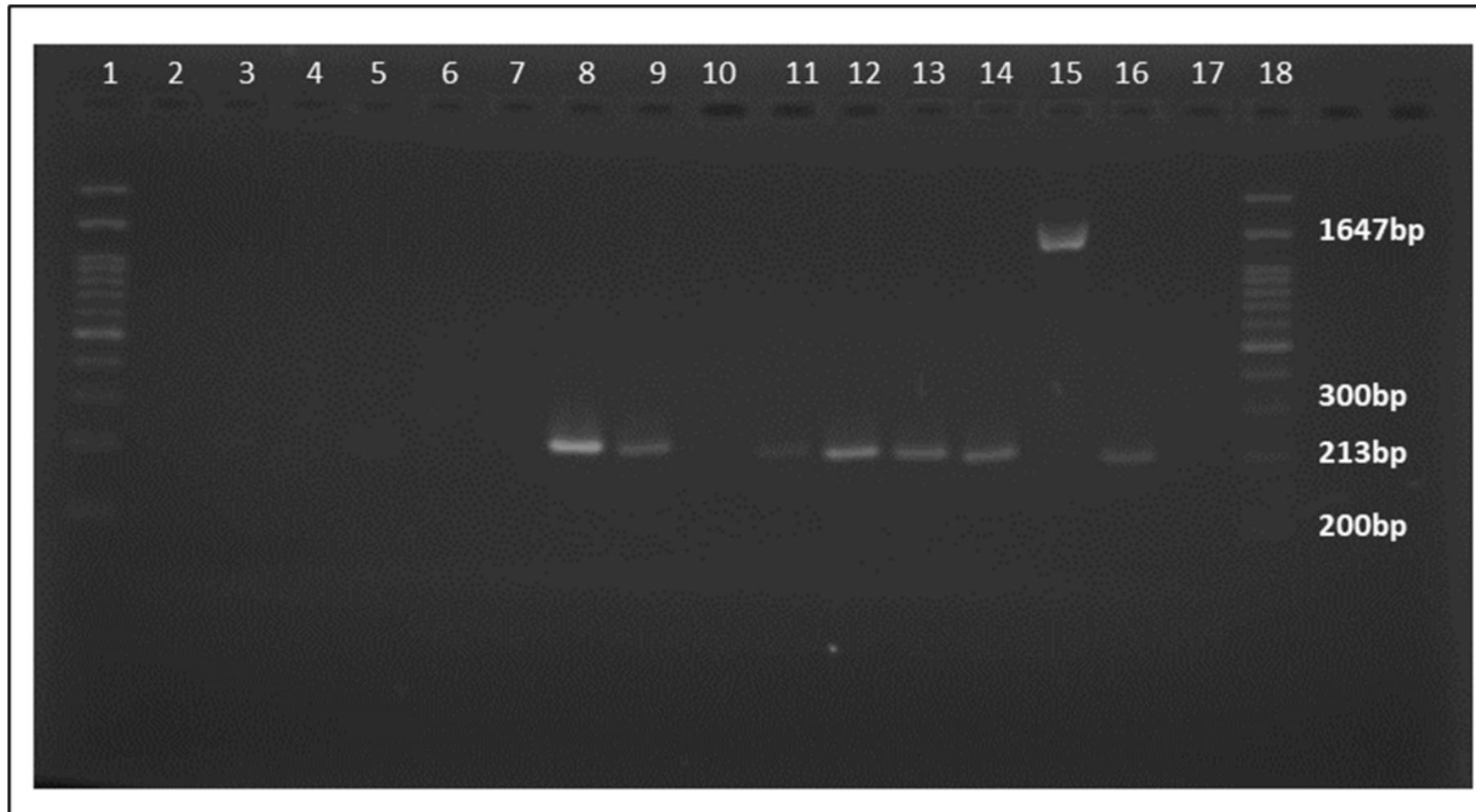
# SCFAs & γαλακτικό οξύ

Εβδομάδα	ΦΔ+P		ΣΔ+P		ΔΦΔ+P		ΔΣΔ+P	
	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 <sup>β,γ</sup>	0.997±0.105 <sup>α</sup>	1.310±0.085 <sup>β,γ</sup>	0.759±0.077 <sup>α</sup>
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 *Pediococcus* 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.



Article

## Functional Modulation of Gut Microbiota and Blood Parameters in Diabetic Rats Following Dietary Intervention with Free or Immobilized *Pediococcus acidilactici* SK Cells on Pistachio Nuts

Ioanna Prapa <sup>1</sup>, Amalia E. Yanni <sup>2,\*</sup>, Vasiliki Kompoura <sup>1</sup>, Gregoria Mitropoulou <sup>1</sup>, Panayiotis Panas <sup>3</sup>, Nikolaos Kostomitsopoulos <sup>4</sup> and Yiannis Kourkoutas <sup>1,\*</sup>

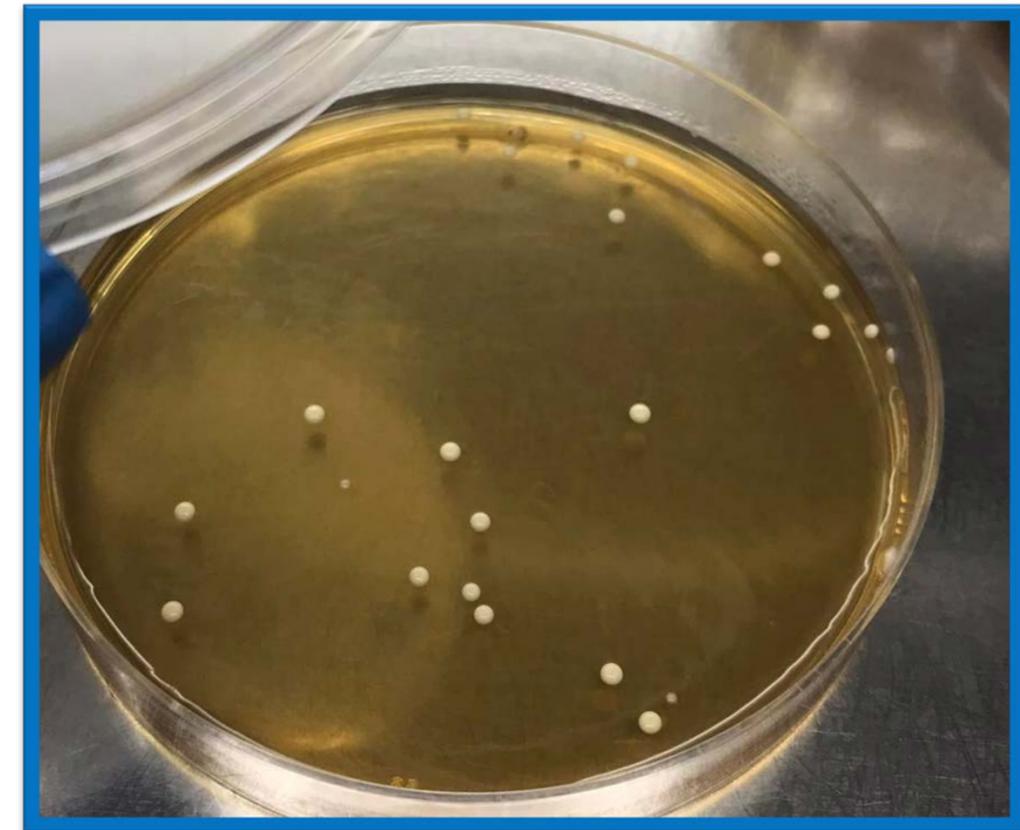
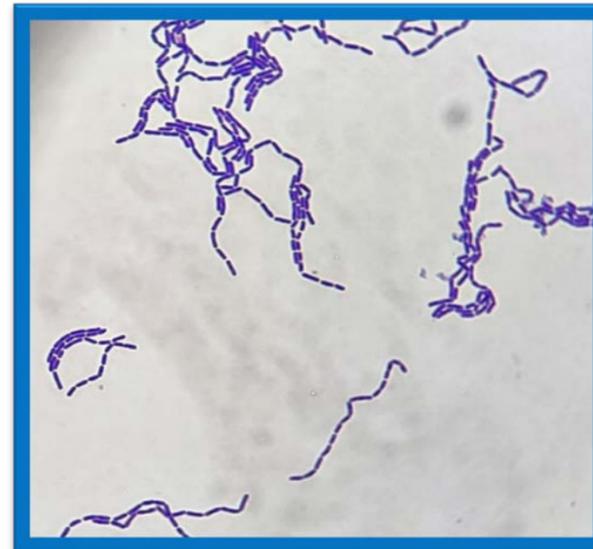
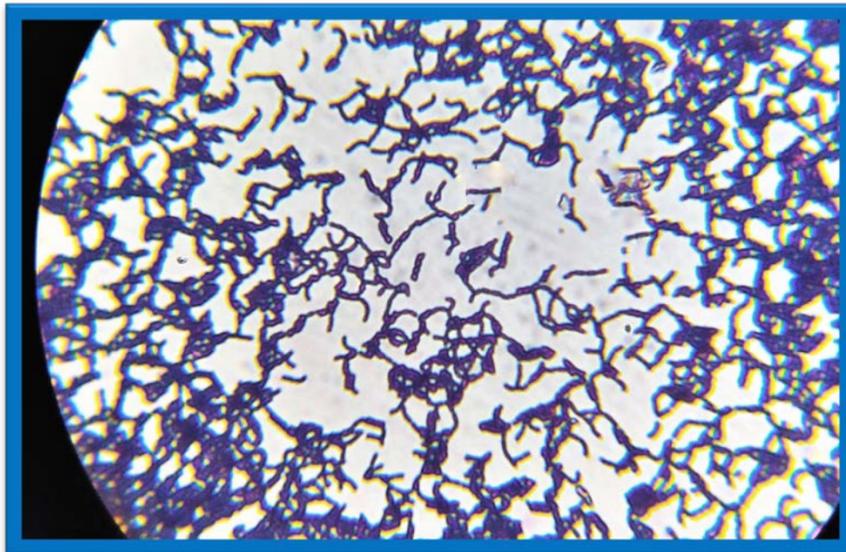
# 2<sup>η</sup> μελέτη

# Απομόνωση μικροοργανισμών

---

Δείγμα προέλευσης	Απομονωμένα αγρίου τύπου στελέχη (πλήθος)
Ελιές (καρπός)	ΟΛΤΗ-1, ΟΛΤΗ-2, ΟΛΤΗ-3, ΟΛΤΗ-4, ΟΛΡΙΚ-1, ΟΛΡΙΚ-2, ΟΛΡΙΚ-3, ΟΛΡΙΚ-4, ΟΛΧΑΛ-1, ΟΛΧΑΛ-2, ΟΛΧΑΛ-3, ΟΛΧΑΛ-4 <b>(12)</b>
Ελιές (άλμη)	ΑΛΤΗ-1, ΑΛΤΗ-2, ΑΛΤΗ-3, ΑΛΤΗ-4 <b>(4)</b>
Τυρί τύπου φέτα	ΧΗΤΗ-1, ΧΗΤΗ-2, ΧΗΤΗ-3, ΧΗΤΗ-4 <b>(4)</b>

---



# Ταυτοποίηση μικροοργανισμών

## Βιοχημική ταυτοποίηση (API test)



(α)

(β)

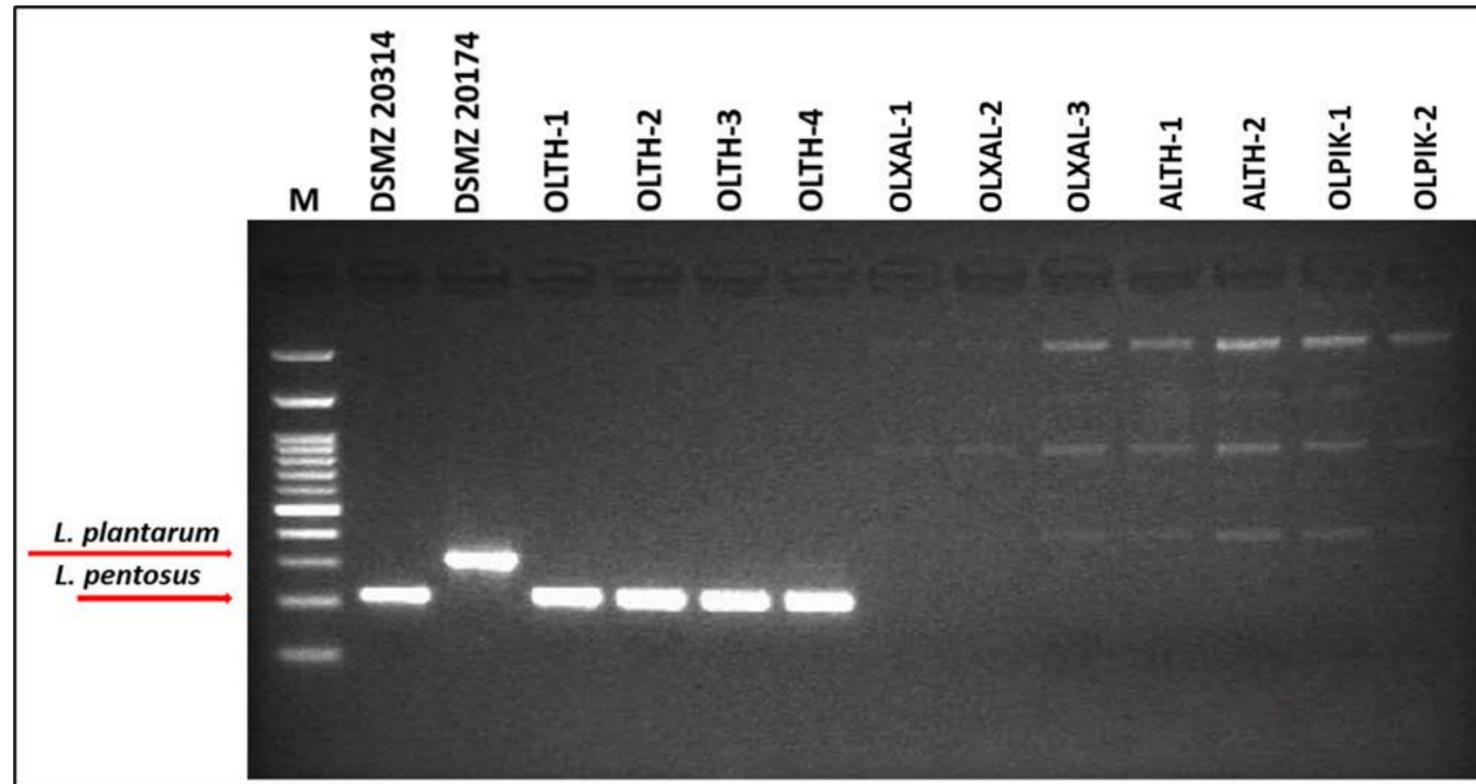
(γ)

(δ)

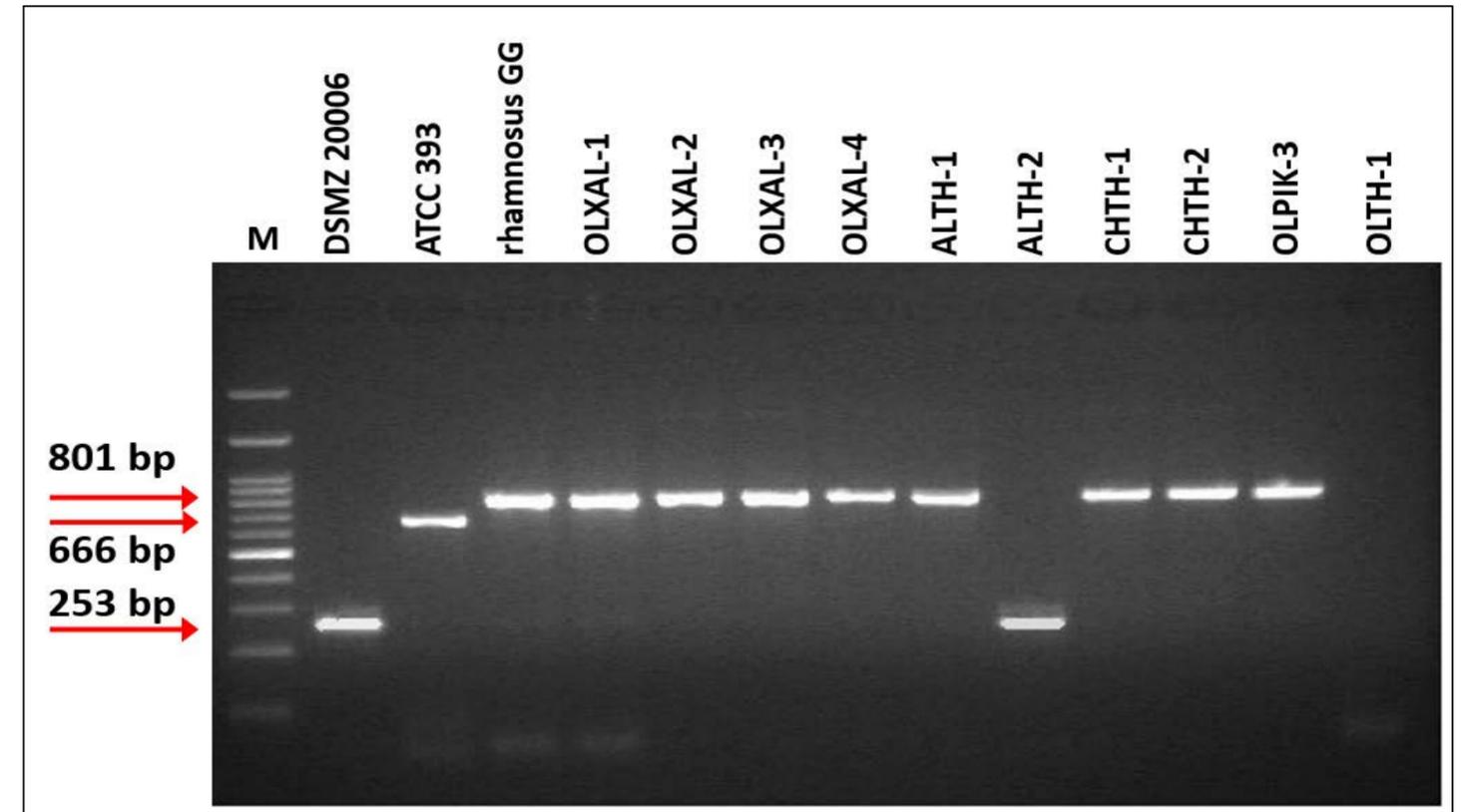
Ενδεικτικές φωτογραφίες της ταυτοποίησης των αγρίου τύπου στελεχών (α) OLXAL-1, (β) ALTH-2, (γ) OLTH-2 και (δ) OLPIK-1 σε επίπεδο γένους/είδους μέσω βιοχημικών αναλύσεων (API tests). Η αλλαγή χρώματος στο θρεπτικό υποδηλώνει την ικανότητα ανάπτυξης παρουσία του εκάστοτε υποστρώματος.

# Ταυτοποίηση μικροοργανισμών

## Μοριακή ταυτοποίηση (multiplex PCR)



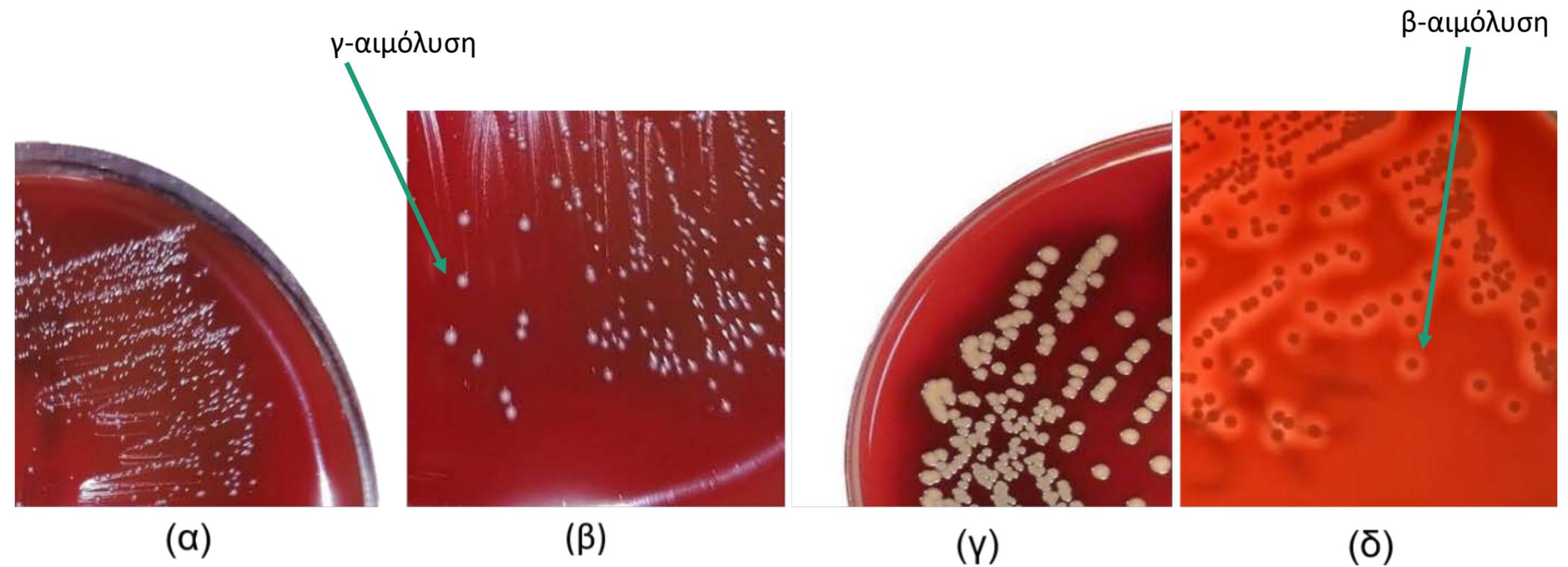
Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων μετά την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου *recA* με multiplex PCR. M: DNA ladder 100 bp. DSMZ 20314: πρότυπο στέλεχος *L. pentosus* 20314, DSMZ 20174: πρότυπο στέλεχος *L. plantarum* 20174. Από το ζεύγος εκκινητών *pentF/pREV* προκύπτει ένα μοναδικό προϊόν PCR μεγέθους 218 bp, ενώ από το ζεύγος εκκινητών *plantF/pREV* προκύπτει ένα μοναδικό προϊόν PCR μεγέθους 318 bp.



Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων μετά την ενίσχυση περιοχής του γονιδίου *mutL* με multiplex PCR. M: DNA ladder 100 bp. DSMZ 20006: πρότυπο στέλεχος *L. paracasei* 20006, ATCC 393: πρότυπο στέλεχος *L. casei* ATCC 393, rhamnosus GG: πρότυπο στέλεχος *L. rhamnosus* GG. Τα βέλη υποδεικνύουν τα προϊόντα της αντίδρασης: pcr προϊόν μεγέθους 253 bp για στελέχη *L. paracasei*, pcr προϊόν μεγέθους 666 bp για στελέχη *L. casei*, PCR προϊόν μεγέθους 801 bp για στελέχη *L. rhamnosus*.

# Κριτήρια ασφάλειας

## Αιμολυτική δράση



Αιμολυτική ικανότητα του στελέχους (α) *L. rhamnosus* OLXAL-1, (β) *L. rhamnosus* GG (αρνητικός μάρτυρας) και (γ, δ) *S. aureus* MRSA (θετικός μάρτυρας).

# Κριτήρια ασφάλειας

## Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) αντιβιοτικών (μg/mL) έναντι της κυτταρικής ανάπτυξης επιλεγμένων αγρίου τύπου στελεχών.

Αγρίου τύπου στέλεχος	Αντιβιοτικά							
	T	K	G	S	E	A	Ch	Cl
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> OLXAL-1	1	64	8	8	1	4	4	1
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> OLXAL-2	1	64	16	8	1	8 <sup>R</sup>	8 <sup>R</sup>	1
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> OLXAL-3	1	64	16	16	1	8 <sup>R</sup>	8 <sup>R</sup>	1
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> OLXAL-4	1	64	16	16	1	4	8 <sup>R</sup>	1
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> CHTH-2	1	64	8	16	1	4	8 <sup>R</sup>	1
Τιμές ορίου (cut-off values) – <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8	64	16	32	1	4	4	1
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> OLTH-1	8	64	4	Δ.Α	1	16 <sup>R</sup>	4	8 <sup>R</sup>
Τιμές ορίου (cut-off values) – <i>Lactobacillus pentosus</i>	32	64	16	Δ.Α	1	2	8	2

Δ.Α: Δεν απαιτείται (EFSA, 2012).

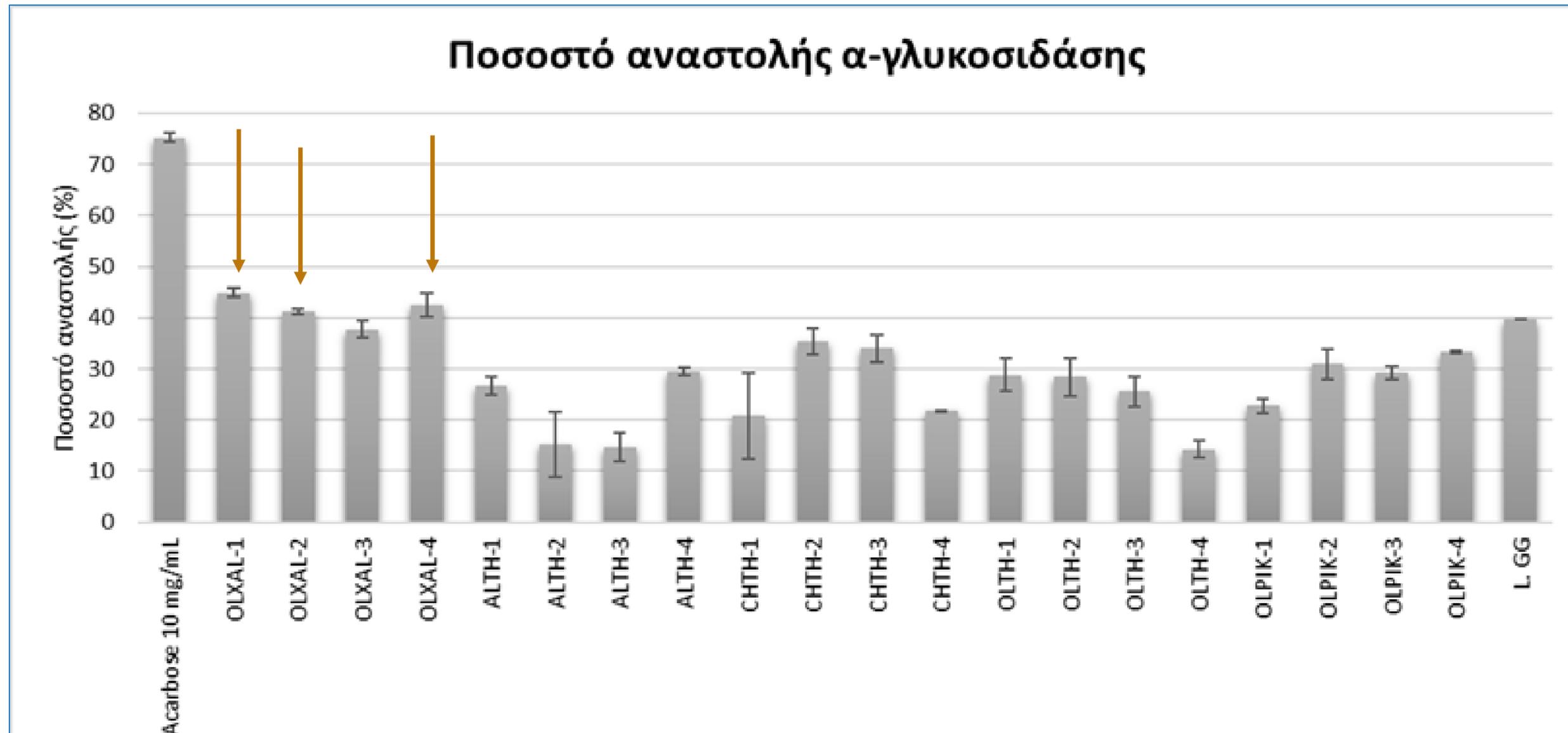
T: τετρακυκλίνη, K: καναμυκίνη, G: γενταμυκίνη, A: αμπικιλίνη, S: στρεπτομυκίνη, E: ερυθρομυκίνη, Ch: χλωραμφαινικόλη, Cl: κλινδαμυκίνη.

R: ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, σύμφωνα με τις τιμές ορίου που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων - EFSA (EFSA, 2012).

# Λειτουργικά χαρακτηριστικά

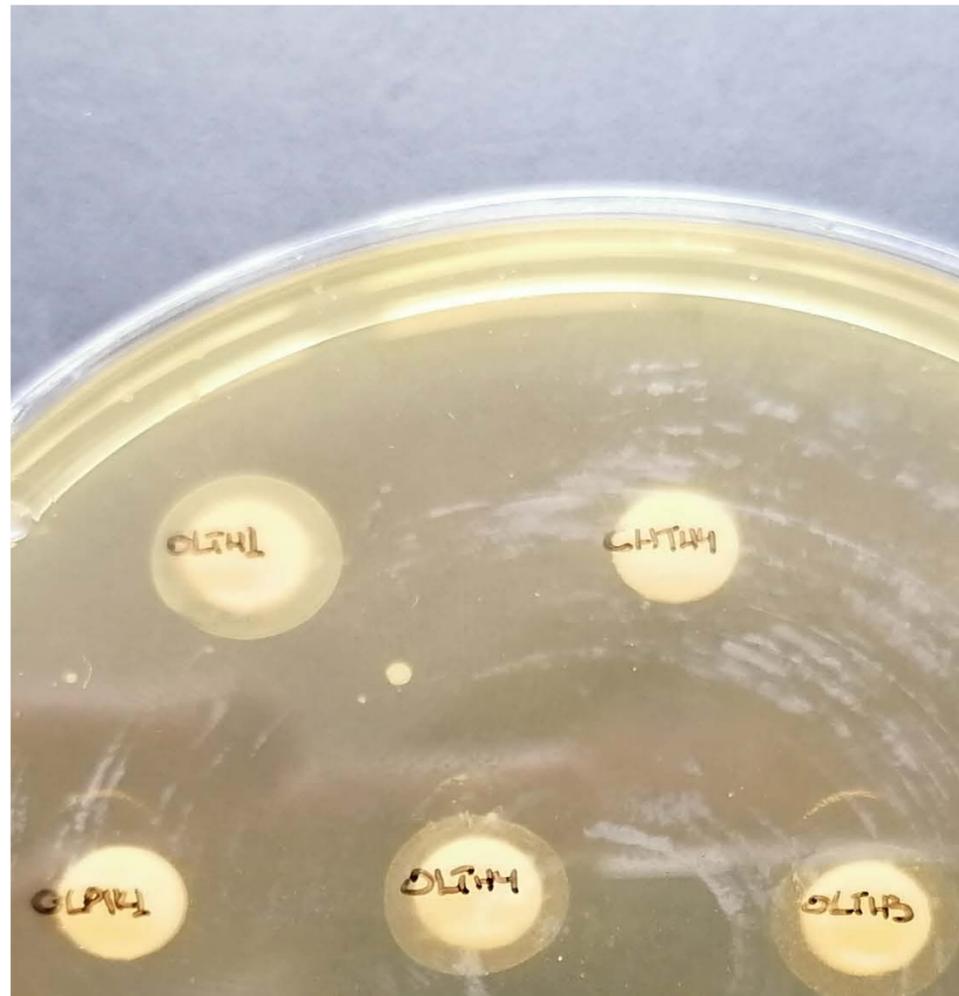
## Αντιδιαβητική δράση (*in vitro*)

Προσδιορισμός % ποσοστού αναστολής α-γλυκοσιδάσης



# Λειτουργικά χαρακτηριστικά

## Έκκριση ενζύμου υδρόλυσης χολικών αλάτων



(α)



(β)

Αξιολόγηση αγρίου τύπου στελεχών για έκκριση υδρολάσης χολικών αλάτων μέσω προσδιορισμού ζώνης κατακρήμνισης χολικών οξέων σε εμπλουτισμένο με άλας ταυροδεοξυχολικού οξέος MRS agar. Παρουσιάζονται οι ενδεικτικές φωτογραφίες (α) αξιολόγηση σε αγρίου τύπου στελέχη και (β) ζώνη κατακρήμνισης του στελέχους αναφοράς *L. rhamnosus* GG (θετικός μάρτυρας).

# Λειτουργικά χαρακτηριστικά

## Επιβίωση σε συνθήκες προσομοίωσης πέψης

Στέλεχος	Ποσοστό επιβίωσης (%)		
	Προσομοίωση πέψης - στοματική κοιλότητα	Προσομοίωση πέψης - στομάχι	Προσομοίωση πέψης - έντερο
<i>L. rhamnosus</i> OLXAL-1	99.79±0.59	75.77±1.46 <sup>h-j</sup>	36.46±1.49 <sup>e</sup>
<i>L. rhamnosus</i> OLXAL-2	99.64±0.51	74.29±1.59 <sup>f-i</sup>	33.07±1.39 <sup>d</sup>
<i>L. rhamnosus</i> OLXAL-3	99.95±0.07	76.54±1.09 <sup>ij</sup>	36.76±0.95 <sup>e</sup>
<i>L. rhamnosus</i> OLXAL-4	99.64±0.22	73.26±0.70 <sup>e-h</sup>	34.27±0.05 <sup>d</sup>
<i>L. rhamnosus</i> ALTH-1	99.53±0.07	58.15±0.09 <sup>a</sup>	0
<i>L. paracasei</i> ALTH-2	99.95±0.07	73.05±0.04 <sup>e-g</sup>	26.08±0.91 <sup>c</sup>
<i>L. rhamnosus</i> ALTH-3	99.85±0.81	57.00±0.73 <sup>a</sup>	0
<i>L. rhamnosus</i> ALTH-4	99.95±0.81	66.91±0.74 <sup>bc</sup>	18.42±1.03 <sup>b</sup>
<i>L. rhamnosus</i> CHTH-1	99.94±0.39	78.16±1.24 <sup>j</sup>	46.75±0.91 <sup>f</sup>
<i>L. rhamnosus</i> CHTH-2	99.64±0.07	76.24±0.95 <sup>ij</sup>	17.49±0.54 <sup>b</sup>
<i>L. rhamnosus</i> CHTH-3	99.90±0.60	57.51±0.50 <sup>a</sup>	31.42±0.94 <sup>c</sup>
<i>L. rhamnosus</i> CHTH-4	99.89±0.90	73.25±0.04 <sup>e-h</sup>	17.52±0.78 <sup>b</sup>
<i>L. pentosus</i> OLTH-1 ←	99.45±0.62	83.68±3.50 <sup>l</sup>	48.90±1.55 <sup>g</sup>
<i>L. pentosus</i> OLTH-2	99.40±0.84	69.12±0.92 <sup>cd</sup>	14.62±0.76 <sup>a</sup>
<i>L. pentosus</i> OLTH-3	99.58±1.50	80.66±0.57 <sup>k</sup>	42.77±0.31 <sup>f</sup>
<i>L. pentosus</i> OLTH-4 ←	99.57±0.30	65.54±0.94 <sup>b</sup>	58.98±0.47 <sup>h</sup>
<i>L. mesenteroides</i> OLPIK-1	99.73±0.08	71.49±1.17 <sup>de</sup>	0
<i>L. rhamnosus</i> OLPIK-2	99.95±0.96	75.61±0.42 <sup>g-j</sup>	0
<i>L. rhamnosus</i> OLPIK-3	99.84±0.84	72.22±1.39 <sup>ef</sup>	0
<i>L. rhamnosus</i> OLPIK-4	99.79±0.15	76.62±0.70 <sup>ij</sup>	0
<i>L. rhamnosus</i> GG	99.74±0.67	77.12±0.32 <sup>j</sup>	0

# Φορείς ακινητοποίησης

**Παραπροϊόντα του αγρο-βιομηχανικού τομέα:**

- Brewer's spent grain (BSG) (παραπροϊόν ζυθοποίησης) (Ζυθοποιία Μακεδονίας Θράκης Α.Ε.)
- Στέμφυλα (φλούδες σταφυλής) (Αγροτικός Οινοποιητικός Συνεταιρισμός Τυρνάβου, Τύρναβος)

**Δημητριακά – Ξηροί Καρποί**

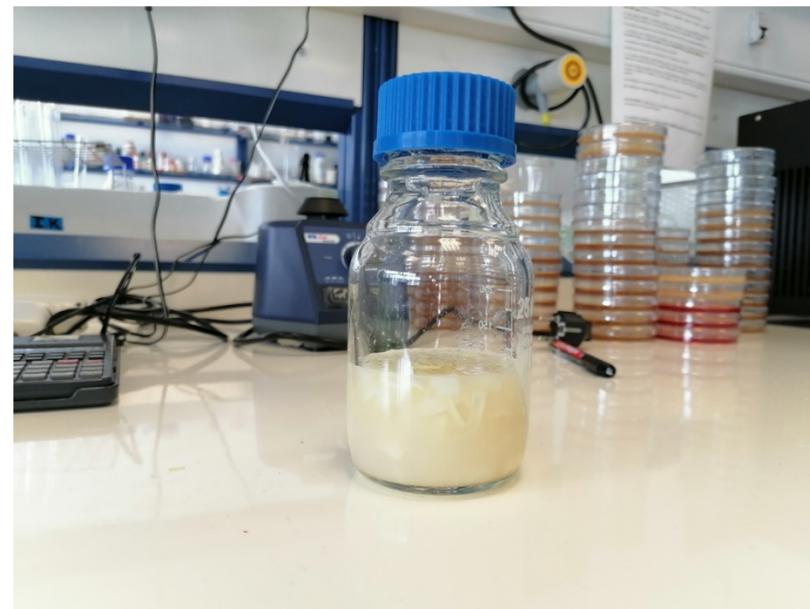
- Νιφάδες βρώμης
- Νιφάδες σιταριού
- Αραχίδα

**Φρούτα**

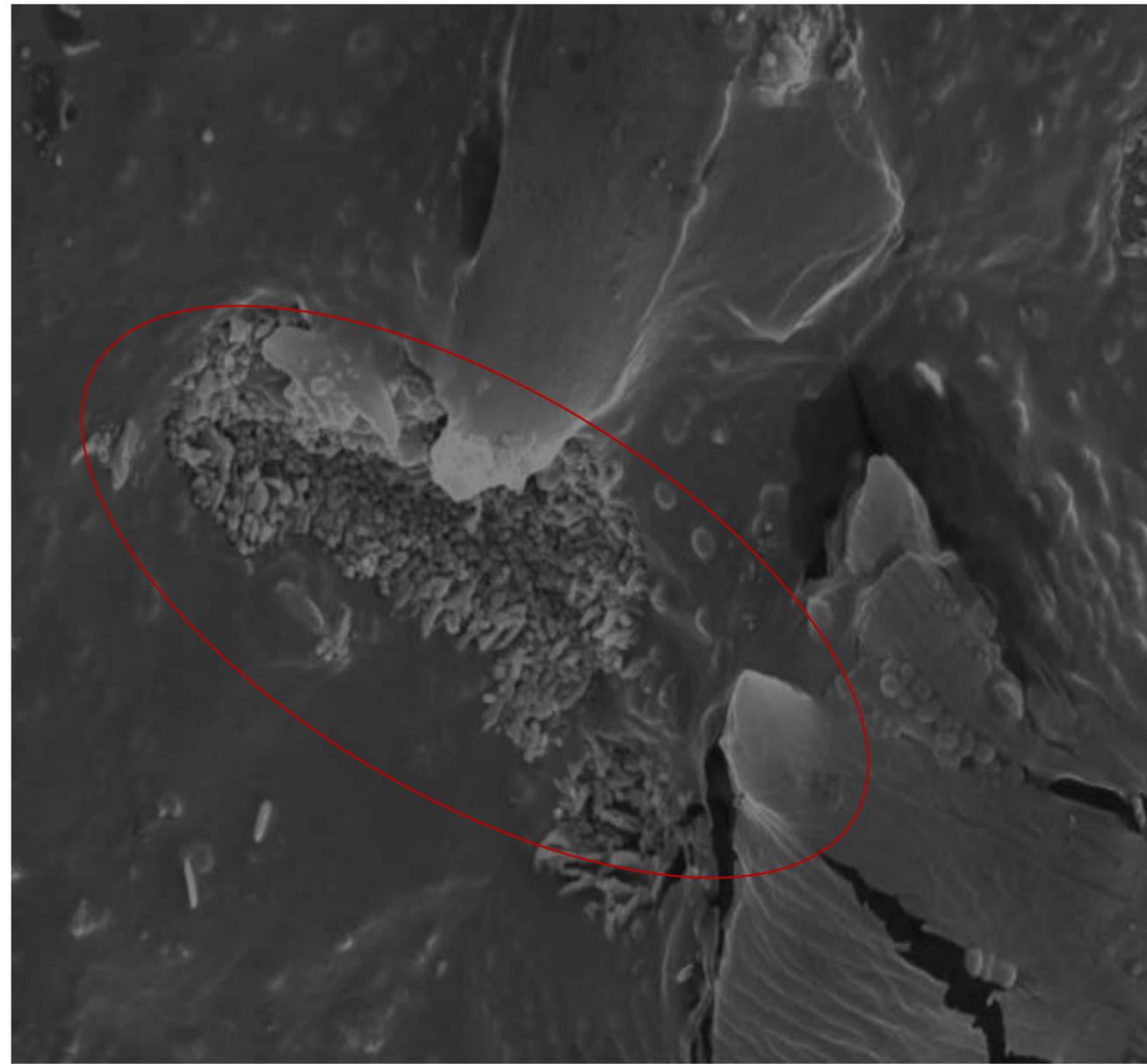
- Μήλο
- Μπανάνα
- Σταφίδα Κορινθιακή

**Λαχανικά**

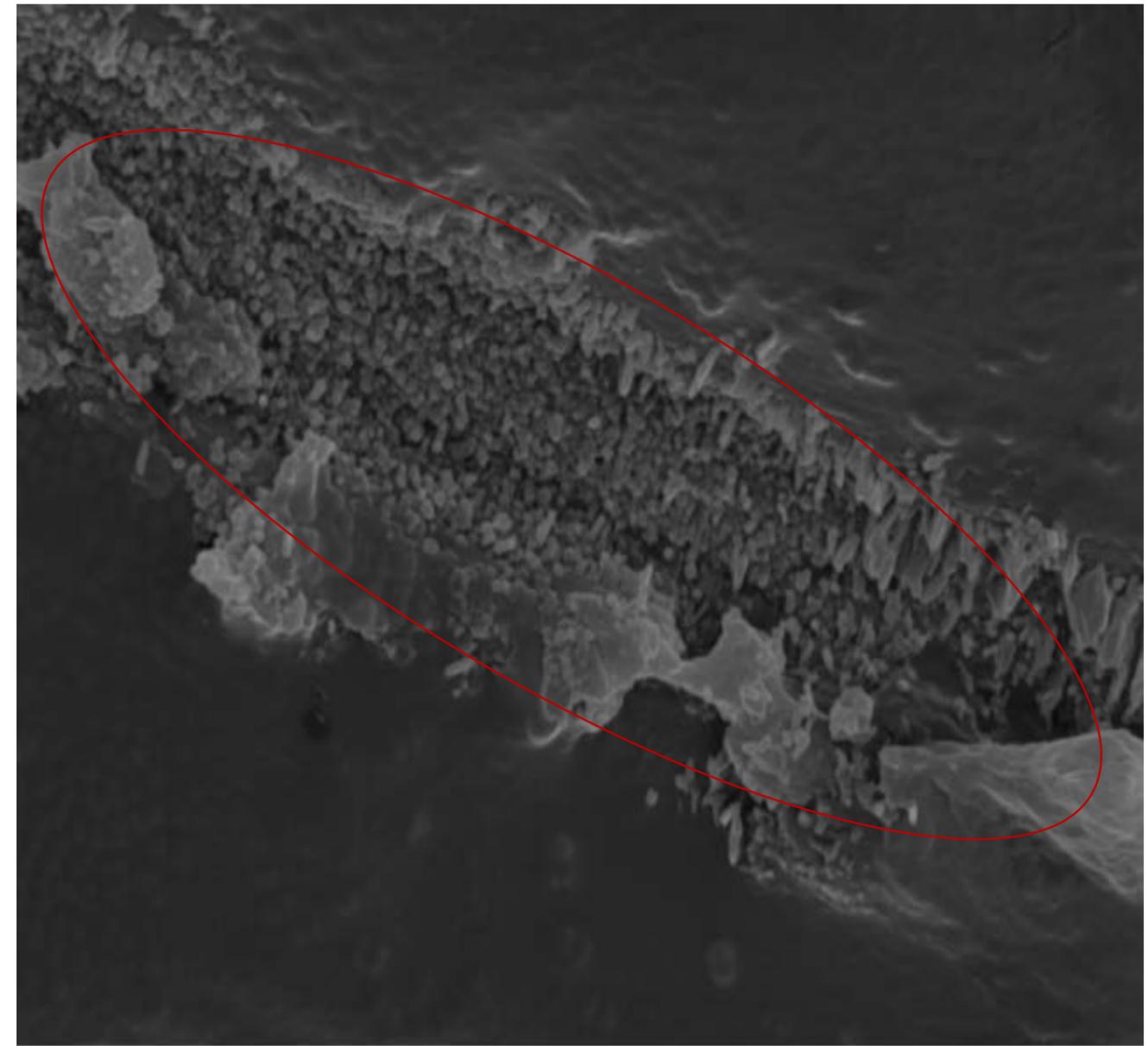
- Πράσο



# Φορείς ακινητοποίησης



20μm



20μm

# Παραγωγή ξηρών ακινητοποιημένων καλλιεργείων



**Ανάπτυξη *L. rhamnosus* σε θρεπτικό μέσο καθαρότητας τροφίμου**



**Προσθήκη διαλύματος βιομάζας σε φυσικά υποστρώματα**

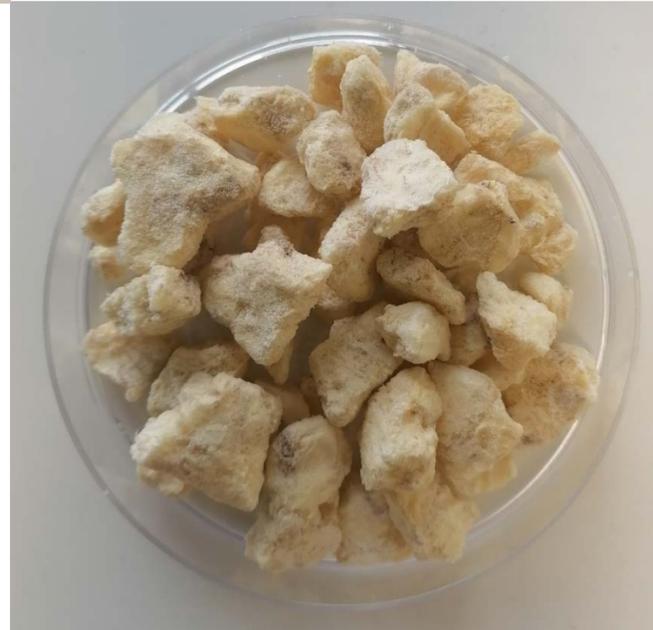


**Κυτταρική ακινητοποίηση**

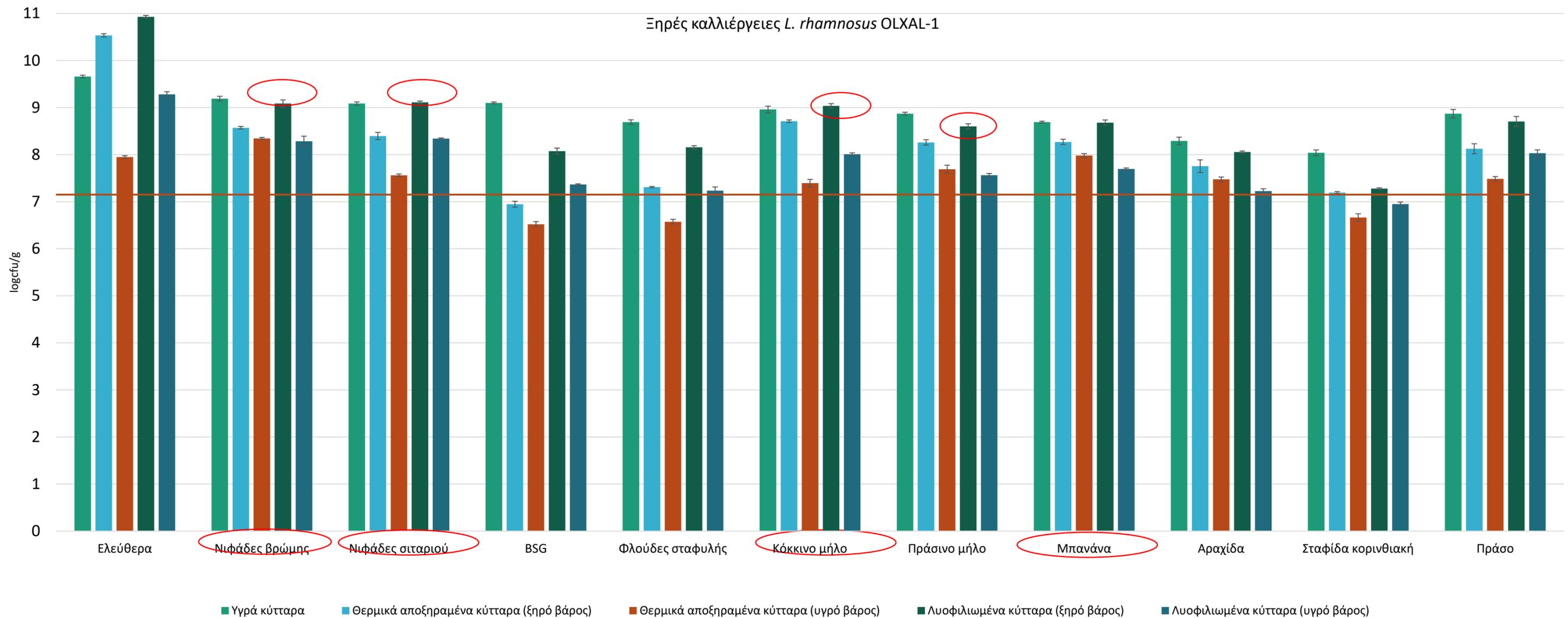


**Λυοφιλίωση BenchTop Pro (Virtis, SP Scientific, USA)**

# Παραγωγή ξηρών ακινητοποιημένων καλλιεργείων

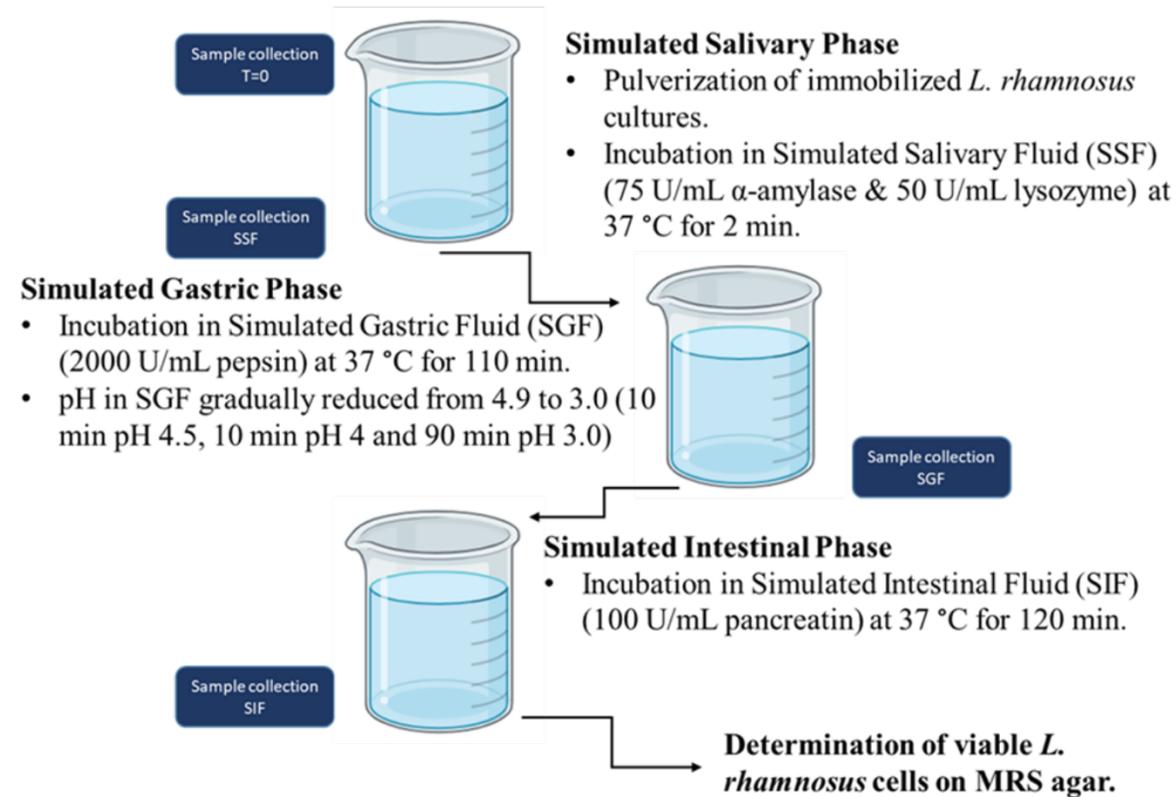


# Μελέτη επίδρασης ξήρανσης στην κυτταρική βιωσιμότητα

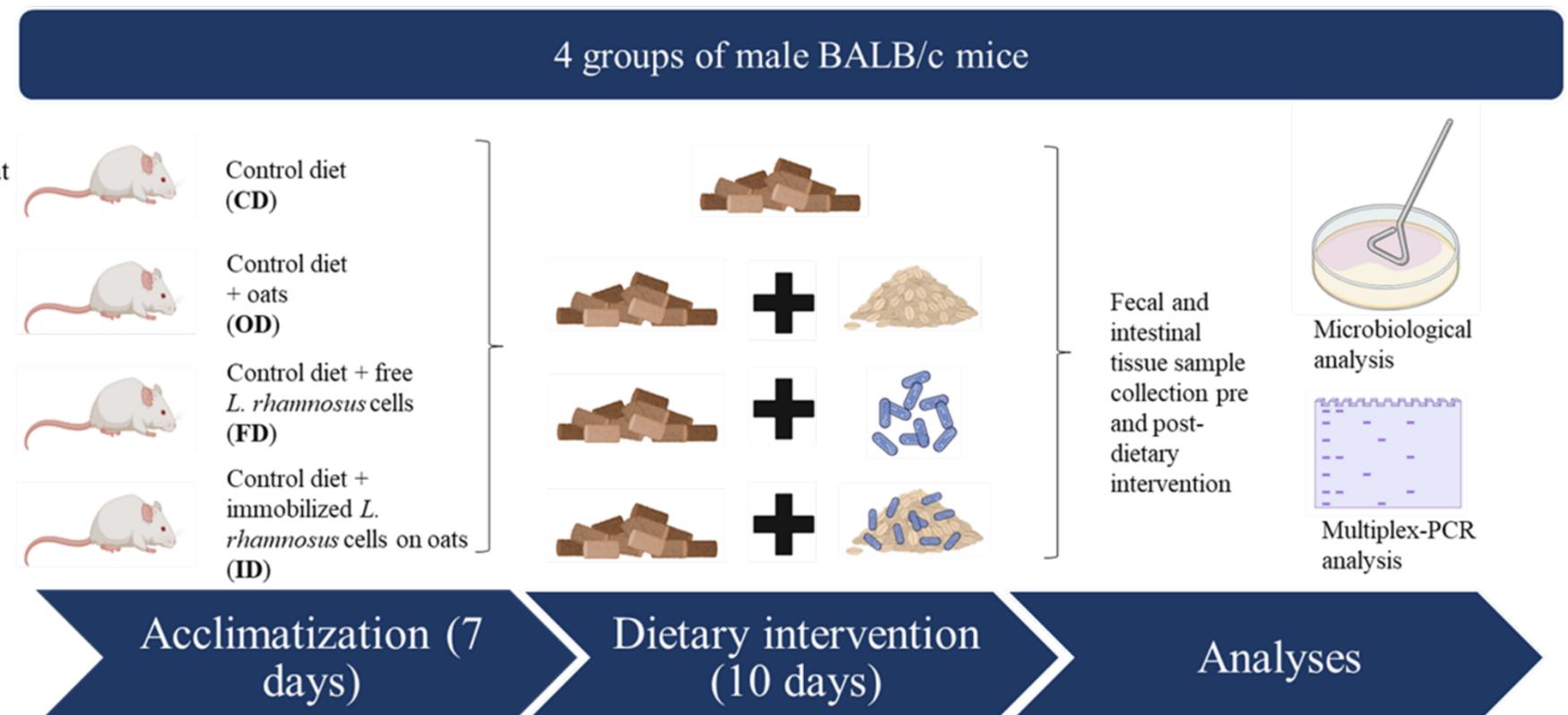


# *In vitro* και *in vivo* αξιολόγηση επιβίωσης διαμέσου γαστρεντερικού σωλήνα

## *In vitro*



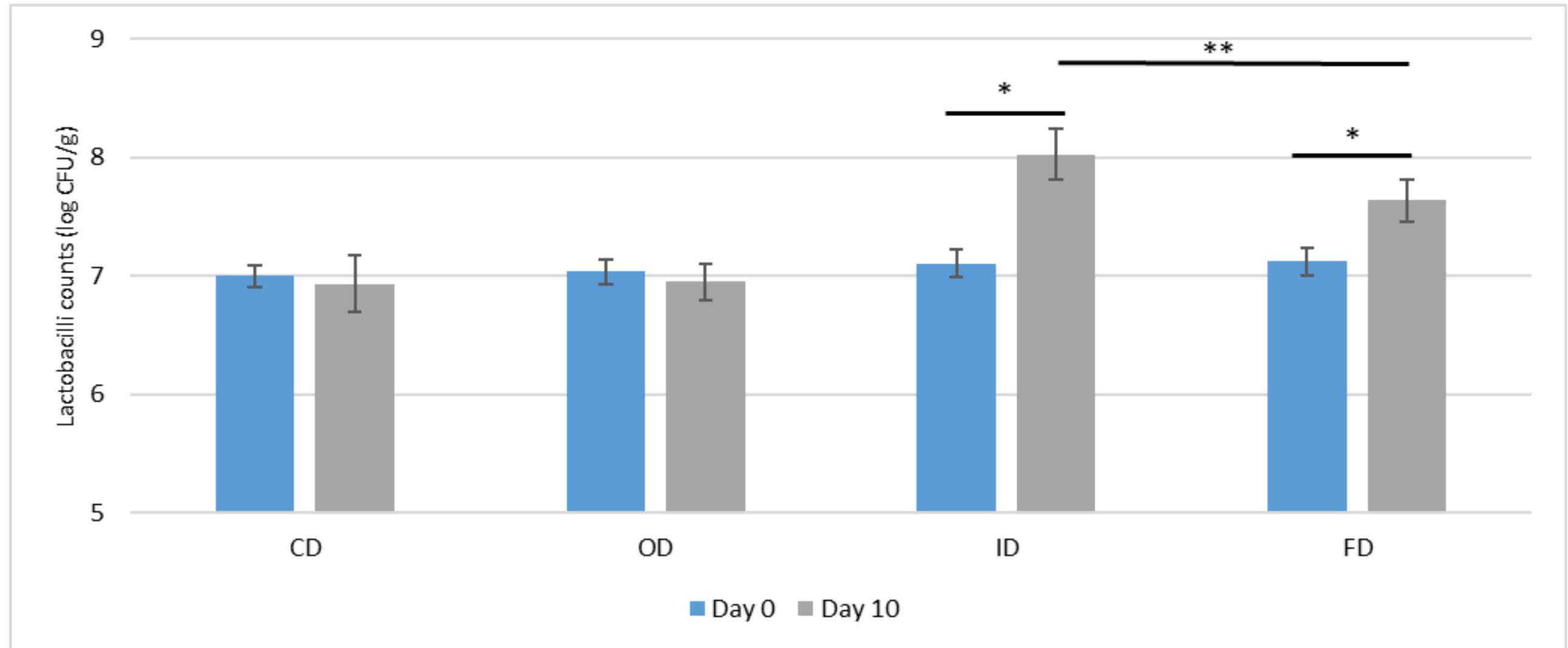
## *In vivo*



# In vitro αξιολόγηση

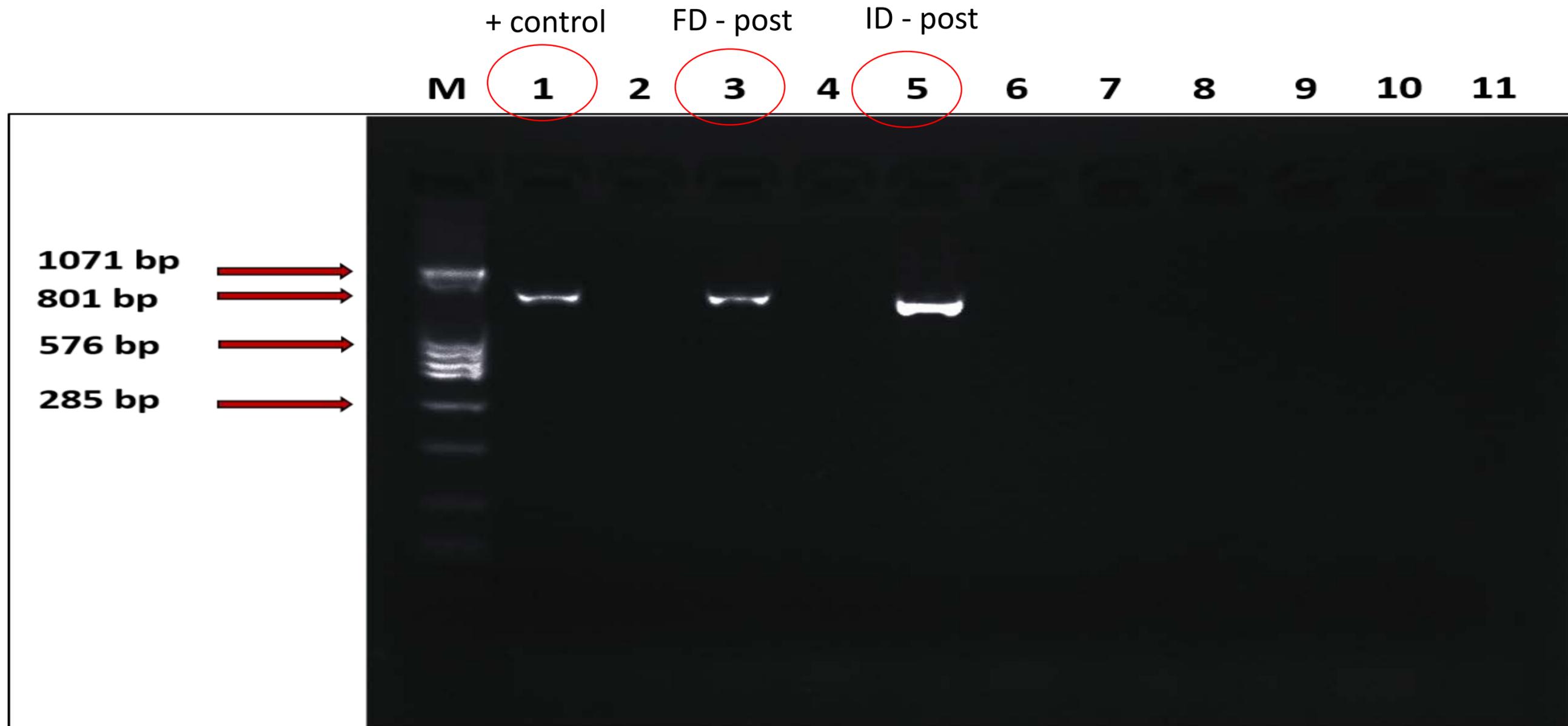
<i>L. rhamnosus</i> OLXAL-1 cell cultures	Survival Rate (%)		
	Simulated Oral Phase	Simulated Gastric Phase	Simulated Intestinal Phase
Wet immobilized cells on oat flakes	99.39 ± 0.19 <sup>A</sup>	88.63 ± 0.31 <sup>Be</sup>	84.76 ± 0.56 <sup>Cf</sup>
Freeze-dried immobilized cells on oat flakes	99.22 ± 0.46 <sup>A</sup>	82.78 ± 0.26 <sup>Ba</sup>	81.22 ± 1.36 <sup>Bef</sup>
Wet immobilized cells on wheat flakes	98.42 ± 0.48 <sup>A</sup>	83.05 ± 0.19 <sup>Bab</sup>	77.66 ± 1.94 <sup>Bde</sup>
Freeze-dried immobilized cells on wheat flakes	99.46 ± 0.76 <sup>A</sup>	82.43 ± 0.37 <sup>Ba</sup>	76.08 ± 0.46 <sup>Cd</sup>
Wet immobilized cells on apple pieces	99.09 ± 1.59 <sup>A</sup>	87.38 ± 1.10 <sup>Bbe</sup>	51.01 ± 0.40 <sup>Cb</sup>
Freeze-dried immobilized cells on apple pieces	98.87 ± 1.20 <sup>A</sup>	83.54 ± 0.09 <sup>Bab</sup>	48.65 ± 1.35 <sup>Cb</sup>
Wet immobilized cells on banana pieces	98.74 ± 0.16 <sup>A</sup>	72.13 ± 2.36 <sup>Bd</sup>	70.01 ± 0.32 <sup>Bc</sup>
Freeze-dried immobilized cells on banana pieces	98.54 ± 0.57 <sup>A</sup>	71.49 ± 1.22 <sup>Bd</sup>	66.80 ± 0.18 <sup>Cc</sup>
Wet free cells	99.33 ± 0.22 <sup>A</sup>	65.74 ± 0.10 <sup>Bc</sup>	36.29 ± 1.35 <sup>Ca</sup>
Freeze-dried free cells	99.23 ± 0.77 <sup>A</sup>	65.10 ± 0.85 <sup>Bc</sup>	33.42 ± 0.86 <sup>Ca</sup>

# *In vivo* αξιολόγηση



**OD:** συμβατική διαίτα (control diet), **OD:** συμβατική διαίτα εμπλουτισμένη με 2g λυοφιλιωμένης βρώμης, **ID:** συμβατική διαίτα εμπλουτισμένη με 2g λυοφιλιωμένα ακινητοποιημένα κύτταρα *L. rhamnosus* OLYAL-1 σε βρώμη, **FD:** συμβατική διαίτα εμπλουτισμένη με λυοφιλιωμέν ελεύθερα κύτταρα *L. rhamnosus* OLYAL-1.

# *In vivo* αξιολόγηση





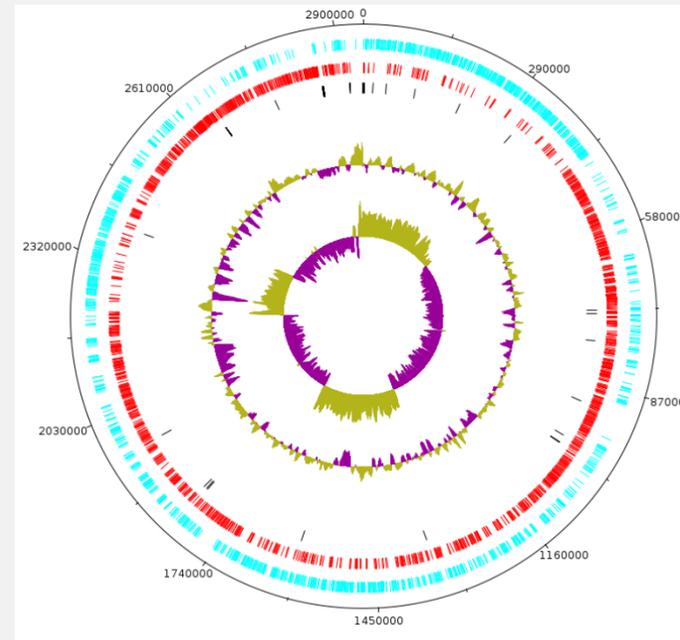
Article

## Cereals and Fruits as Effective Delivery Vehicles of *Lactobacillus rhamnosus* through Gastrointestinal Transit

Grigorios Nelios <sup>1,\*</sup> , Ioanna Prapa <sup>1</sup> , Anastasios Nikolaou <sup>1</sup> , Gregoria Mitropoulou <sup>1</sup>, Amalia E. Yanni <sup>2</sup> , Nikolaos Kostomitsopoulos <sup>3</sup>  and Yiannis Kourkoutas <sup>1,\*</sup> 

# *Lacticaseibacillus rhamnosus* OLXAL-1

- Αγρίου τύπου στέλεχος απομονωμένο από καρπό ελιάς (*Olea europaea* var. *Rotunda*).
- Μοριακά χαρακτηρισμένο ως προς τη μοναδικότητά του μέσω WGS.
- Βακτηριακό στέλεχος με δυνητικά προβιοτικές ιδιότητες έναντι δυσβίωσης ΣΔτ1.



Strain 1		Strain 2	Percentage Identity
our_strain	VS	our_strain	100
our_strain	VS	GR_1	99.8691
our_strain	VS	UBLR58	99.7423
our_strain	VS	LOCK908	99.6777
our_strain	VS	Lc705	99.6656
our_strain	VS	BPL5	99.0545
our_strain	VS	BPL15	99.0415
our_strain	VS	LR5	97.6201
our_strain	VS	LOCK900	97.5303
our_strain	VS	R0011	97.5079
our_strain	VS	DSM14870	97.4291
our_strain	VS	LRHMDP2	97.3952
our_strain	VS	HN001	97.3556
our_strain	VS	ATCC53103	97.3458
our_strain	VS	GG	97.3321



microorganisms

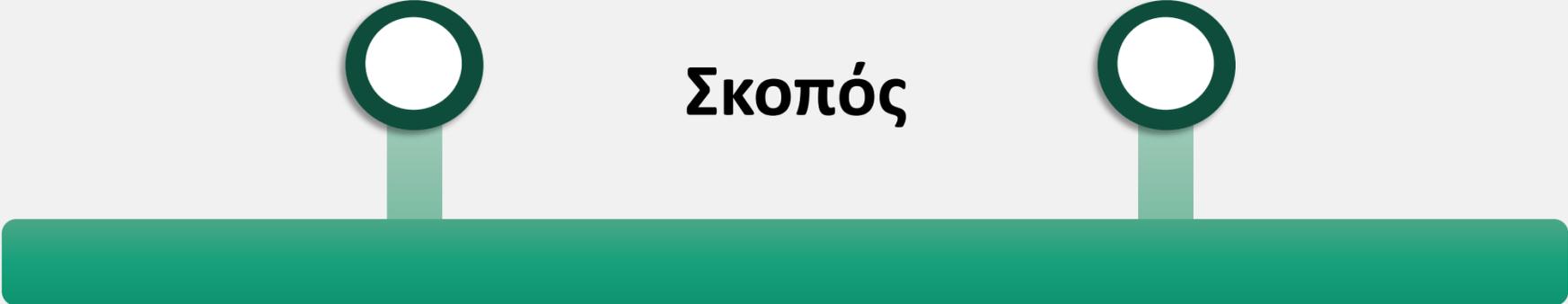


Article

## New Wild-Type *Lacticaseibacillus rhamnosus* Strains as Candidates to Manage Type 1 Diabetes

Grigorios Nelios <sup>1</sup>, Valentini Santarmaki <sup>1</sup>, Chrysoula Pavlatou <sup>1</sup>, Dimitra Dimitrellou <sup>2</sup> and Yiannis Kourkoutas <sup>1,\*</sup>

# *In vivo* μελέτη σε ζωικά πρότυπα ΣΔτ1



## Σκοπός

Διερεύνηση της επίδρασης της διατροφικής παρέμβασης με λυοφιλωμένα ακινητοποιημένα κύτταρα λειτουργικών καλλιεργειών σε νιφάδες βρώμης στο εντερικό μικροβίωμα ζωικών μοντέλων με ΣΔτ1

Απώτερος σκοπός ο σχεδιασμός λειτουργικών συστατικών τροφίμων και προϊόντων διατροφής που θα επιδρούν θετικά στο εντερικό μικροβίωμα ασθενών ΣΔτ1.

# Πειραματικός Σχεδιασμός

- ❖ 48 αρσενικοί επίμυες Wistar (6 ζώα/ομάδα).
- ❖ Διατροφική παρέμβαση 4 εβδομάδων
- ❖ Εβδομαδιαίος έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης και ημερήσιος έλεγχος της κατανάλωσης νερού/τροφής.



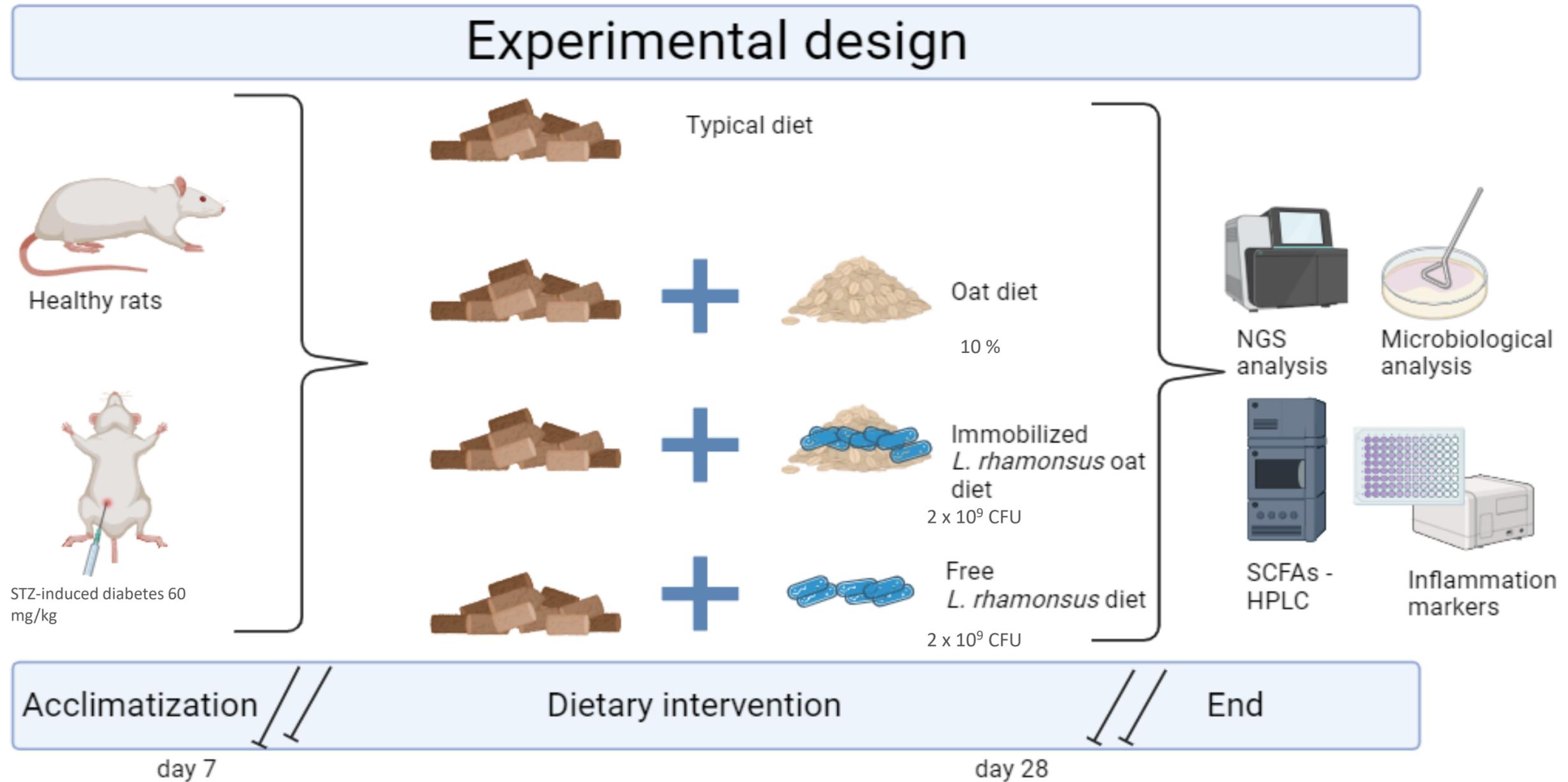
**CD:** Τυπική διαίτα  
**OD:** Τυπική διαίτα + 10% νιφάδες βρώμης  
**CIC:** Τυπική διαίτα + ακινητοποιημένη προβιοτική καλλιέργεια σε νιφάδες βρώμης  
**CFC:** Τυπική διαίτα με ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια

**DCD:** Τυπική διαίτα  
**DOD:** Τυπική διαίτα + 10% νιφάδες βρώμης  
**DIC:** Τυπική διαίτα + ακινητοποιημένη προβιοτική καλλιέργεια σε νιφάδες βρώμης  
**DFC:** Τυπική διαίτα με ελεύθερη προβιοτική καλλιέργεια

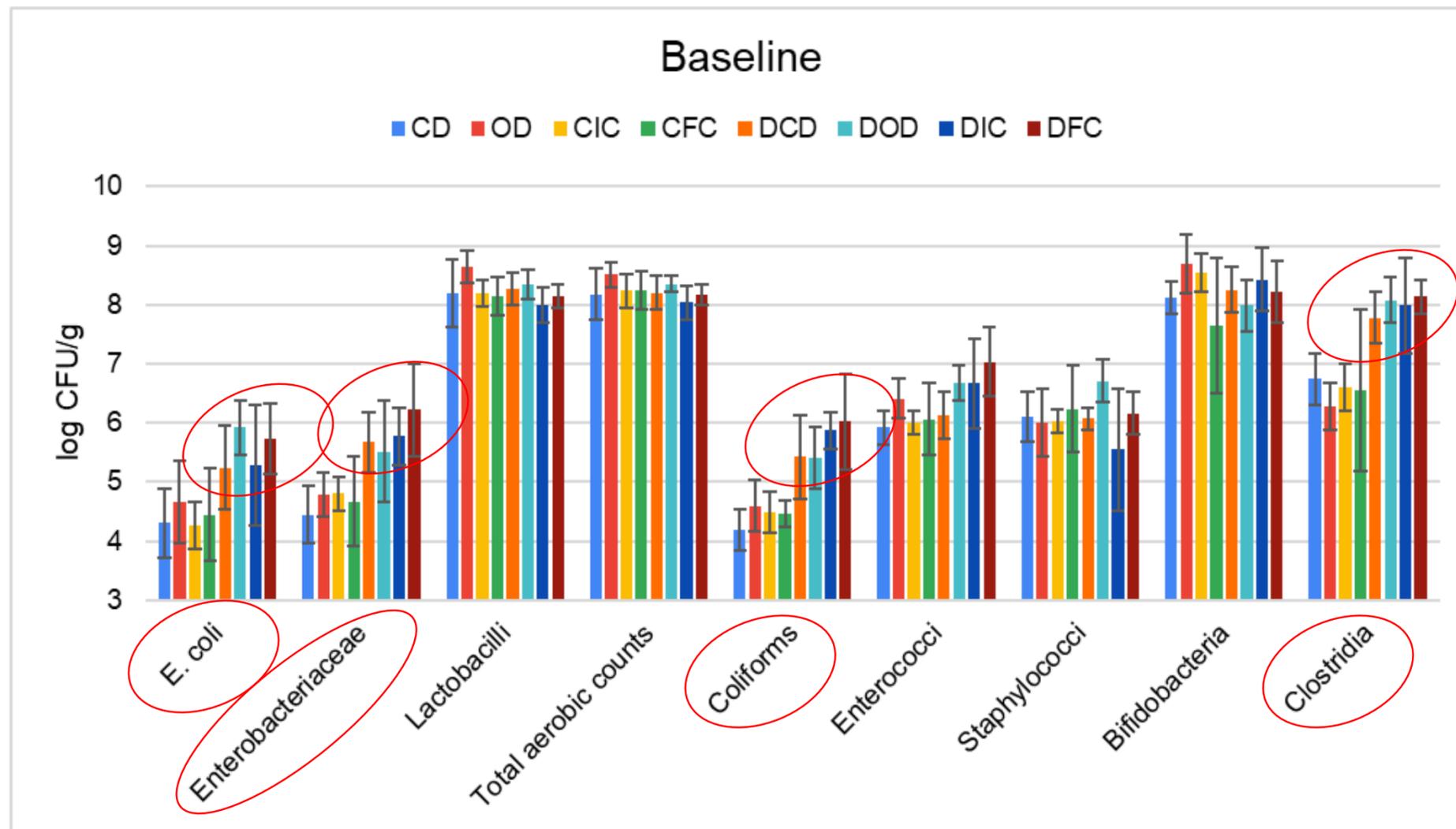
Συλλογή κοπράνων πριν και μετά το πέρας της παρέμβασης

Προσδιορισμός αλλαγών μικροβιώματος, μικροβιακών πληθυσμών, παραγόντων φλεγμονής και SCFAs

# Πειραματικός Σχεδιασμός



# Μικροβιακοί πληθυσμοί

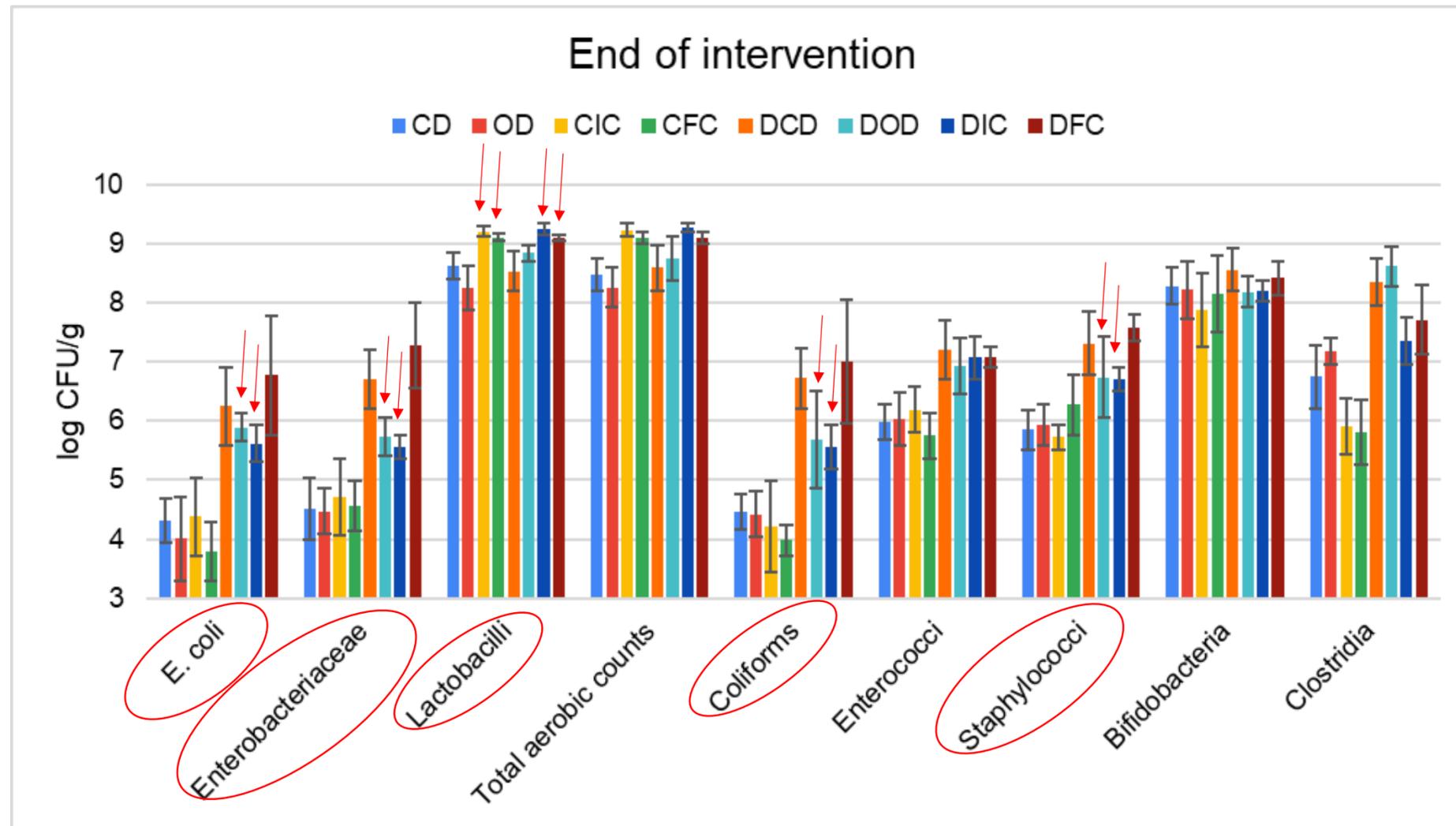


Έναρξη διατροφικής παρέμβασης



Επίπεδα *E. coli*, εντεροβακτηρίων, κολοβακτηριδίων, και κλωστριδίων στα κόπρανα διαβητικών αρουραίων vs υγιών.

# Μικροβιακοί πληθυσμοί

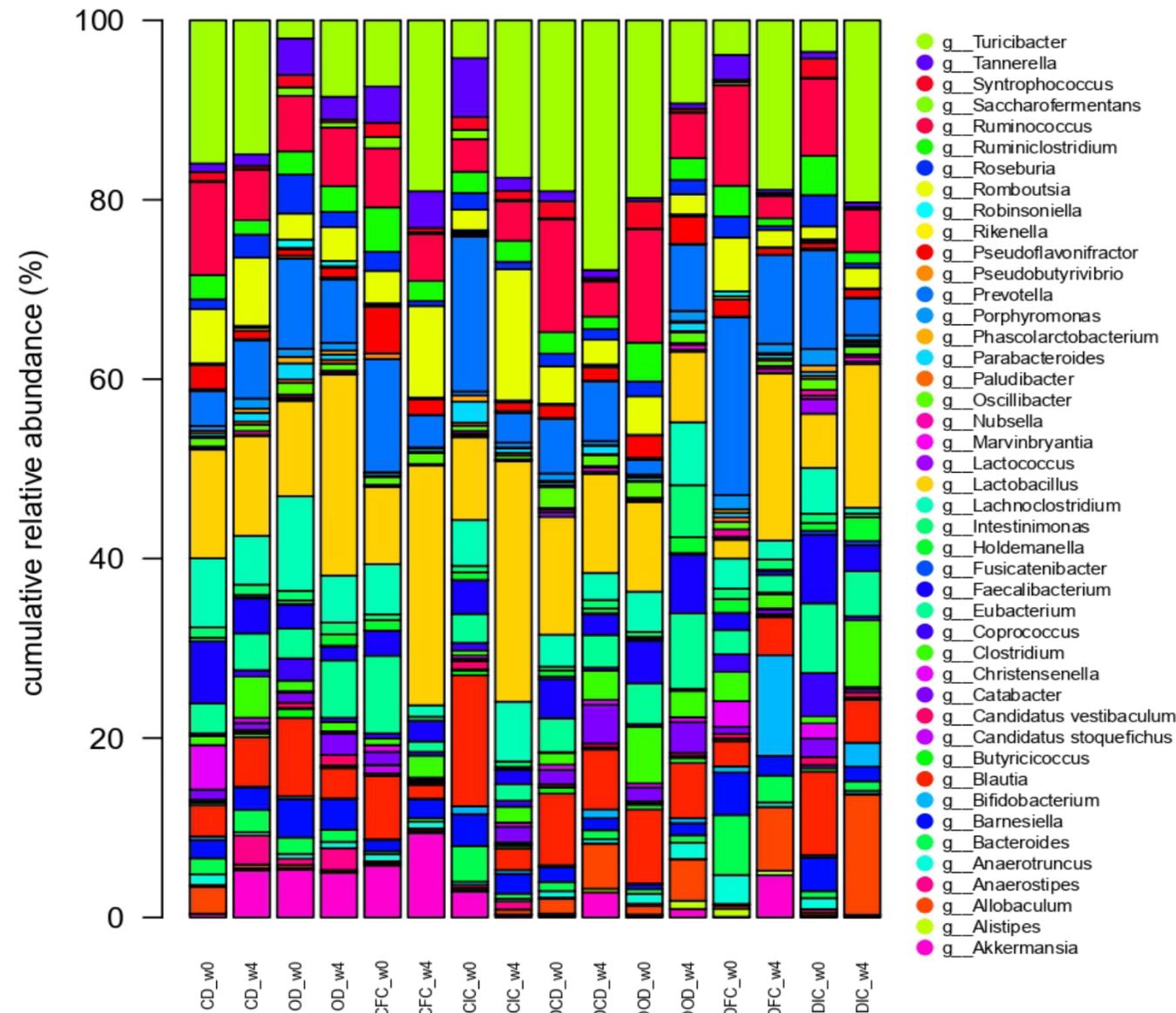


## Τέλος διατροφικής παρέμβασης

- Περαιτέρω  επιπέδων *E. coli*, εντεροβακτηρίων, κολοβακτηριδίων, εντεροκόκκων, σταφυλοκόκκων, και κλωστριδίων στα κόπρανα διαβητικών αρουραίων σε **σχέση με t0**.
- Διατροφική παρέμβαση με βρώμη/ ακινητοποιημένης καλλιέργειας σε βρώμη οδήγησε σε  επίπεδα *E. coli*, εντεροβακτηρίων, κολοβακτηριδίων, και σταφυλοκόκκων στα κόπρανα διαβητικών αρουραίων σε **σχέση με διαβητικά πρότυπα με τυπική δίαιτα**.
- Διατροφική παρέμβαση με *L. rhamnosus*  *Lactobacilli* σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα. <sup>74</sup>

# Ανάλυση NGS

Taxonomic binning at Genus level



Μεταβολές μικροβιώματος σε επίπεδο γένους vs τυπική δίαιτα

**Διατροφική παρέμβαση με νιφάδες βρώμης:**

↑ *Anaerotruncus, Faecalibacterium & Vallitalea* σε διαβητικά ζωικά πρότυπα

**Διατροφική παρέμβαση με ελεύθερη καλλιέργεια *L. rhamnosus* OLXAL-1**

↑ *Lactobacilli* & bifidobacteria σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα

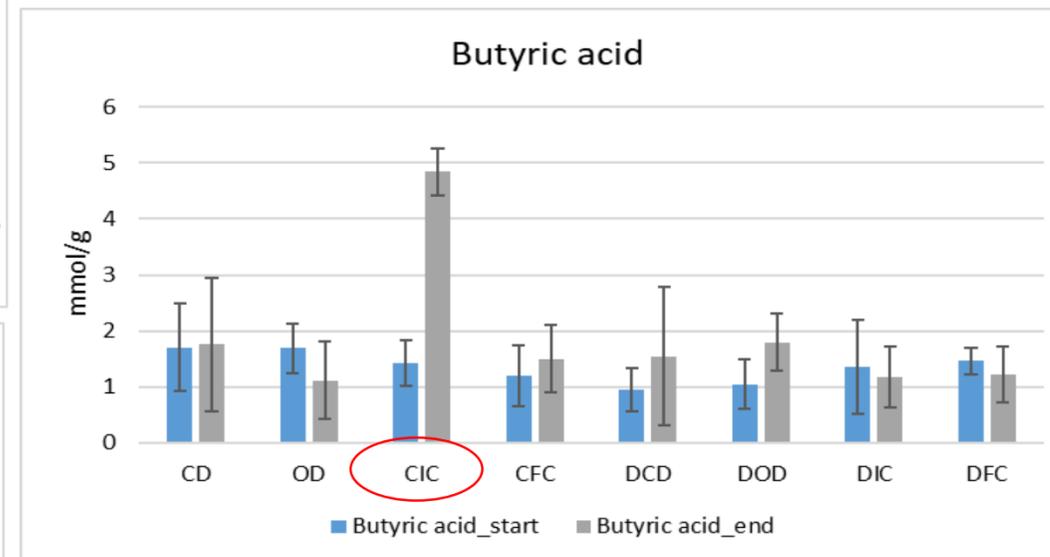
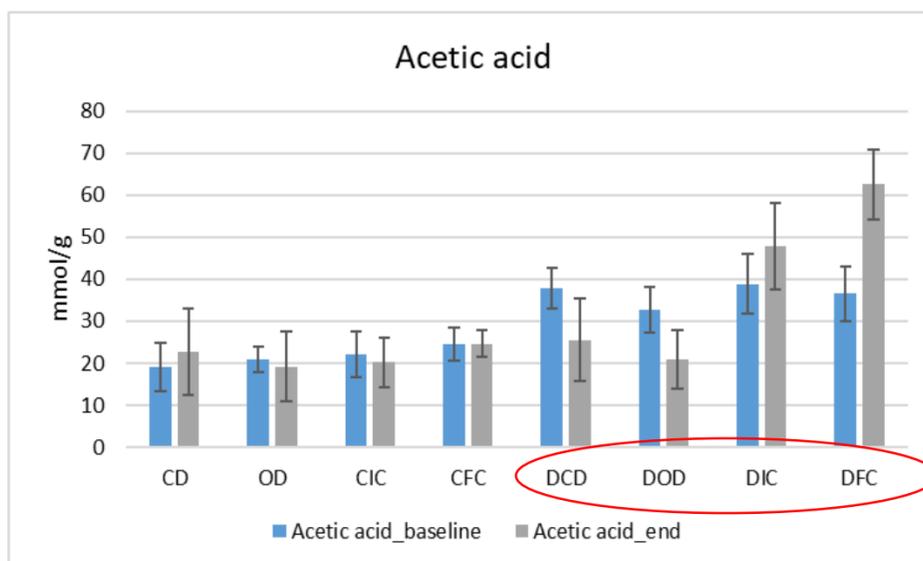
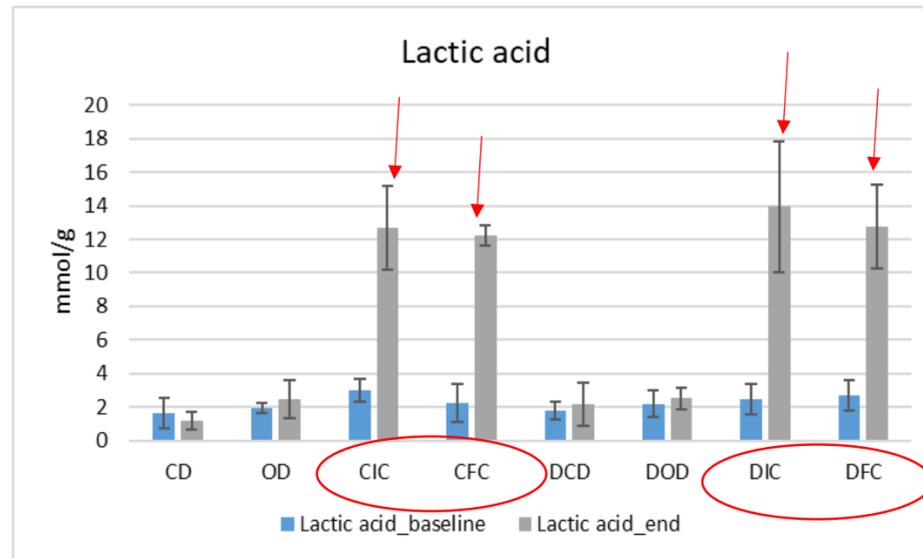
**Διατροφική παρέμβαση με ακινητοποιημένη καλλιέργεια *L. rhamnosus* OLXAL-1 σε βρώμη**

↑ *Lactobacilli* & bifidobacteria σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα

↑ *Clostridium & Romboutsia* σε υγιή ζωικά πρότυπα

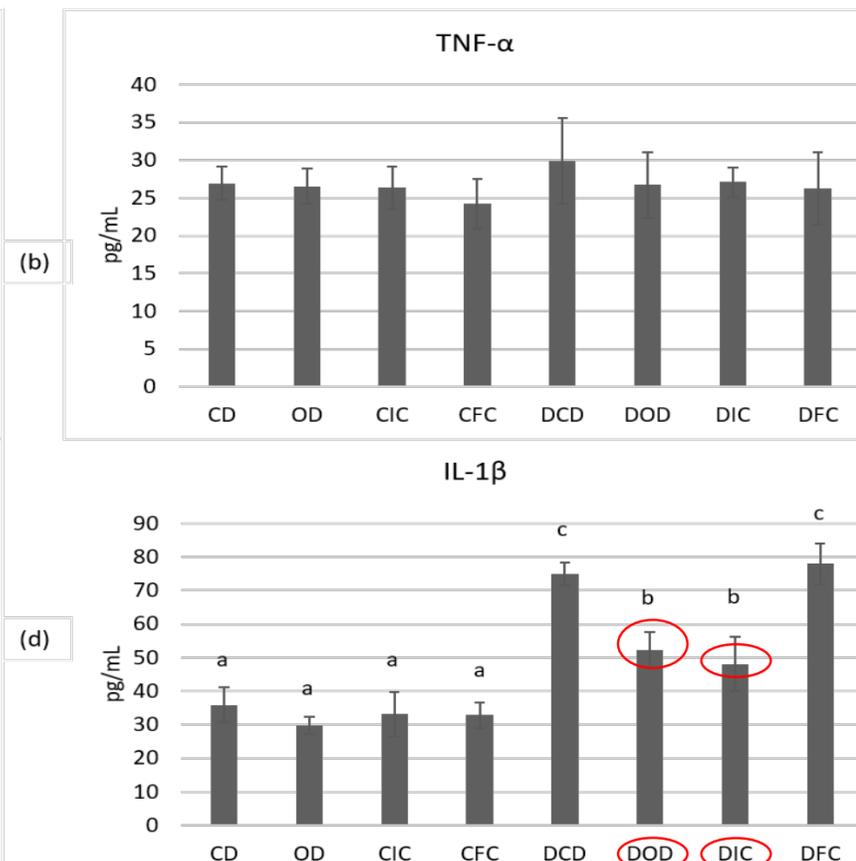
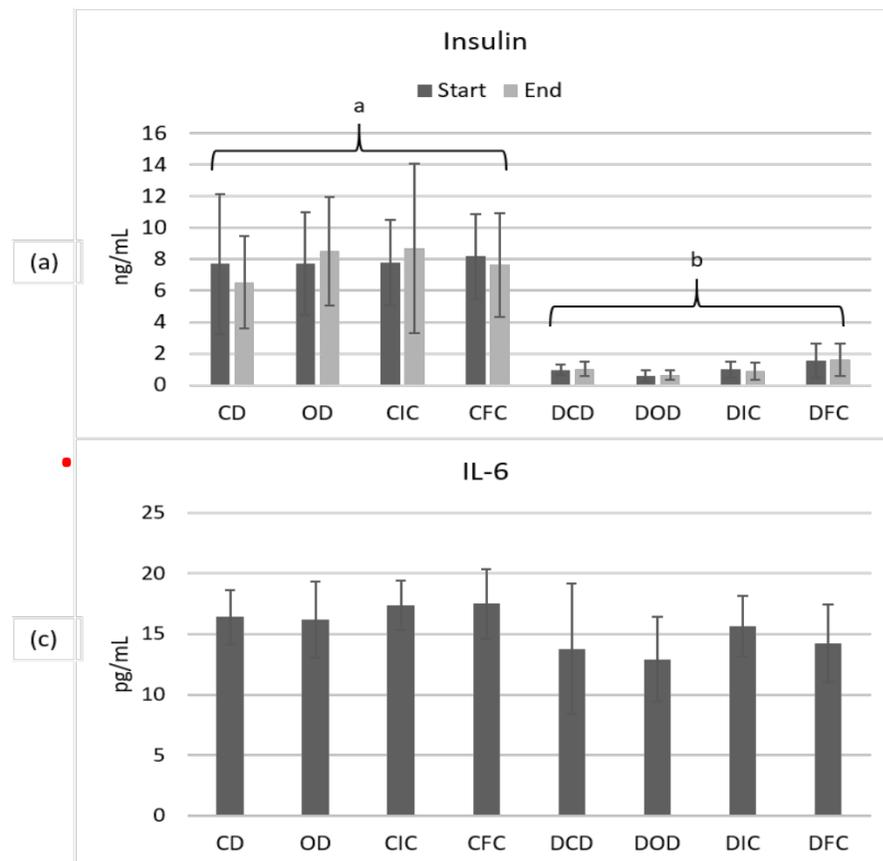
# SCFAs & lactic acid

## Σημαντικές μεταβολές



- **↑** γαλακτικού οξέος στα κόπρανα υγιών και διαβητικών προτύπων που έλαβαν *L. rhamnosus* OLYAL-1 (ελεύθερα ή ακινητοποιήμενα κύτταρα)
- **↑** οξικό οξύ στα διαβητικά vs υγιή t0
- **↑** οξικού οξέος μετά από χορήγηση *L. rhamnosus* OLYAL-1 σε διαβητικά πρότυπα
- **↑** βουτυρικού οξέος σε υγιή πρότυπα μετά από χορήγηση ακινητοποιημένης καλλιέργειας *L. rhamnosus* OLYAL-1 σε βρώμη

# Ινσουλίνη & δείκτες φλεγμονής



## Σημαντικές μεταβολές

- ↑ επίπεδα **IL-1β** στα διαβητικά πρότυπα vs υγιή
- ↓ επίπεδα **IL-1β** στα διαβητικά πρότυπα τα οποία έλαβαν νιφάδες βρώμης ή ακινητοποιημένα κύτταρα *L. rhamnosus* OLYAL-1 σε νιφάδες βρώμης vs τυπική διαίτα διαβητικών προτύπων



Article

## Assessment of Immobilized *Lactobacillus rhamnosus* OLYAL-1 Cells on Oat Flakes for Functional Regulation of the Intestinal Microbiome in a Type-1 Diabetic Animal Model

Grigorios Nelios <sup>1</sup>, Ioanna Prapa <sup>1</sup>, Gregoria Mitropoulou <sup>1</sup>, Vasiliki Kompoura <sup>1</sup>, Evangelos Balafas <sup>2</sup>, Nikolaos Kostomitsopoulos <sup>2</sup>, Amalia E. Yanni <sup>3,\*</sup> and Yiannis Kourkoutas <sup>1,\*</sup>

# Συμπεράσματα

- Η επαγωγή του ΣΔτ1 επέφερε αλλαγές στη φυσιολογική εντερική μικροβιακή χλωρίδα ζωικών προτύπων, συνοδευόμενη από την ταυτόχρονη εμφάνιση φλεγμονής.
- Η διατροφική παρέμβαση με βρώμη και ακινητοποιημένη καλλιέργεια *L. rhamnosus* σε βρώμη οδήγησε σε σημαντική μείωση της δυσβίωσης & μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της IL-1β.
- Η διατροφική παρέμβαση με *L. rhamnosus* OLYAL-1 οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα *Lactobacilli* και *bifidobacterium* σε υγιή και διαβητικά ζωικά πρότυπα και αύξησε τις συγκεντρώσεις των SCFAs.

# Παραγωγή προϊόντων



# 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



## 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 <sup>α</sup>	98.21±0.09	8.72±0.01 <sup>β</sup>	99.89±0.07 <sup>β</sup>
60	8.50±0.03 <sup>α</sup>	97.34±0.34	8.67±0.01 <sup>β</sup>	99.28±0.08 <sup>β</sup>
90	8.33±0.04 <sup>α</sup>	95.43±0.49	8.48±0.01 <sup>α,β</sup>	97.15±0.16 <sup>β</sup>
180	8.06±0.03 <sup>α</sup>	92.33±0.31	8.29±0.02 <sup>α,β</sup>	94.96±0.18 <sup>β</sup>



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 logcfu/g), η οποία μειώθηκε σημαντικά στις 30 και 90 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου (8.57 logcfu/g) και ψυγείου (8.48 logcfu/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.

# Οργανοληπτικός έλεγχος – Προϊόντα χυμού

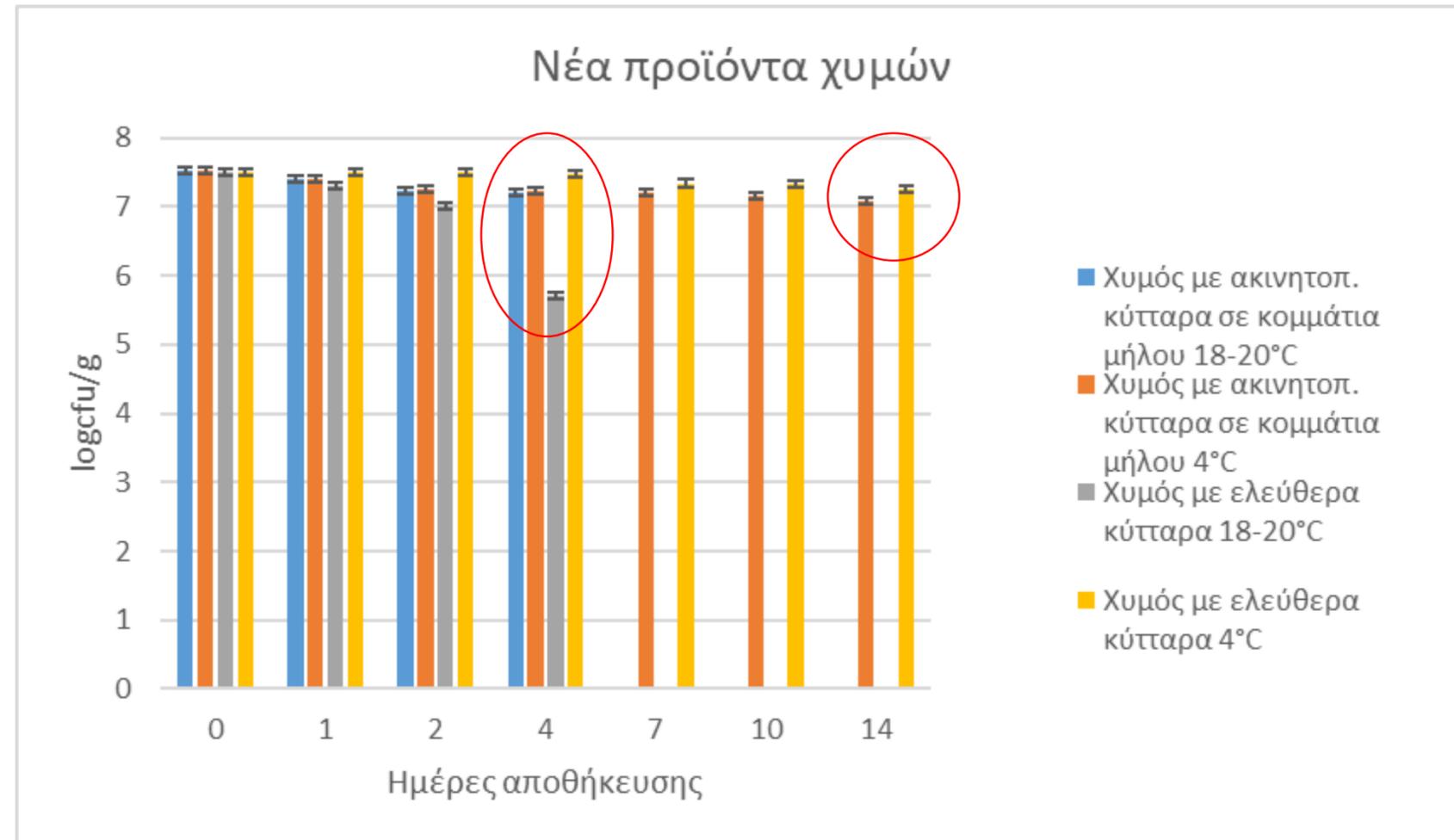
Οργανοληπτικό χαρακτηριστικό	Χυμός με λυοφιλωμένα ακινητοποιημένα κύτταρα σε κομμάτια μήλου
Άρωμα	3.4±0.5
Γεύση	3.8±0.4
Πρωτοτυπία (εμφάνιση, παρουσίαση, χρώμα, κλπ)	4.8±0.3
Συνολική εκτίμηση	3.6±0.7



# Αποθήκευση νέων προϊόντων

## Επίπεδα κυτταρικής συγκέντρωσης *L. rhamnosus* OLYAL-1 στα νέα προϊόντα

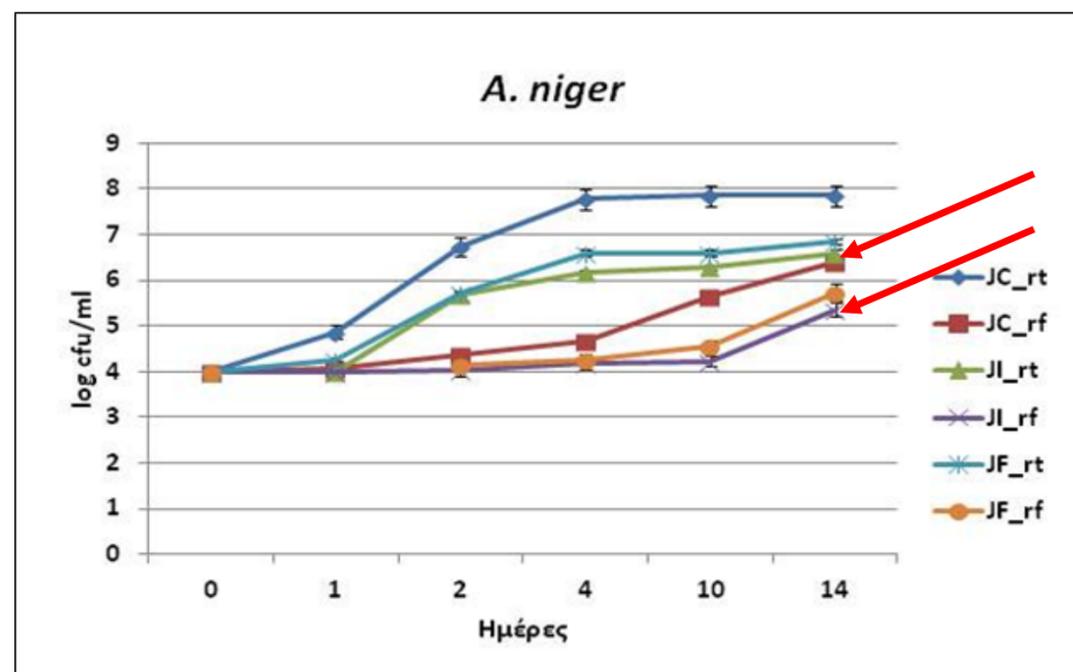
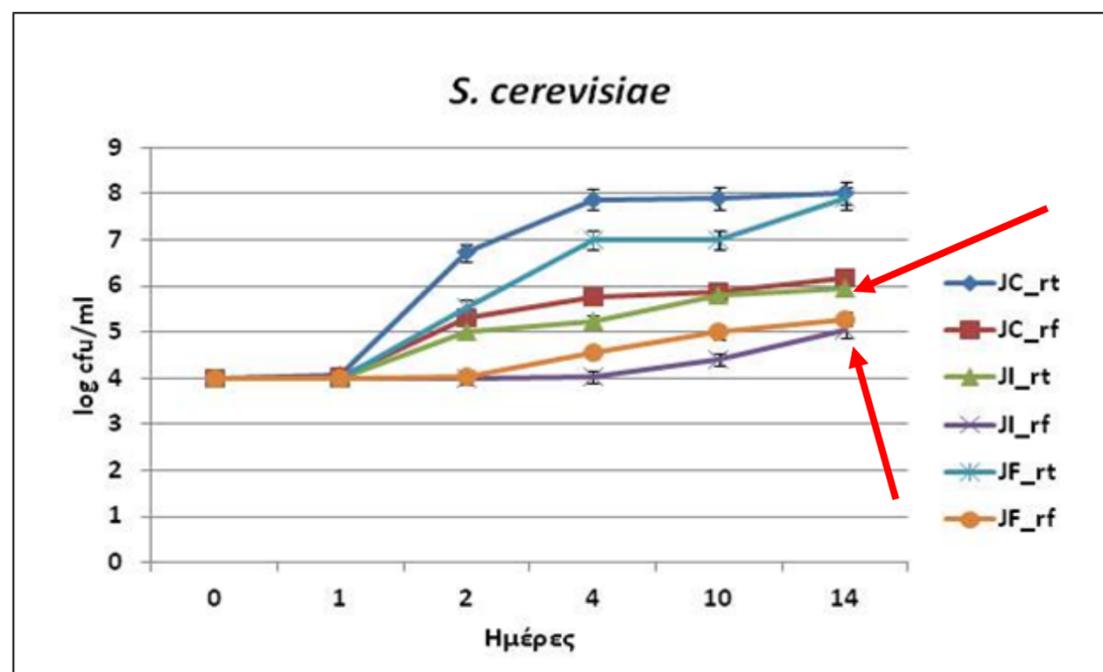
- ~ 7.5 logcfu/g η αρχική συγκέντρωση κυττάρων *L. rhamnosus* OLYAL-1
- Σημαντική μείωση των επιπέδων ελεύθερων κυττάρων ήδη από την 4<sup>η</sup> ημέρα στους 20-25 °C
- >7 logcfu/g έως 14 ημέρες στους 4 °C
- ✓ Επίπεδα >9 logcfu/g σε ένα ποτήρι προϊόντος!
- ✓ Δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου παθογόνοι ή αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί!



# Αποθήκευση νέων προϊόντων

## Μικροβιακή αλλοίωση των νέων προϊόντων μετά από εσκεμμένη επιμόλυνση

- *Saccharomyces cerevisiae* ή *Aspergillus niger*



JC: control  
 JI: Προϊόν με ακινητοποιημένα κύτταρα  
 JF: Προϊόν με ελεύθερα κύτταρα

- ✓ Σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αλλοιογόνων στον χυμό με τα ακινητοποιημένα κύτταρα *L. rhamnosus* OLYAL-1.
- ✓ Μεταξύ των δειγμάτων χυμού που περιείχαν τα ακινητοποιημένα κύτταρα σημαντικά χαμηλότεροι πληθυσμοί σε θερμοκρασία ψυγείου.



---

*Article*

## **Novel Functional Grape Juices Fortified with Free or Immobilized *Lactobacillus rhamnosus* OLXAL-1**

Anastasios Nikolaou \*, Gregoria Mitropoulou, Grigorios Nelios and Yiannis Kourkoutas \*

# Συμπεράσματα

- ✓ Ανάπτυξη **νέου καινοτόμου προϊόντος χυμού** με λυοφιλωμένα κύτταρα *L. rhamnosus* OLYAL-1.
- ✓ Τα ακινητοποιημένα κύτταρα οδήγησαν σε **διατήρηση της βιωσιμότητας** στους 20 °C.
- ✓ **Υψηλοί πληθυσμοί κυττάρων** > 7 log cfu/g έως 10 ημέρες και > 10<sup>9</sup> cfu ανά μερίδα.
- ✓ Σημαντικός **περιορισμός της ανάπτυξης** *S. cerevisiae* and *A. niger* σε προϊόντα που επιμολύνθηκαν εσκεμμένα (φαινόμενα ανταγωνισμού).
- ✓ Καθολική αποδοχή κατά τον **προκαταρκτικό έλεγχο** με ιδιαίτερο στοιχείο την **πρωτοτυπία**.

# Ερευνητική ομάδα



**Κουρκουτάς Ιωάννης**  
**Καθηγητής ΔΠΘ**

email:

[ikourkou@mbg.duth.gr](mailto:ikourkou@mbg.duth.gr)

Τηλ: 25510 30633



# iFUNcultures - Καινοτόμες ακινητοποιημένες λειτουργικές αρχικές καλλιέργειες: Χαρακτηρισμός και εφαρμογή στην παραγωγή νέων τροφίμων με δυνητικά ευεργετικά οφέλη χρησιμοποιώντας αγροτικά απόβλητα



[www.ifuncultures.gr](http://www.ifuncultures.gr)

91



Προϋπολογισμός: 170.000,00 €  
ΕΥ: Κουρκουτάς Ιωάννης,  
Καθηγητής Δ.Π.Θ.



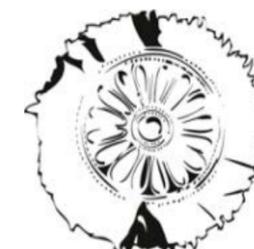
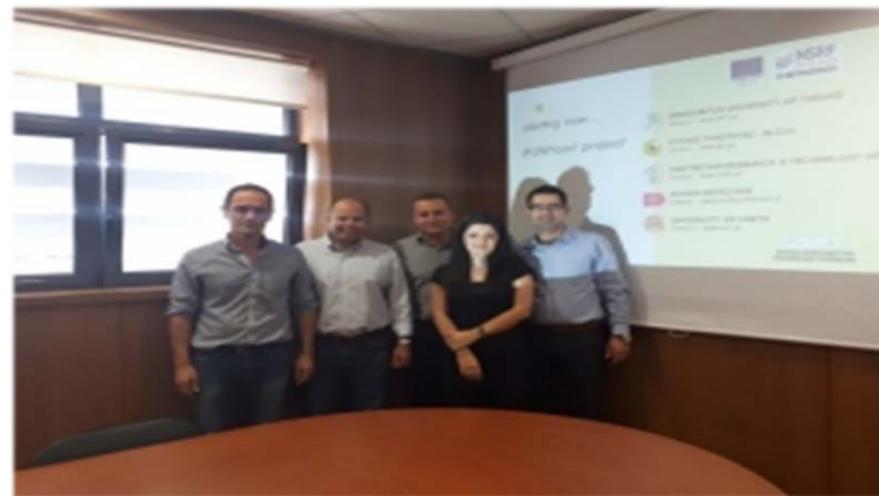
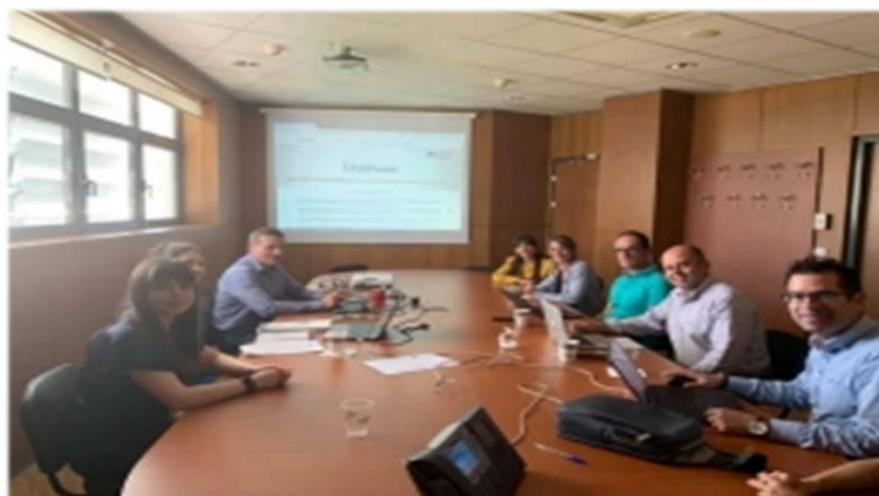
# iFUNFoods - Καινοτόμα Λειτουργικά Τρόφιμα: Ανάπτυξη, Παραγωγή, Χαρακτηρισμός, Ιδιότητες

[www.ifunfoods.gr](http://www.ifunfoods.gr)



Προϋπολογισμός: 952.434,78 €  
Συντονιστής και ΕΥ: Κουρκουτάς Ιωάννης,  
Καθηγητής Δ.Π.Θ.

92



**CERTH**  
CENTRE FOR  
RESEARCH & TECHNOLOGY  
HELLAS



HELLENIC REPUBLIC  
MINISTRY OF  
DEVELOPMENT & INVESTMENTS  
SPECIAL SECRETARIAT OF STRUCTURAL PROGRAMMES  
MANAGING AUTHORITY OF ΕΡΑηΕΚ

ΕΡΑηΕΚ 2014-2020  
OPERATIONAL PROGRAMME  
COMPETITIVENESS  
ENTREPRENEURSHIP  
INNOVATION

ΕΣΠΑ  
2014-2020  
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη  
Partnership Agreement 2014-2020

Co-financed by Greece and the European Union



**FOODBIOMES**  
INNOVATIONS IN MICROBIOME APPLICATIONS



HELLENIC REPUBLIC  
MINISTRY OF  
DEVELOPMENT AND INVESTMENTS  
SPECIAL SECRETARIAT FOR  
ERDF & CF PROGRAMMES  
MANAGING AUTHORITY OF ΕΡΑΝΕΚ

**ΕΡΑΝΕΚ 2014-2020**  
OPERATIONAL PROGRAMME  
COMPETITIVENESS  
ENTREPRENEURSHIP  
INNOVATION

**ΕΣΠΑ**  
2014-2020  
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη  
Partnership Agreement  
2014 - 2020

Co-financed by Greece and the European Union

FOODBIOMES  
INNOVATIONS IN MICROBIOME APPLICATIONS



# MICROBIOME APPLICATIONS IN FOOD SYSTEMS

**FOLLOW**  
US ON LINKED   
—  
**@FOODBIOMES**



**VISIT OUR WEBSITE**

<https://foodbiomes.eu/>



 **ΚΥΚΛΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ-QCon**



# Παρουσίαση ProbiYogi στην 87η ΔΕΘ



(Σεπτέμβριος 2023)

# Σας ευχαριστώ πολύ!

