UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti

Dottorato di ricerca in Biotecnologia degli Alimenti

XXVIII CICLO

Coordinatore Prof. Emanuele Marconi

EFFETTO DELLE CONDIZIONI DI STRESS GASTROINTESTINALI SULLA VITALITA' DI BATTERI LATTICI DI INTERESSE SALUTISTICO

Dottorando: Antonio Russo (a.russo14@studenti.unimol.it)
Tutor: Prof.ssa Mariantonietta Succi

CAPITOLO 1
IL MICROBIOTA INTESTINALE

Composizione ed evoluzione del microbiota intestinale

Tutti gli organismi multicellulari vivono in associazione con i microbi circostanti, e gli esseri umani non fanno eccezione. Il corpo umano ospita un gran numero di batteri, Archea, virus ed eucarioti unicellulari. L'insieme dei microrganismi che vivono in "pacifica" coesistenza con il proprio ospite è definito microbiota. (Kunz *et al*., 2009; Morelli, 2008; Neish, 2009).

I microrganismi sono in grado di colonizzare qualsiasi superficie del corpo umano che è esposto all'ambiente esterno: la pelle (Costello *et al*., 2009; Grice *et al*., 2009), il tratto genito-urinario (Ravel *et al*., 2011), le vie respiratorie, la bocca (Nasidze *et al*., 2009) ed il tratto gastrointestinale (Neish, 2009), con una notevole variabilità interindividuale relativa ai diversi distretti. (Costello *et al*., 2009; Robinson *et al*., 2010).

Il tratto gastrointestinale rappresenta il distretto più fortemente colonizzato: si stima che il microbiota intestinale umano sia costituito da circa 10^{14} cellule microbiche, un numero 10 volte maggiore rispetto al numero di cellule umane presenti nel nostro organismo (Ley *et al*., 2006; Savage, 1977; Whitman *et al*., 1998), e che il solo colon contenga più del 70% di tutti i microbi presenti nel corpo umano (Ley *et al*., 2006; Whitman *et al*., 1998).

Il microbiota intestinale rappresenta un "organo metabolico" capace di influenzare la regolazione di molte funzioni sistemiche, contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete tipo 2, aterosclerosi) (Raoult *et al*., 2008; Holmes *et al*., 2011).

Il tratto gastrointestinale ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri che mantengono, in condizioni di equilibrio fisiologico, una relazione simbiotica con l'ospite. La composizione del microbiota intestinale può subire alterazioni in caso di disordini, come diarrea acuta, durante un trattamento antibiotico e, in misura minore, in seguito a modifiche nella dieta, ma i pattern individuali tendono

a rimanere costanti (Guarner & Malagelada, 2003). Nell'ambito di un determinato habitat intestinale, alcuni membri microbici sono riconosciuti quali autoctoni o "residenti", mentre altri, alloctoni, derivano dal cibo ingerito, dall'acqua o da altre componenti dell'ambiente esterno, il che rende questo ecosistema estremamente dinamico.

La mancanza di adeguate tecniche d'identificazione ha, per molto tempo, condizionato lo studio del microbiota intestinale, in quanto le metodiche classiche non permettevano l'identificazione di una parte delle specie presenti. Le nuove tecniche molecolari di studio del microbiota, hanno permesso di identificare e studiare il "metaboloma", cioè il complesso superorganismo costituito dal genoma di microbiota ed ospite, e la sua influenza sullo stato di salute e di malattia dell'ospite stesso. In particolare lo sviluppo delle tecniche basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale ha facilitato l'identificazione dei batteri che compongono il microbiota gastrointestinale.

I batteri dominanti nell'uomo adulto appartengono a quattro phyla prevalenti (Eckburg *et al*., 2005): i *Firmicutes* ed i *Bacteroidetes*, che rappresentano più del 90% della popolazione microbica del colon (Ley *et al*., 2008), e gli *Actinobacteria* e i *Proteobacteria*. Questi ultimi vengono spesso sottostimati nell'analisi dell'RNA 16S, pertanto per la loro identificazione è indispensabile la FISH (fluorescent in situ hibridization). Ai Firmicutes appartengono 200 generi tra cui i Lattobacilli, i Mycoplasmi, i Bacilli e i Clostridi. Ai Bacteroidetes appartengono 20 generi.

La concentrazione di microrganismi è molto elevata nella cavità orale, ove consiste principalmente di anaerobi come Prevotella, Peptostreptococchi, Bacteroidi, *Fusobacterium* ed *Eubacterium*. La popolazione microbica è scarsa nello stomaco a causa del pH estremamente acido dell'ambiente gastrico ed è rappresentata soprattutto da Lattobacilli, Sreptococchi e Lieviti che risiedono nello strato di mucosa che riveste l'epitelio gastrico.

Anche nel duodeno il microbiota è piuttosto limitato a causa del breve tempo di transito, della secrezione di fluidi biliari e pancreatici che uccidono la maggior parte dei batteri ingeriti, e per effetto dell'attività motoria propulsiva che impedisce la colonizzazione stabile del lume.

Si osserva un progressivo aumento nel numero delle specie dal digiuno all'ileo (Flegal *et al*., 2012; Clement *et al*., 2007), dove cominciano ad aumentare i gram negativi e gli anaerobi obbligati. Il colon, invece, contiene un complesso e dinamico ecosistema microbico con 10^{10}-10^{12} cellule/g o mL di contenuto luminale, costituito in maggioranza da anaerobi, particolarmente abbondanti nel cieco e nel colon destro a causa della grande disponibilità di substrati e del favorevole ambiente per la crescita batterica (basso tempo di transito, disponibilità pronta di nutrienti, pH favorevole ecc.) (Bengmark, 2001).

Nel colon ci sono diverse centinaia di specie molte coltivabili e quindi identificabili con metodi convenzionali ed un numero significativo di specie che non possono essere coltivate con metodi convenzionali e che sono state identificate direttamente nella matrice con tecniche molecolari. La maggior parte dei batteri del colon sono anaerobi non sporigeni (Qin Li *et al*., 2010; Backhed *et al*., 2005). In età geriatrica, sia il numero sia le differenze tra specie di *Bacteroides* spp si riduce ed aumentano i batteri del genere *Clostridium* spp (Woodmansey, 2007).

Nel liquido amniotico sono presenti batteri (Jiménez *et al*., 2008), ma sia il numero che la biodiversità sono bassi. Alla nascita l'intestino è essenzialmente sterile, ed il primo campione di feci, il meconio, presenta una diversità batterica molto bassa (Koenig *et al*., 2011). Immediatamente dopo il parto, i neonati sono esposti ad una pletora di microbi provenienti da ambienti diversi, ed il loro intestino viene colonizzato dai microrganismi che incontrano per primi, quelli presenti a livello vaginale in caso di parto naturale, oppure quelli provenienti dalla pelle nel caso di parto cesareo (Adlerbeth & Wold, 2009; Dominguez-Bello *et al*., 2010). Gli infanti nati con parto vaginale presentano comunità batteriche simili a quelle che si riscontrano nel microbiota vaginale della madre (Bacteroides e Lacatobacillus spp), mentre in quelli nati con parto cesareo si riscontra il microbiota caratteristico della pelle, con prevalenza dei taxa *Staphylococcus* spp e *Propionibacterium* spp. (Dominguez-Bello *et al*., 2010). Questi "colonizzatori" iniziali sono sostituiti da filotipi che entro 11 mesi sono specifici per ciascun neonato e diversi da quelli che si trovano nella madre (Vaishampayan *et al*., 2010). Secondo Koenig, la diversità filogenetica aumenta gradualmente nel

tempo, ed i cambiamenti nella composizione tassonomica del microbiota intestinale sono associati ad eventi quali l'uso di antibiotici e l'introduzione di cibi solidi (Koenig *et al*., 2011).

Il tipo di allattamento (al seno materno o artificiale) condiziona il tipo di microbiota intestinale: infatti gli infanti allattati al seno presentano una maggiore prevalenza delle specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* spp, mentre in quelli nutriti con latte artificiale prevalgono specie appartenenti al genere *Bacteroides* spp e *Lactobacillus* spp (Fallani *et al*., 2010) Il primo anno di vita è fondamentale per l'attecchimento del microbiota, che si accresce e si seleziona tra il primo ed il quarto anno di età, evolvendosi poi fino all'età adulta in maniera variabile da individuo ad individuo (Palmer *et al*., 2007; Grölund *et al*., 1999; Harmsen *et al*., 2000). Nei bambini tra 1 e 7 anni di età è presente un maggior numero di enterobatteri rispetto agli adulti, con una maggiore abbondanza di generi *Bifidobacterium* spp e *Clostridium* spp (Enck *et al*., 2009; Agans *et al*., 2011). Il microbiota intestinale adulto resta relativamente stabile nel tempo (Turroni *et al*., 2009).

Non è stato ancora definitivamente chiarito come l'ambiente e l'alimentazione possano influire sulla composizione del microbiota intestinale. Studi sul 16S rRNA hanno mostrato che nei bambini del Nord Europa vi è un maggior contenuto fecale di *Bifidobacterium* spp, mentre nelle feci di bambini del Sud Europa sono più rappresentati i *Bacteroidetes* e di *Lattobacilli* (Fallani *et al*., 2011). Una maggiore differenza è stata osservata tra bambini africani ed italiani, in quanto nelle feci dei bambini africani di villaggi rurali sono presenti più *Bacteroidetes* ed *Actinobacteria* e meno *Firmicutes* e *Proteobacteria* dei bambini Italiani. Inoltre nelle feci dei bambini africani vi è maggiore quantità di SCFA (De Filippo *et al*., 2010).

Uno studio di metagenomica su feci di individui provenienti da quattro nazioni di continenti diversi, ha permesso di identificare tre enterotipi non nazione- o continente- specifici. L'enterotipo I è ricco in *Bacteroidetes* e trae energia principalmente dalla fermentazione di carboidrati e proteine. L'enterotipo II è ricco in *Prevotella* e *Desulfovibrio*, che degradano le glicoproteine del muco presente sulla barriera mucosale intestinale. L'enterotipo III è ricco in

Ruminococcus e *Akkermansia* che degradano le mucine (Arumugam *et al*., 2011). Differenti abitudini alimentari contribuiscono alla diversità del microbiota intestinale, così come l'introduzione dell'amido nell'alimentazione umana spiega il polimorfismo dei geni dell'amilasi salivare (Perry *et al*., 2007). Lo studio sui bambini africani ha messo in evidenza una maggiore presenza di *Prevotella*, *Xylanibacter* e *Treponema*, che possiedono enzimi per massimizzare l'estrazione di energia da xilani e cellulosa, presenti in gran quantità nella dieta povera in calorie ma ricca in fibre di questi bambini (De Filippo *et al*., 2010).

Le funzioni del microbiota intestinale

Numerosissime sono le funzioni attribuite al microbiota intestinale. Gli effetti che esercita sull'ospite sono il risultato delle interazioni tra batteri, epitelio ed altre cellule umane, quali cellule del sistema immunitario e neuroni enterici (Hooper *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2005). L'analisi molecolare ha dimostrato che i batteri commensali modulano l'espressione di geni coinvolti in parecchie importanti funzioni intestinali ed extra intestinali, incluso il metabolismo xenobiotico, la maturazione intestinale postnatale, l'assorbimento dei nutrienti, la fortificazione della barriera mucosale. La fermentazione di residui alimentari non digeribili e di muco endogeno prodotto dall'epitelio è la principale fonte di energia nel colon.

L'endpoint metabolico è rappresentato dalla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA: short chain fatty acids) in particolare acetato, propionato e butirrato. Nel cieco e colon destro la fermentazione è molto intensa con un'elevata produzione di SCFA, produzione di un pH acido (range 5-6) e una rapida crescita batterica. Per contro, il substrato nel colon sinistro o distale è meno disponibile, il pH è quasi neutro e i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e l'attività della popolazione batterica è più bassa.

Gli SCFA hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospite: 1) il butirrato è la principale fonte di energia per l'epitelio del colon; 2) l'acetato e il propionato sono metabolizzati dal fegato (propionato) o dai tessuti periferici, in particolare i muscoli (per l'acetato), e possono avere un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo (Wong *et al*., 2006; Berggren *et al*., 1996).

I microrganismi del colon svolgono anche un ruolo nella sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, PP, H, acido pantotenico e folico) e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, questo ruolo è ulteriormente migliorato dalla presenza di SCFA (Pierro *et al*., 1996).

Le fonti di carbonio e di azoto disponibili nel colon, che il microbiota si è adattato ad utilizzare, sono costituite dai carboidrati e dalle proteine che sfuggono all'idrolisi da parte degli enzimi digestivi dell'ospite e raggiungono il colon senza che ne avvenga l'assorbimento durante il transito nell'intestino tenue. Nel colon la degradazione di queste sostanze è dovuta all'insieme delle attività metaboliche attuate dall'intera comunità batterica e ha l'effetto di instaurare interazioni di sinergia o interdipendenza nutrizionale, oltre che di competizione, tra diversi gruppi microbici. A causa dell'assorbimento nel tenue, il colon è un ambiente povero di zuccheri semplici, quali mono- e disaccaridi. Sono invece presenti quegli oligo- e polisaccaridi che resistono all'idrolisi da parte delle idrolasi dell'ospite: si tratta sia di carboidrati introdotti con l'alimentazione (ad esempio fibre, amidi resistenti, pectine), sia di glicoproteine e glicoconiugati prodotti dall'ospite. Questi carboidrati non digeribili raggiungono il colon dove sono depolimerizzati e fermentati dal microbiota (Salminen *et al.* 1998). Il metabolismo dei carboidrati è quantitativamente più importante nel tratto ascendente del colon, dove la disponibilità di substrato fermentescibile è maggiore; la produzione di acidi organici causa l'abbassamento del pH di questo tratto di intestino ostacolando la crescita dei batteri proteolitici putrefattivi, potenzialmente patogeni. Inoltre, nel colon, sono presenti proteine e peptidi di origine alimentare, batterica o endogena (Chacko e Cummings, 1988; Cummings & MacFarlane, 1997), rappresentati da residui alimentari, enzimi prodotti dall'ospite o dal microbiota intestinale, di glicoproteine del muco e di proteine rilasciate con lo sfaldamento delle cellule epiteliali o con la lisi dei batteri intestinali. Proteine e peptidi sono depolimerizzati ad opera dell'insieme delle endopeptidasi batteriche e pancreatiche presenti nel colon, che difatti costituiscono uno degli ecosistemi conosciuti con la maggiore attività proteolitica. Le proteasi prodotte dai gruppi microbici proteolitici idrolizzano le proteine ad aminoacidi e peptidi semplici, che rappresentano un'importante fonte di azoto per l'intero microbiota, inclusi i saccarolitici obbligati. Aminoacidi e peptidi possono inoltre essere utilizzati come fonti di carbonio ed energia da batteri che dipendono in modo obbligato dal metabolismo degli aminoacidi o che sono in grado di fermentare sia aminoacidi sia carboidrati (MacFarlane *et al.,* 1995; Salminen, 1998).

Clostridium spp, *Bacteroides* spp, *Peptococcus* spp ed *Eubacterium* spp sono i principali batteri proteolitici a livello intestinale. La secrezione di proteasi da parte di questi gruppi microbici avviene in risposta alla limitazione di nutrienti e ha luogo principalmente a livello del colon discendente. Lungo il transito dell'intestino crasso, la concentrazione dei carboidrati fermentabili si riduce gradualmente fino all'esaurimento facendo sì che il metabolismo fermentativo ceda il passo a quello proteolitico putrefattivo, come evidenziato dal progressivo aumento del pH. Gli aminoacidi sono catabolizzati attraverso reazioni di deaminazione, idrossilazione, deidrossilazione, desaturazione e decarbossilazione che rilasciano prodotti dannosi per la salute dell'ospite, quali ammoniaca, ammine e fenoli. L'ammoniaca diffonde attraverso la parete intestinale ed esercita un'azione tossica a livello cerebrale; le ammine, specialmente nei casi in cui un'insufficienza epatica ne compromette la detossificazione, sono nocive in quanto alterano la circolazione e l'attività muscolare e risultano mutagene e cancerogene.

Un'altra delle più importanti funzioni del microbiota intestinale è il cosiddetto "effetto barriera" tale per cui un microrganismo introdotto per via alimentare in un ospite normale viene eliminato in pochi giorni (Ducluzeau *et al*., 1970) precludendo al microrganismo la possibilità di proliferare; questa esclusione competitiva impedisce a molti microrganismi alloctoni di stabilirsi nel canale digerente, di proliferare e di esercitare eventualmente un'azione patogena. Questo effetto contribuisce inoltre a mantenere al di sotto di una certa soglia la popolazione di gruppi come *Clostridium* spp *o Enterococcus* spp che, pur essendo normalmente presenti nell'intestino, sono potenzialmente patogeni. Talvolta però, l'indebolimento dell'effetto barriera può portare a disturbi intestinali più gravi, determinati dalla crescita di agenti opportunistici come *Salmonella typhimurium, Sigella flexneri*, *Vibrio cholerae* e *Clostridium difficile*.

Disbiosi intestinale

Il termine "disbiosi", coniato originariamente da Metchnikoff, viene definito oggi come "un cambiamento quali/quantitativo del microbiota intestinale e della sua

attività metabolica" (Holzapfel *et al*., 1998), che produce effetti nocivi per la salute dell'ospite. La dieta incongrua, lo stile di vita non idoneo, lo stress e l'uso di antibiotici sono in grado di determinare modificazioni nell'equilibrio dell'ecosistema microbico intestinale. Questi fattori determinano alterazioni del metabolismo batterico, così come la crescita eccessiva di microrganismi potenzialmente patogeni, che determina il rilascio nell'intestino di prodotti potenzialmente tossici che svolgono un ruolo nella patogenesi di molte malattie croniche e degenerative.

"La morte risiede nell'intestino": è una celebre affermazione attribuita ad Ippocrate, il "padre" della medicina, vissuto nel 400 a.C. . Da tempo, quindi, è noto l'importante ruolo che l'intestino, ed in particolare l'equilibrio microbico in esso residente, svolge nella salute umana.

Antibiotici

L'uso di antibiotici è la più comune e significativa causa di alterazioni del microbiota intestinale (Gismondo, 1998). La capacità di un agente antimicrobico di influenzare l'ecosistema microbico intestinale dipende dallo spettro di azione (Gismondo, 1998), dal dosaggio (Nord, 1990) e dalla durata del trattamento (Nord & Edlund, 1990). Per quanto riguarda lo spettro di azione, un agente antimicrobico attivo sia contro i microrganismi Gram positivi che Gram negativi avrà un impatto maggiore sul microbiota intestinale (Gismondo, 1998).

Dal punto di vista farmacocinetico, la velocità di assorbimento intestinale e il sito di escrezione della forma attiva del farmaco (bile o saliva) determinano la concentrazione del farmaco nel lume intestinale e di conseguenza la gravità della disbiosi che ne deriva (Gismondo, 1998). In generale, gli antibiotici orali ben assorbiti nel piccolo intestino avranno un minore impatto sull'ecosistema microbico del colon, mentre quelli scarsamente assorbiti in quella sede possono causare cambiamenti significativi.

Il dosaggio e la durata della somministrazione di un antibiotico determinano anche l'entità dell'impatto sul microbiota: maggiore è il dosaggio e la durata della terapia, maggiore sarà l'impatto (Nord & Edlund, 1990).

Se un agente antimicrobico impatta in maniera grave sul microbiota intestinale, le ripercussioni negative che possono presentarsi sulla salute dell'ospite compendono:

- crescita eccessiva di microrganismi già presenti, come funghi o Clostridium difficile (Gorbach, 1993), che rappresenta una causa frequente di diarrea associata ad antibiotici;
- diminuzione della produzione di SCFA, che contribuiscono alla salute dell'ospite attraverso il miglioramento del flusso ematico del colon e del fegato (Topping & Clifton, 2001), l'aumento della solubilità e dell'assorbimento del calcio (Coudray *et al*., 1997), l'aumento della capacità di assorbimento del piccolo intestino (Clausen, 1998), ed il mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale (Sakata, 1997);
- una maggiore suscettibilità ai patogeni intestinali dovuta alla diminuzione della resistenza alla colonizzazione: esperimenti su modelli animali hanno dimostrato che l'alterazione del microbiota intestinale riduce il numero di patogeni necessario a causare un'infezione ed inoltre allunga la durata dell'infezione stessa (Hentges, 1983);
- diminuzione, per un periodo considerevole, dell'effetto terapeutico di alcune erbe officinali prescritte dopo terapia antibiotica (Kilkkinenn *et al*., 2002), a causa dell'interferenza degli antibiotici stessi sull'attività beta-glicosidasica batterica e necessaria per l'attivazione enzimatica dei glicosidi inerti (Pengally, 2004).

Stress

Diversi autori hanno teorizzato che la popolazione di lattobacilli presenti nell'intestino risente dei cambiamenti nella fisiologia del tratto gastrointestinale indotti dagli stress psicologici, come ad esempio l'inibizione del rilascio di acido cloridrico nello stomaco (Lenz *et al*., 1990), alterazioni nella motilità (Lenz *et al*., 1988) ed una maggiore produzione di bicarbonato a livello duodenale (Lenz, 1989).

Questi cambiamenti possono determinare un ambiente intestinale meno favorevole alla sopravvivenza, aderenza e alla replicazione dei lattobacilli.

Alterazioni dell'ambiente gastrointestinale possono portare al distacco dei lattobacilli dalla mucosa intestinale: questo spiegherebbe come mai nelle feci di 20 esemplari di primati di età compresa tra i 6 ed i 9 mesi si osserva un incremento di lattobacilli il primo giorno dopo la separazione dalla madre (primo giorno di stress emotivo), seguito poi da un decremento di tale popolazione microbica dopo alcuni giorni. La presenza di patogeni all'interno dei campioni fecali ha mostrato un andamento diametralmente opposto (Bailey & Coe, 1999).

E' stato osservato che l'esposizione a stress psicologico determina una significativa riduzione della produzione di mucina ed una minore presenza di mucopolisaccaridi acidi sulla superficie della mucosa intestinale (Lizko, 1987), e dal momento che tali sostanze sono importanti per inibire l'adesione di microrganismi patogeni, una loro diminuzione contribuisce alla colonizzazione da parte di tali microrganismi (Hentges, 1992).

Secondo Lizko, l'esposizione allo stress si traduce in una diminuzione della produzione di IgA, attiva contro l'adesione dei batteri patogeni e coinvolta nella loro eliminazione dal tratto gastrointestinale: pertanto tale diminuzione potrebbe contribuire all'aumento della colonizzazione intestinale da parte di microrganismi potenzialmente patogeni (PPMs) (Lizko, 1987).

Studi condotti su studenti universitari hanno riscontrato una diminuzione delle concentrazioni di IgA secretorie durante o subito dopo gli esami (Jemmott & McClelland, 1989). Le concentrazioni salivari di IgA secretorie sono inversamente associate a quelle di noradrenalina, suggerendo che l'attivazione del sistema nervoso simpatico sopprime la produzione e/o il rilascio delle IgA (Drummond & Hewson-Bower, 1997). Di conseguenza, la frequente soppressione dell'immunità mucosale da parte del sistema nervoso simpatico nel corso di esperienze stressanti potrebbe aumentare la colonizzazione della mucosa intestinale da parte di PPM.

È stato documentato che l'esposizione allo stress determina un aumento dei livelli di catecolamine, in particolare della noradrenalina, che provoca un aumento della crescita dei PPM nell'intestino (Jemmot & McClelland, 1989).

Esperimenti condotti in vitro da Ernst e Lyte hanno dimostrato che diversi mediatori chimici (noradrenalina, adrenalina, dopamina e DOPA) hanno la

capacità di promuovere la crescita di PPMs, in particolare Yersinia enterocolitica, Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa. Le concentrazioni di catecolamine utilizzate sono state equivalenti a quelle ritrovate nel plasma. Tutti i mediatori hanno determinato una maggiore crescita di E. coli. La noradrenalina ha determinato un forte aumento della crescita di Y. Enterocolitica, mentre sia dopa che la dopamina hanno prodotto solo piccoli, ma significativi, aumenti nella crescita. La noradrenalina ha anche aumentato in maniera marcata la crescita di P. aeruginosa, mentre le altre catecolamine non hanno determinato alcun effetto sulla crescita di questo microrganismo (Lyte & Ernst, 1992).

Dieta

Diversi studi recenti hanno dimostrato che la composizione della dieta è in grado di alterare il microbiota intestinale e le sue attività metaboliche. In particolare, fattori dietetici potrebbero spiegare il 57 % delle variazioni nel microbiota intestinale, mentre il genoma dell'ospite può influire per non più del 12% (Zhang *et al*., 2010). Ciò indica che la dieta ha un ruolo dominante nell'ecosistema microbico intestinale e la modifica di popolazioni batteriche chiave può trasformare il microbiota in un'entità patogenetica. Ad esempio, la dieta "occidentale", ad alto contenuto di zuccheri e grassi, provoca disbiosi che colpisce sia il metabolismo del tratto gastrointestinale dell'ospite, sia l'omeostasi immunitaria (Sekirov *et al*., 2010) . Questo è stato osservato in modelli murini sterili nei quali è stato trapiantato il microbiota fecale di umani adulti. I topi sono stati alimentati con una dieta a bassa percentuale di grassi e ricca di polisaccaridi vegetali, ed il passaggio ad una dieta "occidentale" ha determinato una crescita eccessiva di *Firmicutes* tra cui *Clostridium Innocuum*, *Eubacterium dolichum*, *Catenibacterium mitsuokai* ed *Enterococcus* spp., ed una significativa riduzione di *Bacteroides* spp (Turnbaugh et al., 2009).

Nei topi, le diete a ridotta percentuale di carboidrati si traduce in un aumento delle popolazioni di batteri appartenenti al phylum *Bacteroidetes*, (Walker *et al*., 2011) e le diete ipocaloriche ostacolano la crescita di *Clostridium coccoides*, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., che sono i maggiori produttori di butirrato necessario per l'omeostasi delle cellule epiteliali del colon

(Santacruz *et al*., 2009). Le diete ricche di carboidrati complessi inducono una riduzione delle specie patogene quali *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* ed *Enterobacteriaceae* (Walker et al., 2011) rispetto alle diete più ricche di grassi o proteine (Santacruz *et al*., 2009; Smith & Macfarlane, 1997; Cummings *et al*., 1979; Birkett *et al*., 1996). I carboidrati complessi aumentano anche i livelli di *Bifidobacterium* spp., come ad esempio *B. longum* subsp *longum*, *B. breve* e *B. thetaiotaomicron* (Pokusaeva *et al*., 2011); gli zuccheri raffinati, d'altra parte, mediano la crescita eccessiva di batteri opportunisti come *C. difficile* (Berg *et al*., 2012) e *C. perfringens* (Begley *et al*., 2006). Kruis e colleghi hanno osservato che l'assunzione di elevate quantità di zuccheri semplici con la dieta determina un rallentamento del transito intestinale, ed aumenta l'attività batterica fermentativa e le concentrazioni fecali di acidi biliari secondari (Kruis *et al*., 1991). Una conseguenza del rallentamento del transito intestinale è l'aumento dell'esposizione della mucosa a sostanze potenzialmente tossiche presenti nel lume intestinale (Lewis & Heaton, 1999).

L'ingestione di elevate quantità di fibra induce un aumento della produzione batterica di acidi grassi a catena corta che diminuiscono il pH intestinale: questo impedisce la crescita di batteri potenzialmente patogeni come *E. coli* e altri membri del *Enterobacteriaceae* (Zimmer *et al*., 2012). È interessante il dato secondo il quale i bambini europei possiedono una microbiota impoverito di *Bacteroidetes* e arricchito in *Enterobacteriaceae* rispetto ai bambini africani che vivono in comunità rurali, che gli autori attribuiscono proprio alla bassa assunzione di fibre alimentari da parte degli europei (De Filippo *et al*., 2010).

Una dieta ricca di proteine può aumentare la produzione di metaboliti batterici potenzialmente dannosi (MacFarlane & Gibson, 1994). È stato stimato che in individui che seguono una dieta occidentale tipica (caratterizzata da circa 100 g di proteine al giorno) fino a 12 grammi di proteine al giorno possono sfuggire alla digestione che avviene nella prima parte del tratto gastrointestinale e raggiungere di conseguenza il colon (Birkett et al., 1996), dove vengono fermentate dal microbiota dando origine a metaboliti potenzialmente dannosi

quali ammoniaca, ammine, fenoli, solfuri ed indoli (Roediger *et al*., 1997; Smith & MacFarlane, 1997).

In particolare, l'ingestione di grandi quantità di proteine di origine animale induce un aumento dell'attività di alcuni enzimi batterici, quali beta-glucuronidasi, azo-reduttasi, nitro-reduttasi e 7 alfa-idrossisteroido deidrogenasi, sia negli animali che nell'uomo (Gorbach *et al*., 1986), che si traduce in un incremento del rilascio di metaboliti potenzialmente tossici per l'intestino.

Composti contenenti zolfo, tra cui solfato e solfito, promuovono la crescita di PPMs o la produzione di prodotti batterici potenzialmente dannosi nel tratto gastrointestinale (Levitt *et al*., 1995). Nel colon è presente una classe di batteri anaerobi Gram negativi nota come batteri solforiduttori (SRB), che riducono solfato e solfito in solfuro (Cummings & MacFarlane, 1997), con conseguente produzione di idrogeno solforato, che può contribuire alla distensione addominale (Levitt *et al*., 1995), e danneggiare la mucosa del colon inibendo l'ossidazione dell'acido butirrico, reazione essenziale per l'assorbimento di ioni, per la sintesi di muco e di lipidi da parte delle cellule del colon (Roediger et al., 1997).

La quantità di solfato introdotto con l'alimentazione sembra essere il fattore principale che determina la crescita dei SRB: fonti di solfato sono rappresentate da conservanti, frutta secca (se trattata con anidride solforosa), verdure disidratate, crostacei (freschi o surgelati) (Jones, 1997), succhi di frutta confezionati, prodotti da forno (Marz, 1999), pane bianco e la maggior parte delle bevande alcoliche. È probabile che anche l'ingestione di alimenti ricchi in aminoacidi solforati (latte vaccino, formaggio, uova, carne e verdure crucifere) favorisce sia la crescita dei SRB, sia la produzione di solfuro nell'intestino crasso (Cummings & MacFarlane, 1997).

Microbiota intestinale e malattie connesse con l'obesità

Già a partire dal 2004, studi di Gordon e colleghi hanno dimostrato una potenziale relazione tra il microbiota intestinale e lo sviluppo di un fenotipo obeso. In particolare, è stata osservato nel microbiota di topi obesi un incremento di Firmicutes ed una proporzionale diminuzione dei Bacteroidetes (Ley *et al*.,

2005), osservazione che è stata confermata con l'aumento di Bacteroidetes in seguito ad intervento dietetico che ha determinato una perdita di peso in individui obesi (indice di massa corporea > 30) (Ley *et al*., 2006). Tuttavia, i meccanismi alla base della riduzione del rapporto Bacteroidetes:Firmicutes in pazienti obesi rimane controverso (Ley *et al*., 2006; Duncan *et al*., 2008), probabilmente anche a causa dell'eterogeneità per quanto riguarda la componente genetica e lo stile di vita.

In uno studio metagenomico, Le Chatelier e colleghi hanno osservato negli individui reclutati, una parte dei quali erano obesi, una distribuzione bimodale della diversità batterica intestinale a livello genetico: individui con bassa variabilità batterica (meno di 480.000 geni batterici, gruppo LGC, Low Count Gene), ed individui con alta variabilità genetica (più di 480.000 geni batterici, gruppo HGC, High Count Gene) (Le Chatelier *et al*., 2013). I membri del gruppo HGC erano caratterizzati da un'elevata presenza di specie batteriche ad azione antinfiammatoria, come F. prausnitzii, e di acidi organici (compreso il butirrato), mentre i membri del gruppo LGC (caratterizzato dalla quasi totalità dei pazienti obesi reclutati) erano caratterizzati da un'elevata presenza di specie di Bacteroides spp pro-infiammatorie e geni convolti nella risposta allo stress ossidativo (Vrieze *et al*. 2012). Un intervento dietetico finalizzato alla perdita di peso ha indotto un incremento della variabilità genetica del microbioma nei pazienti appartenenti al gruppo LGC, determinando un miglioramento dello statu metabolico (Cotillard *et al*., 2013). Questo risultato supporta il collegamento tra abitudini dietetiche e la composizione del microbiota intestinale (Karlsson *et al*., 2013).

Recentemente è stata stabilita anche una relazione causale tra l'omeostasi del glucosio da parte dell'ospite e la composizione del microbiota intestinale: il trapianto di microbiota fecale da donatori magri a pazienti con sindrome metabolica ha migliorato in maniera significativa la loro insulino-resistenza (Vrieze *et al*. 2012). Il trapianto ha inoltre contribuito ad un incremento della diversità microbica e di specie batteriche coinvolte nella produzione del butirrato.

Questi studi evidenziano che il microbiota svolge un ruolo importante nell'omeostasi energetica di un individuo e nello sviluppo dell'obesità e dei suoi

disturbi metabolici associati (OAMD, Obesity and its Associated Metabolic Disorders), sebbene i meccanismi alla base risultino ancora poco chiari.

Patologie epatiche e microbiota intestinale

Il microbiota intestinale e le malattie croniche del fegato sono strettamente collegati, dal momento che il fegato riceve il 70% del suo approvvigionamento di sangue dalla vena porta, ed è quindi esposto a componenti batterici, endotossine e peptidoglicani. Lo studio della natura della disbiosi intestinale, l'integrità della barriera intestinale ed i meccanismi della risposta immunitaria da parte del fegato nei confronti dei componenti batterici provenienti dall'intestino è potenzialmente rilevante per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento di malattie epatiche croniche (Son *et al*., 2010).

Recenti evidenze dimostrano che una disbiosi intestinale può contribuire allo sviluppo della steatosi epatica (NAFLD) e della steatoepatite non alcolica (NASH). Secondo Zhu e colleghi, il microbiota intestinale di bambini affetti da NASH presenta una concentrazione maggiore di *Escherichia* spp rispetto a bambini obesi e bambini sani (Zhu *et al*., 2013). Inoltre pazienti con NAFLD presentano un aumento della permeabilità intestinale, suggerendo che la traslocazione di prodotti di derivazione batterica nel circolo portale potrebbe contribuire alla patogenesi della malattia (Miele *et al*., 2009).

Dal momento che non tutti i soggetti che fanno abuso di alcol sviluppano lesioni epatiche, sembra che l'eccessivo uso sia una condizione necessaria ma non sufficiente per causare disfunzione epatica. Numerosi studi su modelli animali ed umani indicano che i prodotti del microbiota intestinale, come le endotossine, le cui concentrazioni sieriche sono elevate in caso di epatopatia alcolica, sono in grado di mediare l'infiammazione ed agire come cofattori per lo sviluppo dei danni epatici dovuti all'alcol (Nanji *et al.*, 1993).

L'alcol induce proliferazione batterica intestinale nell'uomo: infatti i soggetti che fanno abuso di alcol in maniera cronica presentano cariche microbiche in aspirati digiunali significativamente più alte rispetto ai controlli, con risultati simili a quelli di pazienti con cirrosi indotta da alcol (Pande *et al*.,

2009). Il grado di proliferazione correla con la gravità della cirrosi. La somministrazione intragastrica di etanolo per 3 settimane ha determinato in modelli murini un incremento nella popolazione di Bacteroideti ed Akkermansia spp, ed una riduzione dei generi Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus e Pediococcus, mentre i topi di controllo hanno mostrato una predominanza di Firmicuti (Yan *et al*., 2011). I pazienti con epatopatia alcolica mostrano anche un aumento della permeabilità intestinale, che contribuisce alla traslocazione di batteri e prodotti batterici al fegato (Yan & Schnabl., 2012).

Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) e microbiota intestinale

Diversi studi in passato hanno cercato di individuare batteri che potenzialmente fossero in grado di innescare la cascata infiammatoria alla base delle IBD. Sono stati proposti diversi microrganismi: Mycobacterium avium subsp paratubercolosis, ed un certo numero di Proteobacteria, compreso specie di Helicobacter enteroepatiche, Campylobacter non jejuni/coli ed E. Coli aderente e invasivo (AIEC). Il concetto che un cambiamento radicale nella composizione del microbiota intestinale possa essere probabilmente l'evento determinante nello sviluppo delle IBD rappresenta lo sviluppo più significativo, negli ultimi dieci anni, nella ricerca sulle malattie infiammatorie croniche intestinali (Hold *et al*., 2014).

Alterazioni nel microbiota intestinale sono stati riscontrati ripetutamente in pazienti affetti da IBD, con differenze legate al tipo di malattia (malattia di Crohn o colite ulcerosa), tuttavia la riduzione dei Firmicuti rappresenta la modifica più comune (Peterson *et al*., 2008), insieme ad un aumento dei Bacteroideti (Walker *et al*., 2011).

Una riduzione della specie F. prausnitzii, appartenente al phylum dei Firmicutes, è stata documentata in pazienti affetti da malattia di Crohn, particolarmente in coloro con localizzazione ileale (Hansen *et al*., 2012). Altri studi hanno anche dimostrato una riduzione nella diversità nell'ambito del phylum dei Firmicutes in soggetti affetti da IBD rispetto ai controlli (Manichanh *et al*.,

2006). Cambiamenti nei due phyla dominanti, i Bacteroidetes ed i Firmicutes, sono stati associati anche ad un incremento delle specie appartenenti al pylum dei Proteobacteria, che secondo evidenze scientifiche sembrano avere un ruolo chiave nelle IBD (Mukhopadhya *et al*, 2011), in particolare sembra che un aumento delle specie appartenenti a questo phylum, soprattutto E. Coli, possa essere determinante nell'avvio dell'infiammazione cronica nei pazienti (Lupp *et al*., 2007; Barnich *et al*., 2013).

Cancro del colon retto (CRC) e microbiota intesinale

Il cancro del colon-retto (CRC) è tra i tumori più comuni in tutto il mondo, con oltre 1,4 milioni di casi e circa 700.000 morti nel 2012 (Torre *et al*., 2015). L'incidenza di CRC è più alta nei Paesi occidentali, ma è in rapido aumento anche nei paesi in via di sviluppo. I due principali fattori che contribuiscono al verificarsi di CRC sono fattori genetici (15%) ed ambientali (de Martel *et al.*, 2012).

Un numero sempre crescente di studi dimostra il ruolo dell'infiammazione nello stabilire le condizioni che possono alterare profondamente le risposte immunitarie locali e, di conseguenza, l'omeostasi tissutale.

Attualmente, l'associazione tra cancro ed agenti infettivi batterici si riscontra in circa il 20% di tutti i tumori maligni (de Martel & Franceschi, 2009). Una correlazione tra la composizione del microbiota intestinale e l'insorgenza del cancro è stata esaminata in modelli animali sperimentali e studi clinici ed epidemiologici. Studi condotti su modelli animali ed umani hanno dimostrato un'associazione tra una dieta di tipo occidentale (abuso di carne rossa e grassi, ridotto consumo di verdura) e cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale, che hanno determinato l'aumento dell'attività di enzimi batterici fecali, così come la modifica della produzione di solfuri e del metabolismo degli acidi biliari, con un impatto sullo sviluppo di condizioni favorevoli alla carcinogenesi (O'Keefe et al., 2009; Vannucci et al., 2009).

L'elevata produzione di metaboliti cancerogeni è imputabile ai batteri anaerobi dell'intestino, e la somministrazione di lattobacilli contribuisce alla

riduzione della produzione di queste sostanze tossiche (Chung et al., 2008). L'infezione da *H. pylori* della mucosa gastrica crea le condizioni per lo sviluppo di ulcere, adenocarcinomi e linfomi gastrici a cellule B: infatti, la continua infiammazione indotta dai batteri attiva vie cellulari che inducono modificazioni nella produzione di mucina, nonché metaplasia e proliferazione cellulare. Cambiamenti nella produzione di mucina e nella struttura tissutale sono stati descritti sia in condizioni neoplastiche gastriche collegate ad *H. pylori*, sia durante lo sviluppo del carcinoma colorettale (Babu et al., 2006). Queste alterazioni gradualmente modificano le interazioni tra il microbiota e la mucosa, in particolare avvengono variazioni dell'adesività e dell'integrità della barriera mucosale. Alcuni batteri sono in grado di indurre modificazioni nella permeabilità della mucosa, facilitando la traslocazione di batteri e di tossine batteriche (ad esempio, lipopolisaccaride). Le risposte infiammatorie indotte sono coinvolte nella progressione del cancro (Fukata & Abreu, 2008).

Studi recenti hanno riscontrato differenze tra il microbiota di pazienti con CRC e soggetti sani. Ad esempio, le feci dei pazienti CRC hanno mostrato un aumento delle popolazioni di *Bacteroides-Prevotella* rispetto ai controlli (Sobhani et al., 2011). Un altro studio ha esaminato le comunità batteriche presenti sulla superficie della mucosa intestinale di pazienti con adenoma. È interessante notare che, a livello di genere, i pazienti con adenomi hanno mostrato una maggiore abbondanza di *Dorea* spp., *Faecalibacterium* spp. e minori proporzioni di *Bacteroides* spp. e *Coprococcus* spp. rispetto ai soggetti sani (Shen *et al*., 2010). Questa scoperta ha rivelato che alterazioni nel microbiota intestinale sono associate con CRC, anche se non è chiaro se questi cambiamenti precedono l'insorgenza della malattia o semplicemente riflettono una conseguenza della malattia.

Diverse sono le strategie alimentari messe in atto per modulare sia la composizione che l'attività metabolico-immunologica del microbiota intestinale umano: l'assunzione di probiotici è di sicuro tra le più consolidate (Tuohy & Del Rio, 2014).

CAPITOLO 2
I PROBIOTICI

Descrizione e definizione

Nel corso dei millenni, la specie umana si è evoluta per contrastare o eventualmente trarre beneficio dal consumo di microrganismi presenti nei cibi; in base a ciò l'interesse scientifico e commerciale nei confronti dei *probiotici* ha seguito una curva esponenziale nell'ultimo decennio, essendo tali alimenti ampiamente discussi e studiati per la loro capacità di produrre effetti benefici sulla salute dell'uomo (Collado *et al*., 2009; Karapetkov *et al*., 2011; Saarela *et al*., 2002; Sharma & Devi, 2014).

Dal greco *pro-bios* "a favore della vita", il termine probiotico ha assunto significati diversi nel corso degli anni. La prima significativa introduzione del concetto di probiotico risale, infatti, agli inizi del 1900, quando lo scienziato russo Elie Metchnikoff ipotizzò che la complessa comunità microbica esistente a livello del colon fosse responsabile della longevità dei contadini bulgari che li assumevano con un elevato consumo di latti fermentati (Metchnikoff, 1907). Il termine probiotico è stato però utilizzato per la prima volta per descrivere quelle "sostanze secrete da un organismo in grado di stimolare la crescita di un altro" (Lilly & Stillwell., 1965). Attualmente la definizione ufficiale di FAO e OMS, di probiotici è "organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite" (Guarner & Schaafsma,1998). Il documento FAO/OMS che fornisce questa definizione si riferisce a microrganismi non patogeni presenti negli alimenti o aggiunti ad essi, ed "esclude riferimenti ad agenti bioterapeutici e a microrganismi benefici non utilizzati in ambito alimentare".

Caratteristiche e criteri di selezione

Un probiotico deve essere non patogeno, tecnologicamente adatto per i processi industriali, resistente agli acidi e ai sali biliari, deve essere in grado di aderire al tessuto epiteliale intestinale, o almeno persistere nel tratto gastrointestinale per un breve periodo, produrre sostanze antimicrobiche, modulare la risposta immune e influenzare le attività metaboliche dell'intestino (Dunne, 1999). Una delle caratteristiche più desiderabili dei microrganismi probiotici è quella di arrivare con elevate cariche nell'intestino affinché gli effetti positivi possono essere esplicati anche nel caso in cui non aderiscano all'epitelio e non lo colonizzino, in quanto tali eventi si manifestano raramente.

Nonostante alcuni probiotici abbiano un'elevata capacità colonizzatrice, dopo circa 7-15 giorni dalla sospensione della loro assunzione si manifesta una diminuzione della loro efficacia, proprio per questo motivo è necessaria una continua assunzione tramite integrazione alla dieta con alimenti ricchi di probiotici, al fine di ottenere effetti soddisfacenti.

Fino ad ora, l'attività probiotica è stata associata a lattobacilli, quali: *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. lactis*, e a bifidobatteri come: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, e *B. longum*. A queste si aggiungono altre specie microbiche appartenenti ai generi *Streptococcus* (*S. thermophilus*) *Lactococcus* (*Lc. lactis*) (Roberfroid e Gibson, 1994), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enteroccoccus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Propionibacterium* e *Bacillus*, ma il loro utilizzo è limitato dalla presenza di alcune specie potenzialmente patogene appartenenti a questi generi, il che mette in dubbio la reale sicurezza della loro somministrazione (FAO/WHO, 2002).

Gli acidi biliari inibiscono la crescita di diversi probiotici Gram-positivi, quali ceppi appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mentre hanno un effetto decisamente inferiore se non addirittura nullo su organismi Gram-negativi come *E. coli*. La resistenza a pH acidi risulta critica anche in campo alimentare, in quanto uno dei principali fattori responsabili della mortalità di bifidobatteri in cibi fermentati, è proprio l'acidità (Moreno *et al.*, 2006).

L'induzione di acido-resistenza in ceppi di *B. longum* e *B. catenulatum* ha determinato un incremento nella tolleranza anche ad altre condizioni di stress (sali, bile ed alte temperature), suggerendo lo sviluppo di meccanismi di protezione crociata (Collado & Sanz, 2007). Inoltre, i ceppi acido-resistenti hanno mostrato una maggiore capacità fermentativa ed un aumento delle attività enzimatiche presumibilmente coinvolte nell'utilizzo di glicoproteine umane e di prebiotici, ciò incrementa ulteriormente le loro possibilità di sopravvivenza e colonizzazione transiente dell'epitelio intestinale. L'esposizione a condizioni di stress acido può indurre variazioni anche a livello di componenti strutturali, quali acidi grassi della membrana cellulare, con conseguenti modifiche nella permeabilità di membrana e nei pattern di resistenza/sensibilità ad antibiotici (Fozo *et al.*, 2004).

I sali biliari sono detergenti naturali, sintetizzati nel fegato a partire da colesterolo e conservati come coniugati aminoacidici a livello della vescica biliare, che facilitano la digestione e l'assorbimento di componenti della dieta idrofobici. La loro natura anfipatica è responsabile della loro attività antimicrobica, che determina danni alle membrane e stress ossidativo (Bernstein *et al.*, 1999).

La superficie cellulare dei microrganismi rappresenta il primo target fisico d'azione della bile. I sali biliari sono in grado di modulare l'espressione di proteine di membrana in batteri enterici (Bron *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006), di influenzare la composizione lipidica in *Bifidobacterium* (Gómez-Zavaglia *et al.*, 2002) e di compromettere la funzionalità della membrana cellulare in *Lactobacillus* (Taranto *et al*., 2003; Taranto *et al*., 2006). I meccanismi di inibizione della crescita sono probabilmente correlati alla dissipazione del potenziale di membrana (Kurdi *et al.*, 2006). Ai fini di contrastare la tossicità della bile, in *Bifidobacterium* è stato riportato il coinvolgimento di diversi meccanismi cellulari, quali l'espulsione dei sali biliari attraverso proteine multidrug resistance (Price *et al.*, 2006) e l'incremento di attività dell'enzima *bile salt hydrolase* (BSH) (Begley *et al.*, 2006; Noriega *et al.*, 2006). In particolare, l'adattamento alla bile in *B. animalis* subsp. *lactis* ha determinato un calo della fluidità di membrana, una riduzione del rapporto proteine-fosfolipidi, ed uno shift nella composizione in acidi grassi della membrana cellulare (Ruiz *et al.*, 2007).

I probiotici destinati all'impiego umano possono essere suddivisi in probiotici alimentari e farmaceutici. I primi, oltre all'effetto positivo esercitato direttamente sul microbiota intestinale dell'ospite, possono contribuire alle proprietà organolettiche, reologiche e nutrizionali dei cibi. I prodotti fermentati contengono, infatti, vitamine e sali minerali in maggiore quantità (McDonough *et al*., 1983), e i carboidrati e le proteine si trovano in forma più digeribile rispetto agli stessi prodotti non fermentati. I probiotici farmaceutici trovano, invece, impiego nel trattamento di diarrea, stipsi, flatulenza, acidità gastrica, colonizzazione da patogeni, gastroenterite e ipercolesterolemia. Diversi trial clinici hanno dimostrato la loro efficacia anche nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali quali colite ulcerosa, morbo di Crohn, pouchite (Gionchetti *et al.*, 2000; 2003a; 2003b; Sartor, 2004; Sartor, 2005) e sindrome del colon irritabile (Limdi *et al.*, 2006). La loro azione terapeutica può essere correlata ad alcune attività accertate per i suddetti batteri, quali competizione con microrganismi patogeni, neutralizzazione di cataboliti "tossici" mediante produzione di enzimi detossificanti, e modulazione del sistema immune dell'ospite (McCracken *et al*., 1999; Madsen *et al.*, 2001; Ulisse *et al.*, 2001; Lammers *et al.*, 2003).

I prerequisiti indispensabili per l'impiego di probiotici sono sicurezza ed efficacia. La possibilità che una qualunque specie o ceppo microbico possa essere impiegato in alimentazione umana è subordinata alla sua sicurezza d'uso. Su tale aspetto, da qualche anno, è deputato a pronunciarsi l'*European Food Safety Authority* (EFSA) che ha introdotto il concetto di *Qualified Presumption of Safety* (QPS), per riconoscere quei microrganismi o loro componenti che possono essere utilizzati negli alimenti o per la produzione di alimenti. Lo status QPS è il corrispondente dello status *Generally Recognized As Safe* (GRAS) utilizzato negli USA. Perché siano considerati sicuri per il consumo umano i microrganismi non devono essere né potenzialmente patogeni o tossinogeni, né associabili a potenziali rischi per la salute dell'ospite, né tantomeno possedere antibiotico-resistenze trasmissibili.

Per quanto concerne, invece, la loro efficacia a livello intestinale, le caratteristiche ottimali includono tolleranza alle condizioni presenti nel tratto gastrointestinale (resistenza ai succhi gastrici, alla bile, e alla digestione ad opera di enzimi enterici

o pancreatici), capacità di adesione alle superfici intestinali, antagonismo nei confronti di batteri patogeni, produzione di sostanze antimicrobiche e capacità di modulare la risposta immune dell'ospite (Dunne *et al.*, 2001).

Effetti benefici dei probiotici in specifiche condizioni cliniche

Molti sono gli effetti positivi sulla salute che sono stati associati all'utilizzo di probiotici (Asahara *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 2001). Il miglioramento nella diarrea è una caratteristica ben documentata di alcuni ceppi (Bennet *et al.*, 1996; Kaila & Isolauri, 1996; Arvola *et al.*, 1999; Orrhage *et al.*, 2000; de Roos & Katan, 2000; Van Niel, 2002) e in particolare è stata accertata la capacità di *Lb. rhamnosus* GG di accorciare la durata della fase acuta della diarrea da rotavirus (Kaila & Isolauri, 1996; de Roos & Katan, 2000). E' stata anche riferita una stimolazione del sistema immunitario da parte dei probiotici (Link-Amster *et al.*, 1994; Kishi *et al.*, 1996; Majamaa *et al.*, 1997; Miettinen 1996; 1998; Murosaki *et al.*, 1998; Pessi *et al.*, 2000; Pessi *et al.*, 1999; Maassen *et al.*, 2000; Isolauri *et al.*, 2000). Le proprietà dei probiotici sono considerate specifiche per ogni ceppo, e i risultati ottenuti con un ceppo non possono essere attesi anche per un altro, nonostante i due ceppi siano strettamente correlati (Holzapfel *et al.*, 1998).

Intolleranza ai disaccaridi

La lattasi presente nei batteri utilizzati nella produzione di yogurt interviene nella digestione del lattosio, migliorando, nei soggetti intolleranti a quest'ultimo, la digestione dello yogurt (Marteau *et al*, 1990). Tale effetto viene però perso se lo yogurt è pastorizzato, come avviene negli Stati Uniti. Secondo Marteau e colleghi, l'integrazione con *S. cerevisiae*, che contiene una saccarasi, aiuta la digestione di saccarosio in bambini che sono saccarasi-deficienti.

Helicobacter pylori e dispepsia

Canducci *et al.* (2000) hanno dimostrato in un trial terapeutico che *Lb. acidophilus*, co-somministrato insieme ad una terapia convenzionale anti-*Helicobacter pylori*, aumenta il rate di eradicazione dell'infezione rispetto al gruppo che non riceve il probiotico (88% vs 72%). Tuttavia, la completa eradicazione dell'infezione con un probiotico somministrato senza terapia farmacologica non è stata ancora osservata. L'integrazione di terapie farmacologiche con probiotici è stata anche utilizzata con successo per migliorare la tolleranza verso il trattamento anti-*H. pylori*, e per ridurre la dispepsia post-trattamento (Cindoruk *et al*., 2007), sebbene l'effetto benefico per quanto riguarda il rate di eradicazione non è risultato statisticamente significativo.

Malattie infiammatorie croniche intestinali

I meccanismi attraverso i quali i batteri intervengono nei pazienti con malattie infiammatorie intestinali includono l'azione pro-infiammatoria di componenti batterici (LPS), aumentato richiamo di cellule che intervengono nel processo infiammatorio, aumento della permeabilità intestinale, ed un'alterazione nella risposta immune dell'ospite, sia per quanto riguarda la modulazione delle citochine, sia per quanto riguarda un anomalo riconoscimento dei componenti batterici. I meccanismi di azione dei probiotici nelle malattie infiammatorie intestinali includono modifiche nei pattern di produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), riduzione della secrezione di citochine pro-infiammatorie, incremento del rapporto tra cellule Th1/Th2, ed eliminazione dei patogeni (Gratz *et al*., 2010).

Molti degli studi eseguiti su pazienti con malattie infiammatorie intestinali sono stati compiuti in coloro che presentavano un coinvolgimento del colon. Studi passati effettuati alla ricerca di un agente infettivo che fosse coinvolto nella patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali hanno portato all'identificazione di antigeni presenti in comuni microrganismi in un numero significativo di pazienti affetti dal morbo di Crohn (Cartun *et al*., 1993). Dal sangue periferico di tali pazienti sono stati anche isolati anticorpi contro vari

microrganismi (Tabaqchali *et al.*, 1978). Harper *et al*. (1985) hanno dimostrato che l'infusione del contenuto ileale in soggetti con resezione di un tratto del colon ed anastomosi ileo-colica ha comportato la comparsa di recidiva clinica, mentre tale recidiva non si è manifestata quando il contenuto ileale è stato sottoposto a filtrazione per rimuovere particelle con diametro inferiore a 22 micron (compresi i batteri).

Studi effettuati su topi knock-out per l'interleuchina 10, che spontaneamente sviluppano ulcere al colon simili a quelle che si presentano nel morbo di Crohn, hanno mostrato che la somministrazione di lattobacilli (Madsen *et al*., 1999; Schultz *et al*., 1998), o del lattulosio, hanno contribuito a prevenire o ad attenuare l'insorgenza della colite. Anche la somministrazione orale di *Lactococcus lactis* modificato geneticamente con lo scopo di indurne la produzione di IL-10 (citochina con attività antinfiammatoria nell'intestino) ha ottenuto risultati positivi in modelli murini.

Studi sull'uomo hanno portato a risultati alterni. Prantera *et al.* (2002) hanno dimostrato l'inefficacia del trattamento con *Lb. rhamnosus GG* nella riduzione della recidiva in pazienti affetti dal morbo di Crohn; altri (Guslandi *et al*., 2000; Plein and Hotz, 1993) hanno osservato una riduzione dei sintomi e delle ricadute in seguito a co-somministrazione, in pazienti affetti dal morbo di Crohn, di *S. boulardii* insieme alla terapia convenzionale. Sebbene l'uso di probiotici abbia mostrato risultati promettenti nel trattamento della colite ulcerosa in pochi studi, molto meglio documentata è invece la loro efficacia nella prevenzione delle recidive. Il preparato commerciale multiceppo VSL#3 ha mostrato buoni risultati nel mantenimento dello stato di remissione in pazienti affetti da colite ulcerosa (Venturi *et al*., 1999); simili risultati sono stati ottenuti anche con altri preparati (Furrie *et al*., 2005; Kruis *et al*., 2004; Zocco *et al*, 2006). VSL#3 ha mostrato efficacia anche nella prevenzione e nel trattamento della pouchite, una delle più comuni complicanze dopo intervento chirurgico di proctocolectomia ed anastomosi ileo-anale nella colite ulcerosa (Gionchetti et al., 2000; Gionchetti et al., 2003).

Diarrea infettiva

Il presupposto per l'utilizzo dei probiotici nella diarrea infettiva in fase acuta è il riconoscimento dell'effetto barriera esercitato da questi nei confronti di batteri patogeni enteroinvasivi, e l'osservazione che la popolazione microbica commensale del colon può subire alterazioni durante un'infezione enterica. Il ripristino della popolazione commensale attraverso la somministrazione di probiotici sembra essere un interessante approccio terapeutico.

I probiotici sono stati utilizzati con successo nella prevenzione per ridurre l'incidenza della diarrea nella popolazione (Oberhelman *et al*., 1999) come negli ambienti ospedalieri (Szajewska *et al*., 2001a). Hanno trovato impiego con risultati positivi per ridurre la gravità e la durata della diarrea, soprattutto nei bambini (Kurugol & Koturoglu, 2005) e nei casi di infezione da rotavirus. *Lb. rhamnosus GG* e *S. boulardii* sono i probiotici maggiormente studiati in tal senso. Szajewska *et al*. (2001b), dopo aver esaminato 13 trials, hanno concluso che la maggiore efficacia terapeutica si ottiene nella diarrea da rotavirus; lo stesso gruppo di ricerca è giunto alla conclusione, in seguito ad una metanalisi abbastanza recente, che il trattamento con *Lb. rhamnosus GG* determina un moderato beneficio clinico nel corso di diarree acute nei bambini (Szajewska *et al*., 2007) . Una metanalisi recente ha valutato l'efficacia dei probiotici nella prevenzione delle diarree di diversa eziologia, ed ha portato alla conclusione che i probiotici riducono in maniera significativa la diarrea da uso di antibiotici del 52 % (95% CI 35-65%), riducono il rischio di diarrea del viaggiatore dell'8% (-6-21%), e quello di diarrea acuta da diverse cause del 34% (8-53 %). Inoltre, l'effetto protettivo non cambia significativamente in base ai ceppi utilizzati (Sazawal *et al*., 2006).

Isolauri e colleghi hanno dimostrato che la somministrazione di *Lb. rhamnosus GG* in bambini con gastroenterite da rotavirus determina un incremento in circolo del numero di cellule secernenti immonuglobuline, ed un numero elevato di questi bambini sviluppa una risposta specifica (IgA) al virus (Isolauri *et al*., 1991). Sono stati compiuti anche tentativi, alcuni con successo, di incrementare la risposta anticorpale durante vaccinazione orale con il vaccino anti-rotavirus e *Salmonella typhi Ty21a* (Blum et al., 2002).

Diarrea del viaggiatore

L'incidenza della diarrea del viaggiatore varia dal 20% al 50% a seconda del punto di partenza e di destinazione, con le zone equatoriali che presentano i valori più elevati. Circa 12 milioni di casi sono riportati ogni anno (Cheng & Thielman, 2002). Le misure preventive tradizionali comprendono il lavaggio frequente delle mani, evitare cibi ed acqua ad alto rischio, e l'uso di subsalicilato di bismuto comporta solo una modesta protezione. *E. Coli* enterotossigeno rappresenta il microrganismo maggiormente coinvolto in questo tipo di diarrea. L'azione preventiva dei probiotici riportata in letteratura ha fornito risultati diversi in base all'agente microbico coinvolto (che può essere specifico della destinazione del viaggiatore), al ceppo utilizzato (Hilton *et al*., 1997) ed alla destinazione. I probiotici più comunemente studiati sono *Lb. rhamnosus GG* e *S. boulardii* Kollaritsch *et al*., 1993). Una recente metanalisi ha concluso che diversi probiotici sono sicuri e mostrano una significativa efficacia nella prevenzione della diarrea del viaggiatore (McFarland, 2007).

Diarrea da uso di antibiotici

E' erroneamente ritenuto che tutte le diarree da uso di antibiotici (AAD) siano causate da colonizzazione da parte di *C. difficile*. Mentre ciò risulta vero nel 10-30% dei casi di AAD e nel 95% dei casi con colite pseudomembranosa (collegata ad un ceppo tossigeno di *C. difficile*), l'AAD può essere causata anche da altri patogeni quali *Salmonella*, *C. perfringens* tipo A e *Staphylococcus aureus* (Sparks *et al*., 2001). L'AAD può presentarsi in seguito all'utilizzo di quasi tutti gli antibiotici: l'insorgenza precoce si manifesta durante trattamento con clindamicina, amoxicillina ed ampicillina, mentre un'insorgenza ritardata si manifesta in seguito all'utilizzo di eritromicina, ciprofloxacina e claritromicina.
Diverse metanalisi hanno confermato l'efficacia dei probiotici nella prevenzione dell'AAD (Cremonini *et al.*, 2002; McFarland, 2006), mentre Kotowska *et al*. (Kotowska *et al*., 2005) hanno dimostrato l'efficacia di *S. boulardii* nella

prevenzione dell'AAD nei neonati. Il trattamento della diarrea da *C. difficile* necessita della somministrazione di metronidazolo o vancomicina. Tuttavia, in circa un quarto dei casi trattati con tale protocollo si manifesta una ricaduta, la cui prevenzione viene attuata con la somministrazione di *S. boulardii* (McFarland *et al*., 1994; Surawicz *et al*., 2000) e *Lb. rhamnosus GG* (Gorbach *et al*., 1987).

Sindrome dell'intestino irritabile

Gli elementi patogenetici della sindrome dell'intestino irritabile (IBS) possono comprendere disfunzioni motorie e nervose dell'intestino, risposte immunitarie, intolleranze alimentari e predisposizione genetica. Fino ad un terzo di soggetti con precedenti episodi di diarrea infettiva acuta manifestano uno stato duraturo di infiammazione intestinale che si evolve, in una cospicua percentuale di essi, nella classica sindrome dell'intestino irritabile (Rodriguez *et al*., 1999). Questa evidenza suggerisce un ruolo significativo del microbiota intestinale in questa condizione. In diversi studi è stata osservata un'alterazione del microbiota intestinale nei pazienti affetti da IBS, suggerendo che il suo ripristino potrebbe essere un utile obiettivo terapeutico (Quigley & Flourie, 2007; Spiller, 2007). Pazienti con IBS possono presentare nel loro microbiota intestinale una riduzione nel numero di Lattobacilli e Bifidobatteri ed un incremento di alcuni batteri anaerobi facoltativi (Madden & Hunter, 2002).

Dal momento che tale patologia comprende diversi sintomi, e che l'infiammazione post-infettiva ne rappresenta solo un sottoinsieme, i tentativi di modificare il microbiota intestinale per placare l'IBS hanno avuto risultati alterni. Risposte positive sono state ottenute nel sottogruppo con diarrea prevalente ed hanno riguardato di solito singoli sintomi (prevalentemente diarrea e gonfiore).

Lb. plantarum 299V non ha dato miglioramenti in uno studio (DiBaise *et al.*, 2000), mentre in altri ha significativamente alleviato il dolore addominale e la flatulenza (Niedzielin *et al*., 2001), e l'intensità del gonfiore (Nobaek *et al*., 2000).

Una revisione sistematica e metanalisi di 14 trials ha mostrato un modesto miglioramento della complessiva sintomatologia in seguito a diverse settimane di

trattamento con probiotici, ed un miglioramento variabile dei singoli sintomi come dolore addominale, flatulenza e gonfiore, e qualità di vita (Hoveyda *et al*., 2009). Un'altra revisione sistematica di 16 trials ha concluso che nella maggior parte degli studi clinici controllati randomizzati sull'utilità dei probiotici nell'IBS non sono stati usati appropriati disegni sperimentali e quindi ci sono dati insufficienti per commentarne l'efficacia, con l'eccezione di *B. infantis* 35624 che ha mostrato efficacia nel miglioramento dei sintomi dell'IBS (dolore addominale, gonfiore e miglioramento del transito). Inoltre, secondo Brenner e colleghi, studi futuri dovrebbero seguire i criteri ROMA II per il disegno di appropriati studi clinici controllati randomizzati (Brenner *et al*., 2009).

Prevenzione del cancro del colon

Lo sviluppo del cancro al colon è una delle più importanti cause di mortalità nei paesi industrializzati. E' ormai noto che il microbiota intestinale può influenzare la carcinogenesi, in quanto alcune specie di batteri che la costituiscono producono degli enzimi, quali glicosidasi, β-glucoronidasi, azotoreduttasi e nitroreduttasi, che trasformano i pre-carcinogeni in carcinogeni attivi, come le ammine aromatiche eterocicliche (Knasmuller *et al*., 2001). Diversi studi condotti su animali hanno mostrato che alcuni probiotici, come *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., possono proteggere da tale attività pro-carcinogenica attraverso vari meccanismi: inibizione della crescita dei batteri pro-carcinogenici, diminuzione dell'attività enzimatica pro-carcinogenica, legame e/o disattivazione di tali composti mutageni, carcinogeni, co-carcinogeni e pro-carcinogeni, produzione di sostanze ad azione antimutagena, riduzione dell'assorbimento intestinale dei composti mutageni, stimolazione della risposta immunitaria (Rolfe, 2000; Goossens *et al.*, 2003). Nell'uomo è stata osservata una diminuzione del livello degli enzimi pro-carcinogenici in seguito ad assunzione di alcuni ceppi di *Lactobacillus*, ma resta ancora da stabilire se questo effetto porti ad un'effettiva diminuzione del rischio di cancro al colon (Ling *et al*., 1994). Malgrado dunque vi siano i presupposti per considerare i probiotici potenzialmente utili nella prevenzione delle patologie neoplastiche, sull'uomo non esistono ancora evidenze sperimentali dirette.

Malattie epatiche

Il ruolo del microbiota nello sviluppo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) consiste nell'incremento dello stress ossidativo epatico causato da un aumento della concentrazione di etanolo ed LPS nel lume intestinale e conseguente rilascio di citochine infiammatorie nell'epitelio intestinale e macrofagi epatici. Questo comporta un danno dell'epitelio intestinale, che aumenta l'esposizione epatica alle tossine provenienti dall'intestino. La proliferazione batterica intestinale peggiora la malattia del fegato grasso nell'uomo, e pazienti obesi con la steatoepatite non alcolica (NASH) presentano una maggiore prevalenza di proliferazione batterica (Miele *et al*., 2009). Tale evidenza ha condotto a valutare l'utilizzo di probiotici per queste condizioni in esperimenti su animali, con risultati incoraggianti (Li *et al*., 2003).

Soggetti che assumono grandi quantita' di alcool presentano un'alterazione del microbiota intestinale, in particolare una riduzione dei Bifidobatteri e dei Lattobacilli. Nell'epatopatia alcolica, le interazioni fegato-intestino comprendono un aumento della permeabilità intestinale, endotossiemia, e secrezione del fattore di necrosi tumorale (TNF)-α. Confrontando alcolisti in terapia standard e terapia standard insieme a probiotici, Kirpich e colleghi hanno osservato un miglioramento dei livelli di aspartato aminotransferasi (AST) ed alanina transaminasi (ALT) nel gruppo trattato anche con probiotici. Inoltre, nel sottogruppo di alcolisti che presentavano epatopatia ben definita, il trattamento con probiotici ha contribuito ad un miglioramento di tutti i parametri epatici (Kirpich *et al*., 2008). Lata e colleghi hanno valutato l'effetto del ceppo *E. Coli* Nissle 1917 in pazienti cirrotici, osservando una tendenza alla riduzione del livello di endotossine nel sangue e una riduzione del punteggio di Child-Puge (Lata *et al*., 2007).

Studi passati avevano dimostrato che il livello dell'attività ureasica nelle feci di pazienti con encefalopatia epatica era inferiore in quelli trattati con lattobacilli insieme a lattulosio o neomicina rispetto a quelli trattati solo con quest'ultima (Loguercio *et al*., 1987). La riduzione dell'attività era associata con una riduzione

dei livelli ematici di ammoniaca ed un miglioramento del quadro clinico. Risultati clinici promettenti sono stati ottenuti in studi più recenti nei casi di enfalopatia di grado lieve e minimo (Bajaj *et al*., 2008; Liu *et al*., 2004; Loguercio *et al*., 1995; Malaguarnera *et al*., 2007).

Pancreatite acuta

Una analisi di precedenti studi su modelli animali ed umani ha portato alla conclusione che l'integrazione con probiotici è in grado di prevenire le complicanze infettive della pancreatite acuta (Capurso *et al*, 2008).

Stimolazione del sistema immunitario

Tra i diversi effetti benefici esercitati dai probiotici molto importante è la loro capacità di interazione con il sistema immunitario (Salminen *et al.,* 1998). Vi sono numerose evidenze che suggeriscono un'azione stimolante dei batteri lattici sulla risposta immunitaria sia innata sia acquisita, sulla funzione linfocitaria, sulla produzione di anticorpi e della citochine (Gill *et al.,* 2000; Perdigon *et al.,* 1999; Pessi *et al*., 2000). Numerosi studi hanno evidenziato che il trattamento con alcuni ceppi di probiotici è in grado di potenziare la risposta immunitaria antigene-specifica nei confronti di infezioni naturali e immunizzazioni attraverso la produzione di IgA, ovvero un gruppo di anticorpi che rappresentano un importante mezzo di difesa contro le infezioni locali, impedendo la colonizzazione da parte dei patogeni.

Prevenzione dell'ipercolesterolemia

Già da molto tempo è stata attribuita ai bifidobatteri e ad altri probiotici la capacità di diminuire la concentrazione di colesterolo nel sangue, così come quella di deconiugare e fermentare gli acidi biliari (de Roos e Katan, 2000). Infatti, Gilliland e colleghi, hanno notato che *Lb. acidophilus* è in grado di deconiugare gli acidi biliari in acidi liberi, che sono escreti dal tratto intestinale

più velocemente rispetto a quelli coniugati. Ciò porta a nuova sintesi di acidi biliari a partire dal colesterolo, causando una riduzione della concentrazione di colesterolo nel plasma. Inoltre, gli acidi grassi a catena corta, prodotti finali della fermentazione dei carboidrati nell'intestino da parte dei probiotici, inibiscono la sintesi del colesterolo da parte del fegato e portano ad una redistribuzione del colesterolo tra il fegato e il plasma (Gilliland *et al*., 1977). Altri possibili meccanismi sono l'assimilazione del colesterolo da parte dei probiotici e il legame di questa molecola alle pareti batteriche (Lovegrove *et al*., 2003). Altri studi, condotti sia sull'uomo sia su modelli animali, hanno mostrato un effetto da parte di alcuni probiotici anche nell'aumentare il colesterolo-HDL (Taranto *et al.*, 2000; Kiessling *et al*., 2002).

Altre condizioni cliniche

In pazienti con colite collagenosica, condizione che rientra nella categoria delle coliti microscopiche, la combinazione di *Lb. acidophilus* e *B. animalis* ha determinato un miglioramento nella frequenza di evacuazione intestinale e una riduzione dei giorni caratterizzati da feci liquide (Wildt *et al*., 2006). Risultati simili sono stati ottenuti in un precedente studio in aperto, nel quale è stato utilizzato *E. coli* Nissle 1917 (Tromm *et al*., 2004).

In pazienti sottoposti a terapia chemioterapica con 5-fluorouracile, l'integrazione con *Lb. rhamnosus GG* ha determinato una riduzione della diarrea ed un minor numero di ricoveri. Tuttavia, lo stesso gruppo di pazienti ha mostrato anche una tendenza verso un maggior numero di complicanze di natura neutropenica (Osterlund *et al*., 2007).

La diarrea nei pazienti affetti da HIV è presente nel 50-60 % dei casi nei paesi sviluppati, e in quasi il 100 % dei casi nei paesi in via di sviluppo (Rossit *et al*., 2009): il trattamento con probiotici è risultato essere efficace anche nel trattamento della diarrea cronica in pazienti affetti da AIDS (Saint-Marc *et al*., 1995).

Una recente metanalisi di studi controllati randomizzati ha confermato il significativo beneficio dell'integrazione con probiotici nella prevenzione dell'enterocolite necrotizzante in neonati prematuri (Deshpande *et al*., 2010).
Uno studio in aperto ha dimostrato anche i benefici ottenuti dalla somministrazione di *Lb. reuteri*, rispetto al simeticone, nel trattamento delle coliche del neonato: la durata del pianto giornaliero medio è risultata minore nel gruppo trattato con *Lb. reuteri* rispetto al gruppo di neonati trattati con simeticone (Savino et al., 2007).
Infine, secondo una recente metanalisi, la somministrazione di probiotici riduce il tasso di infezioni post-operatorie, la durata della terapia antibiotica necessaria, e la durata del ricovero post-operatorio di pazienti che hanno subito interventi di chirurgia addominale, ma la terapia con probiotici non è risultata però essere in grado di mortalità (Pitsouni *et al*., 2009).

Ceppi probiotici e preparazioni probiotiche

Affinché un microrganismo possa esser impiegato come probiotico in preparati farmaceutici o alimentari sono desiderabili determinate caratteristiche fisiologiche legate non solo all'effetto benefico esercitato sull'ospite ma anche ai fini pratici della produzione su larga scala.
Molte specie microbiche per talune loro proprietà hanno trovato impiego in vari settori industriali, quali quello del farmaco, quello dei presidi medico-chirurgici e, infine, quello dell'alimentazione umana e animale. Ovviamente per ognuno di essi l'impiego dei microrganismi è subordinato al rispetto di una serie di norme che tutelano la salute dei consumatori e, per talune applicazioni, all'assicurazione dell'efficacia. Nel settore alimentare, i microrganismi hanno trovato impiego nella produzione di ingredienti alimentari, in quella dei coadiuvanti tecnologici e nella produzione di alimenti fermentati, rispettando sempre le regole che governano la produzione e l'immissione in commercio degli alimenti nel caso in cui per le specie microbiche impiegate fosse possibile vantare una lunga tradizione d'uso, mentre per quelle che non presentano tale requisito viene richiesta una specifica

valutazione di sicurezza (regolamento CE 1829/2003). Un particolare e recente campo di applicazione dei microrganismi è quello della produzione di integratori alimentari. Da alcuni anni i microrganismi che vantano effetti benefici e che vengono commercializzati in forma diversa dagli alimenti, sono stati inclusi dal Ministero della Salute, tra gli integratori alimentari e conseguentemente soggetti al rispetto delle regole di questi particolari prodotti alimentari. Questa scelta ministeriale è stata rafforzata dalla pubblicazione della direttiva 2002/46/CE del 10 giugno 2002 , recepita in Italia con il DM 21 maggio 2004 n.169, che definisce gli integratori alimentari, come "prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta normale e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi effetto nutritivo o fisiologico, sia monocomposti che pluricomposti, in forme di dosaggio, vale a dire in forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale, flaconi a contagocce e altre forme simili, di liquidi o polveri destinati ad essere assunti in piccoli quantitativi unitari". In altre parole, gli integratori alimentari sono un complesso di prodotti il cui uso risponde all'obiettivo di migliorare il metabolismo e le funzioni fisiologiche dell'organismo attraverso un insieme di effetti aggiuntivi alle normali funzioni nutrizionali, tra gli integratori esistono anche quelli probiotici.

Lo scopo principale degli integratori alimentari a base di probiotici, venduti in forma di tavolette, polveri o sciroppi, è quello di ottenere una persistente colonizzazione nell'intestino durante il trattamento di diverse patologie, come alterazioni gastrointestinali dovute a trattamenti con antibiotici, disbiosi, malattie del fegato, costipazioni croniche, duodeniti croniche, ulcere peptiche, terapie con irradiamento (Tamime *et al.*, 1995).

In Italia esistono diversi preparati farmaceutici a differente composizione, nella tabella sottostante ne sono riportati alcuni a titolo di esempio (Tabella 1).

Tabella 1. Alcuni preparati farmaceutici a base di probiotici

Prodotto	**Composizione**
Bifilact	3 specie bifidobatteri + 2 ceppi *Lb. acidophilus*

Lactipan	*Lb. lactis* + *Lb. bulgaricus* + *Lb. acidophilus*
Fermenturto	*Lb. acidophilus* + *Lb. bulgaricus*
Infloran	*B. bifidum* + *Lb. acidophilus*
Flar	*Lb. acidophilus* + *Lb. lactis*
Bioflorin	*Enterococcus faecium*
Codex	*Saccharomyces boulardii*
Lacteol	*Lb. acidophilus*
Dicoflor	*Lattobacillus* GG (*Lb. rhamnosus*)
Enterogermina	Spore di *Bacillus subtilis*

Un altro integratore probiotico è il "*VSL–3*", un prodotto caratterizzato, rispetto alle molteplici preparazioni probiotiche presenti sul mercato, da una concentrazione di gran lunga superiore di batteri lattici, dell'ordine di 10^{12} batteri per grammo di prodotto e dal numero elevato di specie batteriche, precisamente nove, che esso contiene rispetto ai competitori (De Simone *et al.*, 1997) (TABELLA 2):

Tabella 2. Composizione del preparato VSL-3

Composizione di VSL-3

Microrganismo	**Quantità**
Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus	204 miliardi
Bifidobacteria (*B. brevis*, *B. infantis*, *B. longum*)	93 miliardi
Lactobacillus acidophilus	2 miliardi
Lactobacillus plantarum	220 milioni

Lactobacillus casei	220 milioni
Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus	300 milioni
Enterococcus faecium	30 milioni

La carica microbica di questi preparati è piuttosto variabile: da un contenuto microbico di 1-10 miliardi per grammo di prodotto tradizionale si passa a 300 miliardi per grammo dei prodotti di nuova generazione. Questo è un requisito importante, che dipende essenzialmente dalle caratteristiche tecnologiche dei batteri e dai processi produttivi impiegati (Pirovano, 1997).

Nonostante ciò, non tutte le specie possono essere trattate o prodotte alla stessa maniera: se relativamente semplice è il processo produttivo di *S. thermophilus*, più complesso è invece quello relativo ai microrganismi tipicamente intestinali come i bifidobatteri e *Lb. acidophilus*, che presentano esigenze particolari.

Il processo produttivo di un microrganismo implica una fase di fermentazione, seguita da quella di concentrazione e da una fase finale di essiccamento.

La fermentazione è effettuata in appositi fermentatori dove i diversi componenti del substrato vengono utilizzati per la crescita dei microrganismi. Lo sviluppo microbico avviene con il controllo di parametri quali il pH, la temperatura, la quantità di ossigeno, la velocità e il tipo di agitazione, il tempo di fermentazione ecc. Nella fase di concentrazione il brodo fermentato viene trasferito in un concentratore che separa la parte solida da quella liquida. Tra le tecniche di essiccamento, quella maggiormente adottata è la liofilizzazione, che consiste in una fase di congelamento cui segue la fase di essiccamento primario (sublimazione dell'acqua) e quella di essiccamento secondario. Durante il processo produttivo i batteri sono sottoposti a diversi stress, come quello osmotico e ossidativo durante la fase di fermentazione e di essiccamento, meccanico e ossidativo durante la fase di concentrazione, che incidono profondamente sulla resa del prodotto.

E' perciò fondamentale, dopo una corretta valutazione di questi fenomeni, adottare una tecnologia che sia in grado di limitare eventuali effetti negativi sul

ceppo batterico e sull'intero processo che, oltre a garantire che le caratteristiche peculiari di un determinato ceppo batterico siano mantenute costanti, risulti riproducibile e conveniente dal punto di vista economico e conduca all'ottenimento di un prodotto dalla carica batterica desiderata, con elevata shelf-life e ottimo standard qualitativo.

Ceppi probiotici ed alimenti probiotici

Descrizione di alimento funzionale

Il XX secolo è stato caratterizzato da continui progressi nel campo della scienza della nutrizione: la scoperta di sostanze nutritive, le linee guida per una sana alimentazione e il concetto di una dieta equilibrata, che hanno accompagnato l'evoluzione di questi progressi, inizialmente con la prerogativa di debellare la malnutrizione, in seguito, per tentare di limitare eccessi nell'uso di determinate sostanze dannose per la salute (Welsh, 1996). Oggi la scienza che si occupa di nutrizione è pronta ad affrontare nuove sfide, compresa quella legata alla diffusione dell' "Alimentazione Funzionale" (Ashwell, 2002). A causa di vari fattori, quali gli allarmi legati alle biotecnologie e la progressiva attitudine alla personalizzazione degli stili alimentari, i consumatori moderni hanno mostrato una crescente attenzione al rapporto dieta-salute e una maggiore consapevolezza della salubrità degli alimenti (Ural *et al.*, 2003; Caswell & Siny 2006; Marette *et al.* 2010). Una delle principali reazioni a queste tendenze evolutive è stata lo sviluppo di alimenti funzionali e l'introduzione di una grande quantità di prodotti etichettati con informazioni sulla nutrizione e la loro funzionalità (Katan & De Roos, 2004).

Lo scopo primario della dieta è fornire nutrienti sufficienti a soddisfare le esigenze nutrizionali della persona. La moderna scienza è andata oltre i concetti classici, ponendo la propria attenzione sull'identificazione dei componenti alimentari biologicamente attivi e potenzialmente in grado di ottimizzare il benessere fisico e mentale e di ridurre anche il rischio di contrarre malattie,

dunque, abbinati ad uno stile di vita sano, gli alimenti funzionali possono dare un contributo concreto alla salute e al benessere. Il termine alimento funzionale, introdotto in Giappone negli anni '80, si riferisce a prodotti alimentari o trasformati contenenti ingredienti che aiutano a migliorare specifiche funzioni corporee, oltre ad essere considerati nutrienti. Il Food and Nutrition Board dell'Istituto di Medicina americano (IOM/FNB,1994) ha definito gli alimenti funzionali "qualsiasi alimento o ingrediente alimentare che può fornire un beneficio per la salute al di là delle tradizionali sostanze nutritive in esso contenute". Questi alimenti definiti con il marchio Foods of Specified Health Use (FOSHU) sono:

- alimenti che in base ai suoi costituenti si presume abbiano un effetto positivo sulla salute umana
- alimenti in cui l'aggiunta o la rimozione di tali costituenti sia scientificamente valutata
- possono essere consumati come parte di una normale dieta
- sono e devono essere alimenti, non pillole, capsule o qualsiasi forma di supplemento dietetico, in quanto non hanno effetti terapeutici
- il loro ruolo riguardante la malattia consiste nel miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o la riduzione del rischio (non prevenzione) della malattia
- di essere un alimento convenzionale o di tutti i giorni

Proprietà degli Alimenti funzionali

In base all'impianto definitorio citato, possono essere considerati "alimenti funzionali" sia quelli tecnologicamente avanzati e migliorati, come ad esempio i prodotti arricchiti con acidi grassi polinsaturi (ω3 e ω6), quelli addizionati con sostanze biologicamente attive (steroli vegetali) o ancora quelli arricchiti con probiotici, sia quelli più convenzionali, come ad esempio il tè verde (per il contenuto di catechine) (Toschi *et al.*, 2000), l'aglio (per le sostanze idro e lipo-solubili che gli conferiscono proprietà anticancerogene e anticolesterolo) e l'olio

d'oliva (per i tocofenoli, i carotenoidi, le sostanze di origine fenolica e circa altri 200 componenti minori che lo costituiscono) (Cocchi, 2009). Questi gruppi di sostanze, a seconda delle proprietà intrinseche e/o aggiunte presenti negli alimenti, possono infatti contribuire al benessere dell'organismo con diverse modalità di azione: antiossidante attiva nella difesa da stress ossidativo, detossificante, antitumorale, antimicrobica e antivirale, antinfiammatoria, antiipertensiva, ipocolesterolemica e così via. Le Target Functions (funzioni bersaglio) su cui l'alimento funzionale deve esplicitare la propria azione, al fine di produrre effetti benefici sono:

- regolazione della crescita, dello sviluppo e della differenziazione cellulare
- regolazione del metabolismo basale
- mantenimento della struttura e funzionalità del DNA mediante protezione da specie ossidanti
- regolazione delle funzioni intestinali
- regolazione del sistema cardiovascolare

L'impianto regolamentare

Gli Alimenti Funzionali, rappresentano, sia sotto il profilo definitorio sia sotto quello della percezione del consumatore, un concetto molto ampio al quale non corrisponde una categoria di alimenti distinguibile dalle altre (Roberfroid, 2002; Ashwell, 2004).

Il concetto di "alimento funzionale", come detto in precedenza, nasce in Giappone negli anni '80, quando le autorità sanitarie del paese riconobbero la necessità di migliorare la qualità della vita che andava aumentando la sua durata e che produceva un numero crescente di anziani. Si svilupparono, dunque, alimenti specifici per favorire salute, benessere e riduzione del rischio di malattie. Conseguentemente nacque la necessità di creare un quadro normativo in grado di regolamentare il nuovo fenomeno e capace, allo stesso tempo, di tutelare i consumatori da affermazioni false e fuorvianti e di soddisfare le esigenze di

innovazione del nascente settore nelle fasi di sviluppo, marketing, e promozione dei prodotti, così il Ministero giapponese della salute organizzò un meeting su questi alimenti allo scopo di decidere come regolamentarli (Hue *et al*.,1997).
Si arrivò nel 1991 alla definizione dei FOSHU i quali ancora oggi necessitano di un'approvazione da parte del ministero della Salute e del Welfare giapponese, che viene concessa in seguito alla presentazione di evidenze esaustive e scientificamente fondate a sostegno delle proprietà di tali alimenti nell'ambito di una normale dieta.
In seguito al crescente interesse per questo argomento, l'Unione Europea ha realizzato un'azione concertata della Commissione Europea sulla Functional Food Science in Europe (FUFOSE). Il programma è stato coordinato dall'International Life Sciences Institute (ILSI) Europe, con l'obiettivo di stabilire e sviluppare un approccio scientificamente fondato sulle evidenze richieste a sostegno dello sviluppo di prodotti alimentari che possono avere effetti benefici su una specifica funzione biologica, migliorando lo stato di salute e il benessere di una persona e/o riducendo il rischio di malattia. Il progetto FUFOSE ha preso in esame sei aree scientifiche e salutistiche diverse: crescita, sviluppo e differenziazione cellulare, metabolismo basale, difese dai composti ossidanti, alimenti funzionali e sistema cardiovascolare, fisiologia e funzionalità gastrointestinale ed effetti degli alimenti sul comportamento e sul profilo psicologico. Il documento finale poi pubblicato sul British Journal of Nutrition, ha evidenziato come gli alimenti funzionali debbano comunque restare «alimenti», come tradizionalmente li conosciamo, e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Partendo da questo gli Stati membri dell'Unione Europea hanno applicato diverse interpretazioni e adottato diverse iniziative, come per esempio l'assunzione di linee guida e codici di comportamento come quello che troviamo nel Regno Unito sotto il nome di "Joint Health Claime Initiative" (JHIC), il tutto però seguendo una linea di pensiero comune basata sul fatto che queste indicazioni siano formulate per tutelare il consumatore, promuovere il commercio, incentivare lo sviluppo e l'innovazione della industria alimentare. In tutto ciò l'azione concertata dell'unione Europea sostiene lo sviluppo di due tipologie di health claims per gli alimenti funzionali:

- tipo A: si tratta di claims legati al "miglioramento di una funzione biologica" che fa riferimento a determinate attività fisiologiche, psicologiche e biologiche che vanno al di là di un normale e già accertato ruolo che quel prodotto svolge durante lo sviluppo, la crescita e in altre funzioni di un organismo.
- tipo B: si tratta di claims in questo caso legati alla "riduzione del rischio di malattia" che fa riferimento al consumo di un alimento o di un componente alimentare che potrebbe aiutare nella riduzione dell'eventualità di una malattia o di uno stato patologico, grazie alla presenza o no di particolari e specifici nutrienti.

Attualmente si sta andando oltre questa suddivisione soffermandosi sulla risoluzione di problemi relativi alla validazione, alla conferma scientifica dei claims e alla loro comunicazione al consumatore.

Infatti, con il Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Food (PASSCLAIM), si punta a stabilire criteri comuni per valutare la fondatezza scientifica degli Health Claims, fornendo un quadro normativo per la preparazione di dossier scientifici a sostegno di tali claims. Pertanto i claims relativi al "miglioramento di una funzione biologica" e "alla riduzione del rischio di malattia" devono far riferimento a determinati studi che utilizzino bio - indicatori debitamente identificati, caratterizzati e convalidati.

Alimenti probiotici

La matrice alimentare è considerata come uno dei principali fattori in grado di influenzare la colonizzazione dei microrganismi nel tratto gastrointestinale, e quindi può svolgere un ruolo importante nella buona riuscita della somministrazione dei probiotici con la dieta, sia nell'uomo, sia negli animali. Infatti, la matrice alimentare aiuta a proteggere i batteri dagli stress attraverso lo stomaco (valori di pH bassi, azione degli enzimi digestivi) e attraverso l'intestino (azione batteriostatica dei sali biliari). Inoltre, nella matrice alimentare possono essere contenuti altri ingredienti funzionali che possono interagire con i probiotici, in maniera specie-specifica, per migliorare la loro funzionalità.

Tradizionalmente, gli alimenti maggiormente utilizzati per il "delivery" (rilascio/trasporto) di probiotici nell'intestino dell'ospite sono stati i prodotti lattiero caseari fermentati come yogurt e latti fermentati, che rappresentano circa il 65% del mercato mondiale di alimenti funzionali (Agrawal, 2005). La sopravvivenza e la vitalità dei batteri probiotici, però, possono essere influenzate in maniera differente a seconda del processo produttivo, delle caratteristiche dell'alimento stesso e delle condizioni di conservazione.

Da un punto di vista normativo, deve essere riportata in etichetta la presenza del/i ceppo/i probiotico/i (Shah, 2007). La maggior parte delle legislazioni nazionali stabiliscono una carica minima (10^6-10^7 CFU/g o CFU/mL di alimento) di batteri probiotici vitali considerando un consumo giornaliero di 100 g o 100 mL di prodotto.

Nonostante i prodotti lattiero-caseari siano quelli comunemente utilizzati per il "delivery" di probiotici, negli ultimi anni si è assistito alla commercializzazione anche di prodotti non lattiero-caseari (cioccolato, cereali, succhi) addizionati di probiotici. Inoltre c'è la tendenza di utilizzare i probiotici anche in formulazioni non connesse agli alimenti, come ad esempio in capsule o in preparati liofilizzati, che potrebbe portare ad una riduzione dell'efficacia funzionale a causa dell'esclusione del potenziale effetto sinergico del cibo.

In entrambi i casi preservare la vitalità dei probiotici fino al raggiungimento del loro sito di azione ricopre un'importanza cruciale.

Yogurt

Lo yogurt rappresenta uno dei mezzi più efficaci per veicolare batteri probiotici nell'intestino. In commercio sono disponibili moltissimi tipi di yogurt contenenti ceppi probiotici commerciali in grado di conferire benefici per la salute, con elevata accettabilità da parte dei consumatori.

L'aspetto più importante che deve essere esaminato è la vitalità dei batteri probiotici nel corso della shelf-life del prodotto. La sopravvivenza dei batteri nei prodotti lattiero-caseari fermentati dipende dal ceppo batterico utilizzato, dall'interazione tra la coltura starter ed i ceppi probiotici, le condizioni culturali, l'acidità del prodotto, i solidi totali del latte, la disponibilità di nutrienti, la

concentrazione di zuccheri (pressione osmotica), l'ossigeno disciolto, la temperatura di conservazione. Tra questi, quello cruciale risulta essere l'interazione tra i batteri starter dello yogurt (*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* e *S. thermophilus*) ed i ceppi probiotici che può risultare in effetti sinergici o antagonistici in seguito a possibili meccanismi di competizione, commensalismo o amensalismo tra di loro.

Alcuni batteri, infatti, possono produrre batteriocine, perossido d'idrogeno o altri metaboliti come amine ed acido lattico che possono interferire con la sopravvivenza dei ceppi probiotici presenti nel prodotto finale (Joseph *et al*., 1998; Lankaputhra *et al*., 1996).

I probiotici veicolati con lo yogurt non devono necessariamente intervenire nel processo di fermentazione. Come riportato in moltissimi studi, sono necessarie circa 10^8-10^9 cellule batteriche vitali al momento del consumo per apportare benefici all'ospite: questo significa che i batteri probiotici devono restare vitali nel prodotto fino al momento del consumo e conservare la loro fisiologica funzionalità.

Strategie promettenti per incrementare la stabilità dei probiotici consistono nel miglioramento della tolleranza agli stress esterni attraverso il pre-condizionamento dei probiotici a livelli di stress sub-letali durante il processo produttivo (Adolfsson *et al*., 2004). La presenza di ossigeno è un altro fattore dannoso per gli anaerobi stretti come i Bifidobatteri. Pertanto, l'interesse è quello di incrementare la sopravvivenza di batteri probiotici in substrati ricchi acidi e ricchi di ossigeno. Un approccio comunemente usato a tal proposito da molti ricercatori (Doleyres & Lacroix, 2005). è l'incapsulamento. I esistono diversi protocolli di incapsulamento, ma l'intrappolamento in microcapsule di gel è risultato essere molto efficace nell'incrementare la stabilità dei probiotici durante la conservazione in molti alimenti, in particolare lo yogurt (Sultana *et al*., 2000).

Anche l'aggiunta di amido Hi-Maize, inulina e fruttoligosaccaridi contribuiscono al miglioramento della vitalità di batteri probiotici (*Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp) negli yogurt (Capela *et al*., 2006). Un altro aspetto importante riguarda il confezionamento dei prodotti lattiero-caseari contenenti probiotici: infatti i materiali utilizzati e le condizioni di conservazione

rappresentano i fattori più importanti che influenzano la qualità di tali prodotti. Il fatto che i bifidobatteri sono generalmente più sensibili all'ossigeno rispetto a *Lb. acidophilus* rappresenta un problema, dal momento che la maggior parte dei prodotti lattiero-caseari contenenti probiotici sono disponibili in confezioni in plastica che per natura possiede una elevata permeabilità all'ossigeno. Quindi bisognerebbe prendere in considerazione l'uso di sistemi per il confezionamento adatti a preservare la vitalità dei probiotici, come il packaging attivo con sostanze che adsorbono l'ossigeno, materiali come il polistirene ad alta barriera all'ossigeno, materiali con struttura multistrato a bassissima permeabilità ai gas (HIPS/EVOH/PE) e film plastici con elevata attività barriera all'ossigeno.

Formaggi

Per essere riconosciuto come probiotico, in un formaggio la quantità e la qualità di microorganismi probiotici aggiunti devono essere conservate in tutte le fasi del processo produttivo, nonostante le difficoltà che vengono incontrate, partendo dalla possibile competizione tra le colture starter e quelle probiotiche, fino alla necessità di veicolare in forma vitale i probiotici nel tratto gastrointestinale. Molti fattori, sia per quanto riguarda la composizione sia il processo produttivo, influenzano in modo significativo la vitalità dei probiotici nel formaggio, tra cui il tipo e la quantità dell'inoculo del ceppo probiotico, l'aggiunta di aromi, la competizione col microbiota autoctono, l'eventuale presenza di batteriocine o altri composti antimicrobici, il pH, il potenziale redox, la temperatura di conservazione, il sale e l'attività dell'acqua, i materiali utilizzati per il confezionamento ed altri fattori.

Attualmente sono in fase di sviluppo molti formaggi probiotici e dati scientifici dimostrano che la coltura probiotica è ancora presente con cariche sufficientemente elevate per essere commercializzati come tali. La microincapsulazione sembra offrire una valida alternativa tecnologica per impiego nell'industria casearia (Borgogna *et al*., 2010), determinando però un aumento del costo finale (Burgain *et al*., 2011). Sulla base sia del livello di batteri probiotici necessari per fornire un beneficio per la salute, sia della sopravvivenza mostrata

durante la simulazione di un transito gastrointestinale simulato, dovrebbe essere possibile ridurre la quantità che deve essere ingerito con il formaggio fino ad un fattore di 10^3 rispetto ad altri latticini fermentati o se consumato come integrazione (Ortakci *et al*., 2012). La gamma di formaggi probiotici disponibili aumenterà in modo significativo nel prossimo futuro, anche se molti di questi non saranno venduti sul mercato, nonostante ulteriori vantaggi quali il contenuto inferiore di grassi o colesterolo, perché non avranno caratteristiche sensoriali e reologiche desiderabili.

I microrganismi probiotici maggiormente inclusi nei formaggi sono *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., le cui caratteristiche fisiologiche si adattano bene a questa matrice. Naturalmente, batteri diversi da questi possono svolgere un ruolo essenziale nei formaggi probiotici (El Soda and Awad, 2014).

È importante sottolineare che una problematica rilevante per quanto riguarda l'inclusione di ceppi probiotici all'interno dei formaggi è rappresentata dalla produzione di biomassa su larga scala (Forssten *et al*., 2011). A prescindere da ciò, le colture probiotiche devono essere stabili, indipendentemente dal fatto che siano utilizzate come coltura starter, integratore probiotico o culture aggiuntive. Una delle comuni tendenze nella ricerca avente come oggetto i formaggi consiste nella selezione di ceppi starter e non-starter e determinare se essi potrebbero avere potenziali benefici per la salute. E' stata valutata la sopravvivenza del microbiota autoctono di campioni ottenuti durante la produzione del Pecorino di Carmasciano utilizzando un transito gastrointestinale simulato in vitro: essa è risultata essere, oltre che ceppo-specifica, fortemente influenzata dalle condizioni sperimentali, cioè alcuni ceppi hanno mostrato una sopravvivenza accettabile se risospese in latte scremato ma non nel latte pecora e viceversa. Dunque, secondo i dati, un grammo di Pecorino di Carmasciano fresco potrebbe veicolare nel colon umano circa la stessa quantità di batteri lattici vitali di una bevanda a base di probiotici. Anche se non è stato stabilito che i lattobacilli introdotti con il Pecorino possano esercitare effetti benefici sulla salute dell'ospite, l'impatto salutistico di batteri lattici autoctoni nei prodotti a fermentazione naturale ha un ampio consenso nella letteratura corrente (Ricciardi *et al*., 2014).

La maggior parte dei ceppi probiotici derivano dal tratto gastrointestinale (GIT) umano. L'uso di tali ceppi potrebbe rappresentare un handicap per la produzione del formaggio dal momento che è difficile ottenere formaggi con proprietà peculiari e genuine quando si aggiungono grandi quantità di culture aggiuntive. I ceppi di origine gastrointestinale sono comunemente sensibili all'ossigeno e presentano esigenze nutrizionali complesse: questo è uno dei motivi per cui per un nuovo ceppo è indispensabile valutarne la sopravvivenza quando aggiunto durante il processo di fabbricazione del formaggio e anche verificarne gli effetti sulle macromolecole in esso contenute (carboidrati, proteine e lipidi). E' stata osservata una discreta sopravvivenza di ceppi probiotici aggiunti in fiocchi di latte dopo simulazione del transito gastrointestinale, nonché la generazione di peptidi potenzialmente antiossidanti ed l'attività anti-listeria (Abadìa-Garcìa *et al*., 2013).
Nonostante possano essere selezionati ceppi ossigeno-tolleranti, acido-tolleranti, e resistenti ai sali biliari, deve sempre essere tenuto in considerazione che uno degli aspetti più importanti, dal punto di vista tecnologico, è la capacità di tali ceppi di sviluppare buone proprietà organolettiche senza modificare la struttura e/o il sapore del prodotto finale. È chiaro che molte delle proprietà sono ceppo-specifiche, ma le condizioni di trasformazione e di conservazione industriali a lungo termine può influenzarle. Pertanto dovrebbero essere prese in considerazione proprietà funzionali e tecnologicamente rilevanti (da Cruz *et al*., 2009).
I livelli di attività dell'acqua (a_w) contribuiscono al controllo dell'attività metabolica e moltiplicazione batterica. Valori elevati dovrebbero mantenere costante la carica dei ceppi probiotici almeno per quanto riguarda i formaggi freschi o a breve stagionatura. Nel corso della stagionatura, la perdita d'acqua per evaporazione, la fase di salatura, e l'idrolisi delle proteine e trigliceridi causa un calo dell'a_w. La soluzione per controllare la perdita di umidità è di solito l'aumento dell'umidità relativa nelle camere di stagionatura, o l'imballo in cera o plastica. Inoltre, la mancanza di omogeneità potrebbe essere un problema in quanto a diverse profondità del formaggio si ritrovano diversi valori di a_w. In generale, formaggi a pasta dura e semi-dura mostrano valori più alti verso il centro, mentre nel formaggio cheddar non si osserva alcuna perdita di umidità e

variazione nel valore di a_w poiché il sale è distribuito uniformemente nel formaggio, ed è sottovuoto. La maggior parte dei formaggi probiotici sono protetti da un apposito involucro per prevenire la perdita di umidità; questo però non esclude affatto l'obbligo di analizzare sistematicamente questi parametri per i diversi tipi di formaggi probiotici presenti sul mercato.

Un problema rilevante per i formaggi probiotici è rappresentato dall'elevato contenuto di grassi e di sale che caratterizza molti di essi, pertanto la dose giornaliera raccomandata dovrebbe non essere eccessiva. La concentrazione di probiotici nei formaggi, di conseguenza, dovrebbe essere di circa 4-5 volte superiore a quella di altri prodotti lattiero-caseari fermentati come lo yogurt. Tuttavia, questo non vale per i formaggi freschi come i fiocchi di latte, in quanto presentano un basso contenuto di grassi e di sale e di conseguenza l'assunzione giornaliera può essere maggiore. Quindi i formaggi freschi rappresentano "vettori" ad alto potenziale nel "delivery" di probiotici. Thage e colleghi, analizzando i profili aromatici di formaggi magri e semiduri realizzati con l'aggiunta di *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (ceppi CHCC 2115, 4256 e 5583), hanno osservato che la riduzione del contenuto di grassi non ha influenzato la carica di ceppi di Lactobacillus (Thage *et al*., 2005).

Una delle ultime tendenze è quella di aggiungere sia prebiotici che probiotici in formaggi freschi (i cosiddetti formaggi simbiotici). Nel Fior di latte è stato utilizzato un rivestimento edibile di alginato di sodio come vettore di un probiotico (*Lb. rhamnosus*) e fruttoligosaccaridi (FOS). La combinazione ha migliorato il sapore del prodotto finale, estendendo la sua durata di conservazione. L'aggiunta di FOS e inulina non ha influenzato la crescita e la vitalità di *Lb. casei* 01 e *B. lactis* B94 durante la produzione, tuttavia hanno generato un miglioramento del profilo degli acidi grassi liberi (Angiolillo *et al*., 2014)

Gelati e prodotti surgelati

Anche i gelati e desserts surgelati rappresentano matrici alimentari adatte per veicolare batteri probiotici, grazie alla bassa temperatura di conservazione e a minori rischi di variazioni di temperatura che portano ad una maggiore vitalità dei

probiotici al momento del consumo, con il vantaggio di risultare graditi da consumatori di ogni età e livello sociale (Cruz *et al*., 2009).

Lo sviluppo di gelati contenenti batteri probiotici richiede il soddisfacimento di alcuni requisiti tecnologicamente intrinseci legati alla loro lavorazione, e occorrerebbe anche confermare se dopo lunghi periodi di conservazione i fermenti lattici conferiscono gli stessi benefici per la salute, come osservato in alimenti con shelf-life più brevi e che richiedono temperature di conservazione più alte (come yogurt e latti fermentati).

I probiotici aggiunti in prodotti surgelati hanno dimostrato una migliore vitalità durante l'intera shelf-life. Heenan e colleghi hanno osservato un leggero incremento nella concentrazione di Bifidobatteri durante la produzione di dessert surgelati a base di soia, attribuito alla rottura delle catene batteriche in seguito alla zangolatura meccanica durante il congelamento. E' stato anche osservato un decremento nella vitalità di alcune specie probiotiche durante la produzione ed il congelamento, a causa del danno cellulare provocato dal congelamento e scongelamento.

Gli stress meccanici provocati dalla miscelazione e l'aggiunta di ossigeno al composto durante la produzione possono indurre una riduzione della vitalità e di conseguenza anche un effetto negativo sull'efficacia dei probiotici nei prodotti surgelati dopo l'ingestione. Come riportato da Akin e colleghi, l'aggiunta di inulina ha determinato un incremento della vitalità di *Lb. acidophilus* e *B. lactis* , e che il grado di vitalità variava in base al livello di zucchero nel gelato (Akin *et al*., 2007). Di Criscio e colleghi hanno dimostrato in gelati sperimentali preparati sia con batteri probiotici, sia con inulina, e sia con una combinazione di questi, sono stati preservati i batteri probiotici, con cariche di batteri lattici vitali dopo il congelamento intorno al minimo richiesto per ottenere gli effetti probiotici (Di Criscio *et al*., 2010).

Bevande a base di latte

In commercio sono disponibili diverse bevande a base di latte fermentato, e tra queste la più popolare è Yakult©, che contiene circa 10^{10} cellule di un ceppo probiotico, il *Lb. casei Shirota* (LcS).

Secondo la letteratura, l'aggiunta al latte di siero dolce, idrolizzato di caseina e proteine del latte influenza la stabilità microbiologica di bevande a base di latte fermentato contenenti i ceppi probiotici *Lb. acidophilus* e *Lb. rhamnosus* in presenza o meno di *S. thermophilus* (Oliveira *et al*., 2001). L'aggiunta al latte di germi di soia in polvere e di *L. reuteri* protegge quest'ultimo dalla tossicità dei sali biliari nel piccolo intestino, probabilmente grazie all'azione di isoflavoni rilasciati grazie all'attività del ceppo microbico stesso (De Boever *et al*., 2001). La vitalità di *Bifidobacterium BB-12* in latte di capra fermentato, invece, può essere influenzata in maniera significativa durante la conservazione refrigerata dall'aggiunta di proteine del siero (Martin-Diana *et al*., 2003). Inoltre, il substrato alimentare sembra essere anche in grado di influenzare la funzionalità dei probiotici: infatti, secondo Ranadheera *et al*., la produzione di citochine *in vitro* viene influenzata dal tipo di latte (vacca o capra) durante la fermentazione con *Lb. acidophilus, Lb. gasseri, Propionibacterium jensenii* 702 e *B. lactis BB-12* (Ranadheera *et al*., 2007).

CAPITOLO 3

PROBIOTICI E COLONIZZAZIONE DEL TRATTO INTESTINALE

Nell'ambito della probiosi prioritario appare l'obiettivo volto ad ottenere una ottimale colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte di microrganismi non patogeni che possono avere effetti benefici sulla salute dell'ospite, quali i microrganismi probiotici. Spesso, un indice per valutare l'ampia colonizzazione intestinale nell'individuo è la sopravvivenza dei probiotici nelle feci. A tal proposito, Donnet-Hughes e colleghi hanno dimostrato che il ceppo *Lb. johnsonii* La1 è in grado di sopravvivere al passaggio intestinale e si ritrova nelle feci degli individui cui era stato somministrato (Donnet-Hughes *et al.*, 1999).
L'assunzione di probiotici può avvenire attraverso il ricorso a preparazioni farmaceutiche o mediante l'ingestione di alimenti in possesso di una adeguata quantità di microrganismi probiotici. Sulla base di quest'ultima premessa, appare opportuno considerare attentamente gli eventi che accompagnano il processo di assunzione e assimilazione degli alimenti durante il complesso passaggio gastro intestinale

Fenomeni correlati all'assunzione ed assimilazione di alimenti

Il corretto processo digestivo degli alimenti necessita che i differenti ambienti del tratto gastro-enterico siano in possesso di peculiari caratteristiche chimico-fisiche dettate da una serie di complessi meccanismi di secrezioni, basti pensare a quella gastrica e pancreatica. Condizioni che, se da un lato risultano fondamentali per la corretta assimilazione dei nutrienti introdotti con gli alimenti, dall'altro rappresenta una condizione di stress, più o meno elevata, per i microrganismi che accompagnano il bolo alimentare.

Fisiologia dell'apparato gastrointestinale

L'apparato digerente provvede a rifornire continuamente l'organismo di acqua, elettroliti e sostanze nutritive. Questo richiede la progressione del cibo lungo il canale alimentare, la secrezione di succhi digestivi e la digestione del cibo, l'assorbimento dei prodotti della digestione, dell'acqua e dei vari elettroliti, la circolazione del sangue attraverso l'apparato gastrointestinale per veicolare nelle sedi di utilizzazione le sostanze assorbite, ed infine il controllo di tutte queste funzioni da parte del sistema nervoso e di quello ormonale.

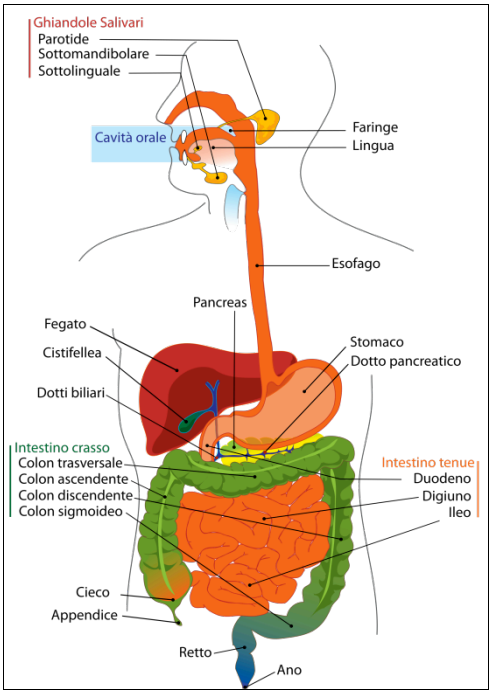


Figura 1 Apparato digerente (Guyton & Hall, 2006)

La figura 1 riporta uno schema dell'apparato gastrointestinale, composto da un tubo digerente ed organi accessori (ghiandole esocrine, pancreas esocrino, sistema biliare). Ciascun componente è adattato alle sue specifiche funzioni: l'esofago provvede al semplice passaggio del materiale alimentare, lo stomaco è deputato al deposito temporaneo del bolo alimentare, e l'intestino tenue provvede alla digestione e all'assorbimento.

I movimenti del tubo gastrointestinale

I movimenti dell'apparato digerente sono fondamentalmente di due tipi: movimenti di propulsione, che fanno avanzare il materiale alimentare nel tubo digerente ad una velocità idonea per i processi della digestione e dell'assorbimento, e movimenti di rimescolamento, i quali provvedono a rimescolare continuamente il contenuto gastrointestinale.

La peristalsi è il movimento propulsivo di base del tubo gastrointestinale, come è mostrato nella figura 2. La peristalsi si verifica non solo nel tubo gastrointestinale (esofago, stomaco, intestino crasso e tenue), ma anche nei dotti biliari, in altri dotti ghiandolari dell'organismo, negli ureteri ed in molti altri canali del corpo forniti di muscolatura liscia; nell'apparato digerente, lo stimolo alla peristalsi deriva dalla distensione della parete: se in qualsiasi parte del tubo gastrointestinale si accumula una certa quantità di materiale, la distensione della parete che ne deriva stimola la comparsa, 2-3 cm a monte di questo punto, di un anello di contrazione che stimola il movimento peristaltico.

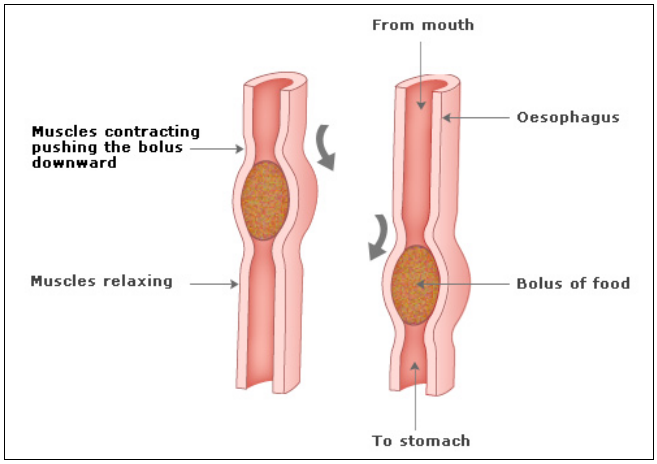


Figura 2 Peristalsi: lungo il canale alimentare si forma un anello di contrazione che poi si propaga in avanti, spingendo il materiale che si trova di fronte a tale anello.

I movimenti di rimescolamento, che riguardano l'intestino tenue e crasso, hanno invece caratteristiche diverse nelle differenti parti del tubo digerente. In alcune di esse sono le stesse contrazioni peristaltiche a causare in massima parte il rimescolamento, soprattutto quando la progressione del contenuto intestinale è

bloccata da uno sfintere: in questo caso un'onda peristaltica può solo produrre un suo rimescolamento anziché spingerlo in avanti. Altre volte contrazioni costrittive locali interessano il tubo digerente ad intervalli regolari di pochi centimetri, durano solo pochi secondi e vengono poi sostituite da altre contrazioni simili nei tratti di intestino interposti a quelli che si erano contratti, denominate contrazioni di segmentazione. In tal modo il contenuto intestinale viene più volte frammentato e rimescolato

Le funzioni secretorie dell'apparato gastrointestinale

Lungo tutto il tubo digerente sono disseminate ghiandole la cui attività provvede a due funzioni primarie: alla secrezione di enzimi digestivi a vari livelli dal cavo orale fino all'estremità ileale, e alla secrezione di muco con azione lubrificante e protettiva dell'intero tubo digerente. I meccanismi di stimolazione delle ghiandole dell'apparato digerente sono essenzialmente di tre tipi:

- Azione meccanica del materiale alimentare presente in un determinato segmento del canale digerente, che provoca di solito nelle ghiandole di quella regione, e spesso di quelle limitrofe, una certa secrezione di succhi digestivi. La stimolazione diretta per contatto tra il materiale alimentare e le cellule ghiandolari superficiali attiva anche il sistema nervoso enterico della parete del tubo digerente: i riflessi nervosi evocati in seguito a stimoli tattili, chimici e alla distensione della parete, promuovono la secrezione ghiandolare.
- Regolazione da parte del sistema nervoso autonomo, parasimpatico e simpatico.
    - ✓ La stimolazione dei nervi parasimpatici provoca quasi sempre un aumento dell'attività secretoria delle ghiandole, in particolare per le ghiandole dei segmenti prossimali del canale digerente innervati dal vago e da altri nervi cranici con fibre parasimpatiche (ghiandole salivari, ghiandole esofagee e gastriche, pancreas, ghiandole del Brunner nel duodeno). Nel resto dell'intestino tenue

e nei primi due terzi del crasso la secrezione si attua prevalentemente in risposta a stimoli nervosi locali ed a stimoli ormonali.

- ✓ La stimolazione del simpatico può determinare un lieve o moderato aumento dell'attività secretoria, ma anche costrizione dei vasi che irrorano le ghiandole, pertanto l'effetto da esso indotto può essere duplice. Ad esempio, la sola stimolazione simpatica di solito provoca un lieve aumento della secrezione, ma se il simpatico viene stimolato nel corso di un'abbondante secrezione promossa dal parasimpatico o da fattori ormonali, questa subisce di solito una diminuzione a causa della riduzione dell'irrorazione sanguigna.

- Regolazione del volume e delle caratteristiche delle secrezioni da parte di vari ormoni gastrointestinali, di natura polipeptidica, secreti in risposta alla presenza di sostanze alimentari nel lume gastrointestinale. Questo tipo di stimolazione interviene per incrementare la secrezione del succo gastrico e del succo pancreatico, quando le sostanze alimentari arrivano rispettivamente nello stomaco e nel duodeno. Inoltre, la stimolazione ormonale sulle pareti della cistifellea induce quest'ultima a riversare il suo contenuto di bile nel duodeno.

La secrezione salivare

La secrezione di saliva da parte delle ghiandole paratiroidi, sottomascellari, sottolinguali e da numerose piccole ghiandole buccali, varia tra 800 e 1500 ml al giorno, con un ritmo di salivazione continua di circa 0.5 ml/min in condizioni basali (tabella 3)

Tabella 3 Secrezione giornaliera dei diversi succhi digestivi (in ml) (Guyton & Hall, 2006)

	Volume (ml al giorno)	pH
Saliva	1000	6,0-7,0
Succo gastrico	1500	1,0-3,5
Succo pancreatico	1000	8,0-8,3
Bile	1000	7,8
Succo enterico	1800	7,5-8,0
Secrezione ghiand. di Brunner	200	8,0-8,9
Secrezione del crasso	200	7,8-8,0
Totale	6700	

La saliva è composta principalmente da due tipi di secrezioni, una sierosa contenente la ptialina (una α-amilasi) che digerisce gli amidi, ed una secrezione mucosa contenente mucina, che protegge e lubrifica le superfici epiteliali. Il pH della saliva è compreso tra 6.0 e 7.0, ovvero valori che favoriscono l'azione digestiva della ptialina. Inoltre la saliva contiene una elevata concentrazione di ioni potassio e bicarbonato, ed una ridotta concentrazione di ioni sodio e cloro rispetto al plasma. La secrezione della saliva è importante per mantenere in buone condizioni i tessuti della bocca, la quale è sottoposta ad un carico di batteri in grado di provocare lesioni distruttive ai tessuti buccali o di causare carie dentali. La saliva previene questi danni portando via continuamente, attraverso il flusso, i batteri stessi ed i residui alimentari che costituiscono il loro nutrimento, attraverso ioni tiocianato ed enzimi proteolitici contenuti in essa e con azione battericida. Gli enzimi proteolitici, tra i quali di particolare rilevanza è il lisozima, attaccano i batteri, favoriscono l'ingresso degli ioni tiocianato all'interno di essi dove viene espletato il loro effetto battericida, e digeriscono residui alimentari allontanando così il supporto nutritivo dei batteri. Inoltre nella saliva sono contenuti anche anticorpi (appartenenti alla classe IgA) capaci di distruggere i batteri della bocca.

La secrezione gastrica

La mucosa gastrica possiede due diversi tipi di ghiandole tubulari, le ghiandole gastriche o oxintiche e le ghiandole piloriche, oltre a cellule che secernono muco sparse su tutta la superficie dello stomaco. Le ghiandole oxintiche secernono acido cloridrico, pepsinogeno, fattore intrinseco e muco, mentre le ghiandole

piloriche secernono prevalentemente muco, ma anche pepsinogeno e l'ormone gastrina.

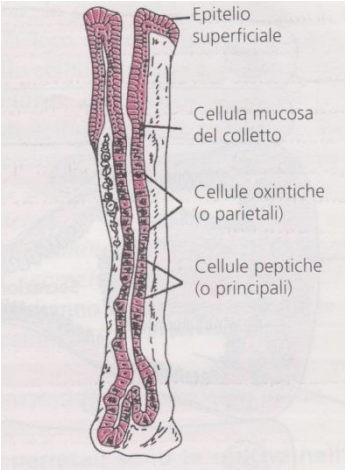


Figura 3 Ghiandola oxintica (Guyton & Hall, 2006)

una ghiandola oxintica è costituita da tre differenti tipi di cellule (figura 3),: *cellule mucose del colletto*, che producono muco ma anche pepsinogeno, *cellule peptiche (o principali)* che producono grandi quantità di pepsinogeno, e *cellule parietali o oxintiche* che producono acido cloridrico e fattore intrinseco.

Le cellule parietali secernono una soluzione di HCl 160 mmol/L, avente un pH di circa 0,8, corrispondente ad una concentrazione di idrogenioni circa 3 milioni di volte superiore a quella del sangue arterioso. Tale secrezione è sotto un controllo continuo da parte di fattori endocrini (gastrina) e nervosi. Inoltre secernono anche il fattore intrinseco, essenziale per l'assorbimento di vitamina B_{12} a livello dell'ileo. Le cellule peptiche e quelle della mucosa secernono diversi tipi di pepsinogeno aventi però essenzialmente la stessa funzione. Tale secrezione è fortemente influenzata dall'acetilcolina liberata da terminazioni del nervo vago o dal plesso enterico locale e dalla quantità di acido presente nello stomaco. Le molecole di pepsinogeno (PM 42.500) appena rilasciate sono inattive, ma appena entrano in contatto con l'acido cloridrico vengono subito scisse e convertite in pepsina attiva (PM 35.000), la quale contribuisce ulteriormente all'attivazione di ulteriore pepsinogeno. La pepsina è un enzima proteolitico che lavora ad un pH ottimale pari a 1,8-3,5 e che risulta scarsamente attivo in presenza di valori di pH

superiori a 5. Pertanto per la digestione gastrica delle proteine la secrezione di HCl ha un'importanza pari a quella della secrezione di pepsina.

Le ghiandole piloriche hanno una struttura simile a quelle oxintiche: sono quasi completamente prive di cellule principali e parietali, e possiedono molte cellule mucose simili alle cellule del colletto presenti nelle ghiandole oxintiche. Queste cellule secernono una piccola quantità di pepsinogeno ed una grande quantità di muco che protegge la parete gastrica dall'azione degli enzimi digestivi. Inoltre le ghiandole piloriche producono la *gastrina*, un ormone importante nella modulazione della secrezione gastrica, liberata nel succo gastrico dalle cellule gastriniche delle ghiandole piloriche quando queste vengono stimolate direttamente da pasti ricchi di carne o di altri cibi contenenti proteine.

Le cellule mucose interposte tra le ghiandole secernono grandi quantità di muco molto più vischioso dei precedenti, in grado di formare uno scudo protettivo per la parete gastrica avente uno spessore in molti casi di oltre 1 mm, e avente un pH alcalino, permettendo così alla parete gastrica di non essere esposta direttamente, in condizioni normali, alle secrezioni acide proteolitiche dello stomaco stesso.

Quando il pH del succo gastrico scende al di sotto del valore di 3,0, si attua una inibizione con un meccanismo a feedback dipendente sia dal blocco del processo stesso di secrezione della gastrina, sia da riflessi inibitori, evocati dalla presenza dell'acido stesso e che bloccano la secrezione gastrica. Questo meccanismo è importante sia perché impedisce la produzione di un succo gastrico eccessivamente acido che provocherebbe ulcerazioni peptiche, sia perché mantiene il pH gastrico ad un livello ottimale (circa 3,0) per l'attività degli enzimi peptici nel processo digestivo.

La secrezione gastrica si attua in tre fasi:

- una fase cefalica, responsabile di circa 1/5 della secrezione normalmente connessa con un pasto. Tale fase inizia prima ancora che il cibo entri nello stomaco e dipende dall'odore, dalla vista, dal gusto o dal ricordo del cibo, pertanto la sua attivazione è proporzionale all'appetito;
- una fase gastrica, responsabile di almeno il 70% della secrezione gastrica connessa con un pasto. Questa fase inizia quando gli alimenti arrivano nello stomaco, inducendo riflessi nervosi ed il meccanismo della gastrina;

- una fase intestinale, responsabile della secrezione di piccole quantità di succo gastrico. Questa fase è indotta dalla presenza del chimo specialmente nel duodeno, che induce, in seguito sia a stimoli meccanici (distensione della parete) sia chimici, alla secrezione di piccole quantità di gastrina da parte della mucosa duodenale.

La presenza del chimo nell'intestino, tuttavia, determina prevalentemente una inibizione della secrezione gastrica durante la fase gastrica della stessa. Questo avviene sia a causa di riflessi enterogastrici indotti dalla distensione della parete del tenue, sia dalla presenza di acido, prodotti della scissione proteica, liquidi ad osmolarità troppo alta o troppo bassa e stati di irritazione della mucosa, che inducono la liberazione di ormoni intestinali tra i quali la secretina, che controlla la secrezione pancreatica ma soprattutto deprime la secrezione gastrica.

Quando l'attività digestiva è scarsa o completamente assente, lo stomaco produce pochi ml di succo gastrico all'ora, di tipo prevalentemente non oxintico, pertanto costituito da muco, pochissima pepsina e pochissimo acido. Però, in presenza di forti stimoli emozionali, la secrezione di succo gastrico in questa fase aumenta a 50 ml/h, ed aumenta anche la concentrazione di acido e di enzimi peptici con modalità molto simile a quella alla base della fase cefalica della secrezione che si attua all'inizio di un pasto.

La secrezione pancreatica

Il pancreas è una grossa ghiandola che presenta una struttura quasi uguale a quella delle ghiandole salivari. È responsabile della produzione non solo di insulina, ma anche di enzimi digestivi da parte degli acini pancreatici, mentre le cellule epiteliali dei piccoli e grandi dotti che si dipartono dagli acini secernono ioni bicarbonato ed acqua. Questi secreti, rilasciati prevalentemente quando il chimo è presente nelle porzioni prossimali del tenue, si uniscono a formare un succo che passa attraverso dotti più grandi fino ad arrivare al dotto pancreatico principale (dotto di Wirsung) che si unisce al dotto epatico (coledoco) prima di svuotarsi nel duodeno.

Il succo pancreatico quindi contiene enzimi che provvedono alla digestione di proteine, carboidrati e lipidi, e grandi quantità di ioni bicarbonato che neutralizzano l'acidità del chimo una volta che questo giunge nel duodeno.
Gli enzimi proteolitici sono la tripsina, la chimotripsina e la carbossipeptidasi; essi vengono sintetizzati nel pancreas in forma inattiva (tripsinogeno, chimotripsinogeno e procarbossipolipeptidasi), e vengono attivati solo dopo essere stati secreti nel lume intestinale. L'enterochinasi, un enzima prodotto dalla mucosa del tenue in risposta al contatto con il chimo, attiva il tripsinogeno in tripsina, che in seguito è in grado si attivare ulteriormente sia il tripsinogeno, sia il chimotripsinogeno ed la procarbossipolipeptidasi.
La tripsina è il più abbondante degli enzimi pancreatici ed insieme alla chimotripsina interviene nella scissione delle proteine integre, o già precedentemente digerite, in peptidi di diverse dimensioni, mentre la carbossipeptidasi scinde tali peptidi nei singoli aminoacidi, completando la digestione delle proteine. L'amilasi pancreatica invece idrolizza gli amidi, il glicogeno e la maggior parte dei polisaccaridi, ad eccezione della cellulosa, liberando disaccaridi e alcuni trisaccaridi. I principali enzimi coinvolti nella digestione dei grassi sono la lipasi pancreatica, che scinde i grassi neutri in acidi grassi e monogliceridi, la colesterolo-esterasi, che idrolizza gli esteri del colesterolo, e la fosfolipasi, che idrolizza il legame degli acidi grassi nei fosfolipidi.
La stimolazione della secrezione del succo pancreatico avviene in maniera sinergica da parte di fattori nervosi, come l'acetilcolina rilasciata da terminazioni nervose parasimpatiche vagali, e di fattori ormonali, come la colecistochinina e la secretina, rilasciate dalla mucosa duodenale in risposta all'ingresso del chimo nel lume dell'intestino tenue. L'acetilcolina e la colecistochinina stimolano prevalentemente le cellule acinose del pancreas, inducendo quindi la produzione di un succo molto ricco di enzimi che resta accumulato nei dotti fino a quando la secretina non stimola la secrezione di grandi quantità di liquido ad alta concentrazione di ioni bicarbonato (fino a 145 mEq/litro circa) da parte dell'epitelio dei dotti, permettendo così la veicolazione degli enzimi nel duodeno.
Anche la secrezione pancreatica, così come quella gastrica, è costituita da tre fasi:

- una fase cefalica, nella quale si osserva la secrezione di modeste quantità di enzimi indotta dalla liberazione di acetilcolina da parte delle terminazioni nervose del nervo vago in risposta agli stessi segnali nervosi che provocano la secrezione gastrica. Tale fase è responsabile della secrezione di circa il 20% del totale di enzimi pancreatici dopo un pasto;
- una fase gastrica, nella quale si rilascia un'altra quota enzimatica pari al 5-10 % della totale secrezione enzimatica successiva al pasto. Sia in questa fase, sia nella fase precedente, solo piccole quantità di succo pancreatico giungono nel lume del duodeno, poiché solo piccole quantità di acqua ed elettroliti vengono rilasciate nei dotti;
- una fase intestinale, nella quale aumenta la secrezione pancreatica indotta dal rilascio di secretina e di colecistochinina in risposta all'ingresso del chimo acido (pH < 4,5 - 5,0) nel tenue. Tale fase è responsabile della secrezione del 70-80 % degli enzimi pancreatici totali rilasciati dopo un pasto.

Il rilascio degli enzimi pancreatici avviene soprattutto ad opera della colecistochinina liberata da specifiche cellule della mucosa intestinale in minima parte dalla presenza di acido cloridrico, e prevalentemente in presenza di chimo ricco di proteasi e peptoni (prodotti dalla digestione parziale delle proteine) e di acidi grassi a catena lunga (figura 4). La secretina invece viene liberata prevalentemente in risposta alla presenza di acido cloridrico nel chimo, e in minima parte in presenza di acidi grassi.

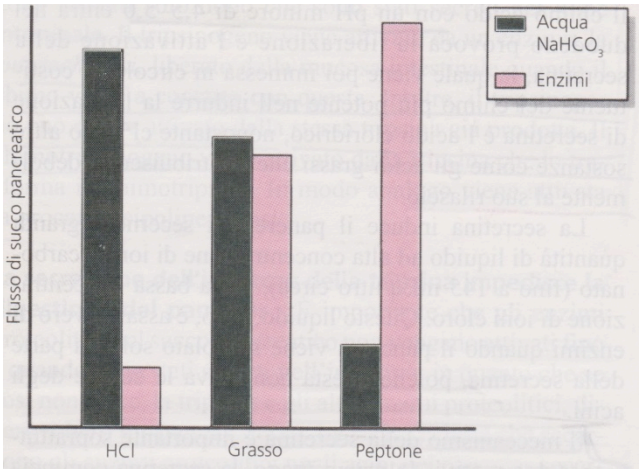


Figura 4 Influenza di HCl, grasso e peptoni presenti nel duodeno sulla composizione della secrezione pancreatica (Guyton & Hall, 2006)

Il meccanismo della secretina svolge un ruolo fondamentale per due motivi: in primo luogo neutralizza il chimo acido riversato dallo stomaco bloccando l'attività peptica dei succhi gastrici, pertanto svolge un'azione protettiva contro la possibile insorgenza di ulcera peptica; in secondo luogo, la secrezione di bicarbonato di sodio, il cui pH si aggira intorno a 8,0, determina un ambiente debolmente alcalino o neutro ideale per il funzionamento degli enzimi pancreatici.

La secrezione epatica della bile

Il fegato, tra le sue tante funzioni, produce tra 600 e 1200 ml/giorno di bile, che svolge due azioni molto importanti: in primo luogo, è coinvolta nella digestione e nell'assorbimento dei grassi (e delle vitamine liposolubili) grazie agli acidi biliari in essa contenuti che emulsionano i lipidi alimentari rendendoli facilmente attaccabili dalle lipasi pancreatiche, e favoriscono l'assorbimento attraverso la mucosa intestinale dei prodotti della digestione dei grassi; in secondo luogo, la bile rappresenta un mezzo attraverso il quale vengono escreti prodotti rimossi dal circolo sanguigno, come la bilirubina derivante dal catabolismo dell'emoglobina, e l'eccesso di colesterolo prodotto dalle cellule epatiche.

La bile viene secreta continuamente dagli epatociti, si riversa nei canalicoli biliari compresi tra le cellule epatiche, passando in dotti via via sempre più grandi fino al dotto epatico ed al coledoco, dal quale la bile viene rilasciata nel duodeno, o viene convogliata attraverso il dotto cistico nella cistifellea. Durante il passaggio

attraverso i vari dotti biliari, viene secreta anche una soluzione acquosa di ioni sodio e bicarbonato indotta dalla secretina per potenziare ancora di più la neutralizzazione del chimo acido.

La bile viene immagazzinata nella cistifellea fino a quando non è richiesta nel duodeno, nonostante la capacità massima della cistifellea sia inferiore al volume di bile prodotto nelle 12 ore: questo avviene grazie alla concentrazione della bile di circa 5 volte (ma può arrivare fino a 20 volte) tramite al continuo assorbimento da parte della mucosa di acqua, sodio, cloro e di altri elettroliti.

Circa la metà dei soluti totali della bile è rappresentata dai sali biliari, mentre la restante parte è costituita da bilirubina, colesterolo, lecitina e dai comuni elettroliti del plasma.

La colecisti comincia a svuotarsi, grazie a contrazioni della parete, nel momento in cui cominciano i processi digestivi nella parte prossimale del tubo digerente, particolarmente quando entrano nel duodeno i lipidi alimentari. Le contrazioni sono indotte dallo stesso tipo di fibre nervose che promuovono la secrezione e la motilità in altre parti dell'apparato digerente, ma soprattutto in risposta all'azione della colecistochinina liberata nel sangue dalla mucosa duodenale principalmente a seguito dell'ingresso di grassi nel duodeno.

La produzione giornaliera di sali biliari da parte delle cellule epatiche si aggira intorno a 0,6 g: essi derivano dal colesterolo fornito dagli alimenti o sintentizzato nelle cellule epatiche, e vengono in seguito convertiti in acido colico e chenodesossicolico. Questi acidi poi, una volta coniugati principalmente con la glicina ed in misura minore con la taurina, danno origine agli acidi glico- e tauroconiugati che vengono poi secreti con la bile.

Come già accennato in precedenza, i sali biliari svolgono due funzioni molto importanti:

- una funzione emulsionante o detergente, permettendo la frammentazione delle particelle di grasso alimentare in globuli di dimensioni minori durante i movimenti di segmentazione nel lume intestinale;
- formano dei complessi chiamati micelle insieme con acidi grassi, monogliceridi, colesterolo ed altri lipidi, promuovendone l'assorbimento da parte della mucosa intestinale.

Le secrezioni dell'intestino tenue

A livello dell'intestino tenue viene secreto muco da parte di ghiandole di Brunner, presenti nei primi centimetri del duodeno in seguito, a stimoli diretti della mucosa, stimoli vagali ed ormoni gastrointestinali (prevalentemente gastrina). Il muco secreto da queste ghiandole svolge un'azione protettiva verso la mucosa duodenale nei confronti dell'azione digestiva del succo gastrico.

Tra i villi intestinali, inoltre, sono presenti delle piccole cavità chiamate cripte di Lieberkuhn (figura 5), la cui superficie è costituita da due tipi di cellule, le cellule caliciformi che secernono muco per lubrificare e proteggere la superficie intestinale, ed enterociti che nelle cripte secernono grandi quantità di acqua ed elettroliti (circa 1800 ml/giorno). Questa secrezione possiede un pH leggermente alcalino (7,5-8,0) e viene riassorbita, insieme ai prodotti finali della digestione, da enterociti posti sulla superficie dei villi, fungendo quindi da veicolo acquoso per l'assorbimento di sostanze dal chimo.

Nella secrezione del tenue sono quasi assenti enzimi: essi tuttavia sono contenuti nelle cellule epiteliali della mucosa, operando la digestione delle macromolecole durante il loro assorbimento attraverso l'epitelio. Questi enzimi sono peptidasi, che scindono piccoli peptidi in aminoacidi, quattro enzimi che scindono i disaccaridi in monosaccaridi (saccarasi, maltasi, isomaltasi, lattasi), e lipasi intestinale per la scissione dei grassi neutri in glicerolo ed acidi grassi.

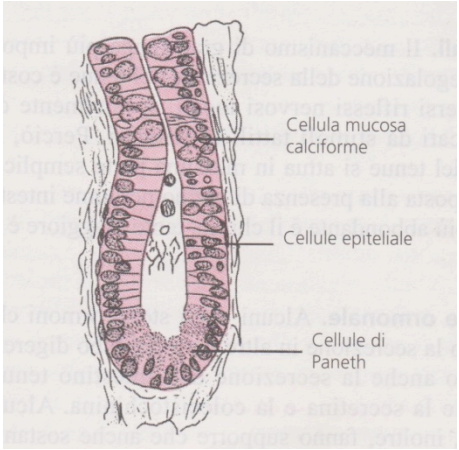


Figura 5 Cripta di Lieberkuhn

CAPACITA' DI COLONIZZAZIONE E RESISTENZA DEI PROBIOTICI

La capacità di colonizzare il tratto gastrointestinale è un obiettivo che ci si è prefissati già da molti anni e i lattobacilli ed i bifidobatteri, usati in molte preparazioni alimentari, sono considerati buoni candidati per raggiungere questo obiettivo.

Resistenza all'ambiente gastrico

I lattobacilli probiotici sono esposti a stress acido quando essi raggiungono lo stomaco dove i valori di pH sono molto bassi. Diversi meccanismi regolano l'omeostasi del pH. Sulla membrana batterica è collocato un enzima che trasferisce protoni in un processo richiedente energia. Questo enzima è stato studiato in *Lb. plantarum* e la sua attività è ottimale a valori di pH extracellulari inferiore a 7 (Bender *et al*., 1987). La via dell'arginina deaminidasi (ADI) è un altro meccanismo di risposta allo stress acido. Tale via è composta di tre enzimi: ADI, ornitina transcarbaminolasi e la carbammato chinasi. Una quarta proteina di trasporto membranaria, che catalizza lo scambio neutrale (senza carica) di arginina e ornitina, è anch'essa fondamentale nel meccanismo di risposta generale allo stress acido. In questo metabolismo viene generata ammoniaca che è una base che regola in tal modo il pH ottimale di sopravvivenza cellulare (Marquis *et al*., 1987). La sopravvivenza cellulare in condizioni di severa acidità è positivamente collegata da un adattamento a bassi valori di pH, processo noto come Acid tolerance Response (ATR) (Foster et al., 1991). Cellule adattate di *Lb. delbrueckii* per 30 minuti a pH 4,75, sono approssimativamente 250 volte più tolleranti a condizioni di letalità (30 minuti a pH 3,5), rispetto a cellule non adattate. Due mutanti acido tolleranti di *Lb. sanfranciscensis* CB1 sono stati isolati a seguito di una prolungata esposizione (24 ore) a pH 3,2. La tolleranza ATR sembra essere collegata ad una modificazione della sintesi proteica indotta dalle proteine acid shock proteins (ASPs). L'inibizione della neosintesi di ASPs da cloramfenicolo reverte la tolleranza ATR nel *Lb. lactis* subsp. *lactis* (O'Sullivan *et al*., 1997) ed anche in *Lb. sanfranciscensis* (De Angelis *et al.*, 2001). Questi dati confermano

che perlomeno in alcuni ceppi batterici la tolleranza da stress acido è legata alla sintesi di nuove proteine. Studi condotti con l'analisi elettroforetica bidimensionale hanno mostrato l'induzione di un elevato numero di ASPs: almeno 30 in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Maguin *et al*., 2000) ed anche che alcune HSPs sono indotte durante l'adattamento acido, mostrando una grande variabilità secondo la specie batterica considerata. In *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* GroES, GroEL e DnaK sono molto espresse, rispetto al controllo non adattato.

Inoltre, occorre sottolineare che nell'apparato gastro-enterico sono localizzate delle cellule, dette a calice (goblet cells), deputate alla produzione di muco, costituito da mucina. Le mucine sono glicoproteine, che formano un gel protettivo, fornendo una zona di separazione tra i batteri e la superficie delle cellule epiteliali. Come tale, lo strato di muco è parte integrante della strategia di tolleranza immunologica usata dall'ospite per mantenere una simbiosi vantaggiosa nella relazione ospite-microorganismi. Alcuni probiotici contribuiscono attivamente a tale barriera epiteliale protettiva incrementando la produzione normale di mucina, infatti alcuni estratti di *Lb. acidophilus* hanno dimostrato di incrementare la usuale quantità di sintesi di mucina. L'induzione della sintesi di mucina è in grado di fornire una nicchia aggiuntiva per i probiotici che risiedono transitoriamente nel tratto gastrointestinale e possono promuovere il contatto con i loro recettori. Questo strato svolge una funzione di protezione nei confronti di molecole potenzialmente dannose o altri antigeni, mentre esercita una funzione lubrificante specie in sede intestinale. Il muco è la prima barriera che i batteri intestinali incontrano e che i patogeni devono attraversare se vogliono raggiungere le cellule epiteliali, pertanto per accedere agli strati più profondi del tessuto un patogeno deve degradare il muco, come ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Entamoeba histolytica* che producono proteasi e glicosilasi o *Helicobacter pylori* che è in grado di rompere i legami disolfuro di questa glicoproteina, facilitando la disgregazione della mucina, con conseguente riduzione di protezione e rendendo più facile l'adesione dei batteri e la loro infiltrazione nelle aree sottostanti.

I probiotici, come è stato osservato *in vitro* promuovono e aumentano la secrezione di muco come meccanismo per aumentare la funzione di barriera e

l'esclusione dei patogeni, inclusi anche i virus. Nell'infezione da Rotavirus, ad esempio, diversi probiotici sono capaci di inibire l'adesione di queste particelle virali attraverso la modificazione dello stato di glicosilazione del recettore nelle cellule epiteliali usando un fattore solubile escreto dai probiotici (Freitas *et al*., 2003).

Resistenza all'ambiente intestinale

Ceppi batterici selezionati come probiotici tra cui *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* devono essere capaci di tollerare gli acidi biliari. Sebbene la tossicità degli acidi biliari nei confronti dei batteri non sia ancora perfettamente conosciuta, gli acidi biliari sono molecole che agiscono superficialmente disaggregando la membrana biologica. In dettaglio, gli acidi biliari, in quanto detergenti, provocano alterazioni del metabolismo degli zuccheri e delle proteine e inducono meccanismi di stress ossidativo (Begley *et al*.,2005). Essi sono sintetizzati dal colesterolo e, dopo essere coniugati alla glicina o taurina nel fegato, migrano nell'intestino. A tale livello, vengono efficacemente neutralizzati dai batteri che idrolizzano l'aminoacido mediante enzimi batterici, chiamati BSHs. L'espulsione diretta della bile come meccanismo di resistenza è stata caratterizzata nei batteri Gram negativi (Lomovskaya *et al*., 1992). Un ruolo importante, in tale direzione, è promosso sicuramente da ceppi riconducibili ai batteri lattici e ai bifidobatteri in grado di colonizzare il lume intestinale. Infatti, è noto che enzimi rientranti nella classe BSHs sono espressi da parte di ceppi riconducibili alla specie *Lb. plantarum* (Smet *et al*., 1994). Inoltre gli stessi Autori hanno evidenziato la capacità da parte dei ceppi di *Lb. plantarum* di resistere all'acido taurodeossicolico (TDCA) grazie alla presenza della TDCA idrossilasi (Smet *et al.*, 1995). Tale meccanismo è mediato da un trasportatore di efflusso, appartenente alla famiglia Multidrug Resistance (MDR). Tra i sistemi di efflusso, è stato caratterizzato geneticamente quello HorA ABC, riscontrato per la prima volta in ceppi di *Lb. brevis* (Sakamoto *et al*., 2001). La resistenza ai sali biliari da parte dei batteri continua ad essere argomento di estrema attualità nell'ambito della comunità scientifica. Studi recenti hanno dimostrano che il trasportatore BL0920 proveniente da *B. longum,*

che condivide un alto grado di omologia con Bbr_0838, ha un ruolo importante nella protezione dai sali biliari (Gueimonde *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2011).

Dunque, le conoscenze in tale ambito, pur se non copiose ed in continua evoluzione, appaiono particolarmente importanti e sottolineano l'importanza di una opportuna selezione dei ceppi da impiegare come probiotici.

CAPITOLO 4

ALIMENTI: VEICOLI E PROTETTORI DI PROBIOTICI

Appare evidente, da quanto riportato nei precedenti capitoli che il transito gastro intestinale da parte dei batteri probiotici è accompagnato da una serie di ostacoli rappresentati principalmente dal basso pH caratterizzante il tratto gastrico e dalla presenza di sali biliari nel lume intestinale.

A tal proposito sono particolarmente intense le ricerche indirizzate all'individuazione di strategie in grado di proteggere i microrganismi probiotici durante il passaggio gastro intestinale.

Particolare attenzione è stata rivolta agli approcci prevedenti la microincapsulazione delle cellule probiotiche mediante l'ausilio di sostanze, spesso rappresentate proteine del latte o da fibre, che superano in maniera indenne il tratto gastrico e raggiungono l'intestino. In tal modo, i probiotici sono avvolti in uno strato protettivo durante il passaggio gastrico e vengono liberati a livello intestinale.

Negli ultimi anni, inoltre, è stato indagato l'eventuale effetto protettivo esercitato da alimenti nei confronti dei microrganismi probiotici durante il tratto gastrico.

LE COMPONENTI A PROTEZIONE DEI MICRORGANISMI

Diversi autori hanno evidenziato che alimenti in possesso di un elevato potere tampone, quali i formaggi, possono essere ritenuti un adeguato veicolo protettivo di microrganismi probiotici (Pitino *et al.,* 2012; Ricciardi *et al*., 2014).

Sulla base di tali conoscenze la ricerca applicata in sinergia con i settori della ricerca e sviluppo del mondo aziendale intende individuare alimenti ampiamente diffusi nella dieta dei consumatori e ad elevata capacità di attrazione tali da consentire una protezione adeguata dei probiotici al transito gastro intestinale.

In tale ottica, alimenti quali il cioccolato appaiono particolarmente promettenti.

IL CIOCCOLATO

Il "cibo degli dei"

Il cioccolato è uno dei massimi piaceri della vita, ma anche uno degli alimenti più affascinanti e misteriosi (Richardson, 2004).

Un'antica leggenda azteca fa risalire l'origine del cioccolato proprio alla mitologia, nella quale si raccontava che il cioccolato fosse un dono fatto all'umanità dal Dio Quetzacoalt, dal quale deriva il nome *cacahualt,* in grado di alleviare la fatica e ridare forza e vigore. Il nome scientifico della pianta di cacao è *Theobroma cacao*, dal greco *theo* = Dio e *broma* = cibo, quindi ***"cibo degli dei".***

La pianta di cacao ha origini antichissime, si presume che fosse presente più di 6000 anni fa nel Rio delle Amazzoni e nell'Orinoco. I primi a coltivare il cacao furono i Maya, intorno al 1000 a.C. Successivamente anche gli Aztechi si dedicarono alla coltivazione del cacao e in seguito alla produzione di cioccolato Questa pianta era considerata dagli Aztechi di origine divina da qui il nome *Theobroma*. Gli Aztechi utilizzavano i semi di questa pianta anche come moneta; 100 semi per comprare uno schiavo e 10 semi per comprare un coniglio.

Quando nel 1502, Cristoforo Colombo sbarcò nelle terre dell'Honduras gli vennero offerti i semi di cacao e la bevanda prodotta da questi ultimi. Il gusto della cioccolata di allora non era particolarmente piacevole per gli Europei e Colombo non diede particolare importanza a questi semi. Diciassette anni più tardi però, nel 1519, Hernan Cortez, arrivato dalla Spagna per conquistare la Nuova Terra, venne scambiato per il dio della leggenda Quetzacoalt, dal quale deriva il nome del seme *cacahualt.* Per questo motivo venne accolto pacificamente dall'imperatore Montezuma che gli regalò un'intera piantagione di cacao e tutti i profitti che essa avrebbe portato. Cortez si rese subito conto del valore economico del cacao e lo portò con sé in Spagna. Qui alcuni frati, grandi esperti di miscele e infusi, ebbero l'intuizione di sostituire il pepe e il peperoncino che si usavano nei paesi di origine, con lo zucchero e la vaniglia, creando una bevanda dolce e deliziosa.

La cioccolata arrivò in Italia nel 1606 grazie ad Antonio Carletti, un commerciante fiorentino. Fino al Settecento era conosciuta solamente come bevanda, a cui erano ricondotte straordinarie qualità benefiche. Successivamente si cominciò a stimare ed amare questo fantastico e sorprendente ingrediente anche in forma solida, fino a giungere alle favolose tavolette che oggi degustiamo.

Tipologia e tecnologia di produzione

Nel tempo, il ciclo di lavorazione del cioccolato è rimasto sostanzialmente lo stesso, ma grazie agli sviluppi della tecnologia si è ottimizzata la produzione, oggi è possibile ad esempio un controllo più accurato dei parametri di lavorazione, garantendo una maggiore costanza qualitativa. Trasformare le fave di cacao in un ottimo cioccolato richiede conoscenza, esperienza e talento, è un processo affascinante che inizia nelle foreste tropicali e si conclude attraverso le fasi della trasformazione.

La coltivazione richiede elevate spese d'impianto e comincia a produrre dal quarto-quinto anno. La pianta teme l'insolazione diretta quindi cresce all'ombra di alberi più alti quali palme e banani, ogni pianta fornisce 1-2 kg di semi secchi.

In commercio esiste una varietà notevole di cioccolato, che differiscono per gusto e per forma, a seconda delle qualità e della tostatura dei semi di cacao, del procedimento di lavorazione adottato e del gusto del paese nel quale il cioccolato viene prodotto. Nell'attuale produzione di cioccolato vengono utilizzati tre differenti tipi di cacao a cui corrispondono caratteristiche peculiari di aroma, aspetto e costo, una suddivisione genetica ha permesso di raggrupparle in tre macrospecie che sono quella del Criollo, del Forastero e un ibrido tra i due, il Trinitario. Il Criollo e il Trinitario vengono indicati come cacao fine mentre il Forastero è destinato per lo più alla produzione di massa. Il Criollo è la varietà più antica di cacao caratterizzato da semi bianchi, molto profumati e poco amari; originario del Messico, è estremamente delicato e poco resistente alle malattie, per questo non è facile da coltivare e richiede cure e attenzioni costanti. Per i ridotti quantitativi che ne vengono prodotti, sia per il prezzo più alto, è destinato alla

fabbricazione di cioccolata di alto pregio. Il Forastero è di qualità inferiore sebbene abbia una diffusione sul mercato mondiale molto superiore rispetto al Trinitario e al Criollo. Le cabosse di Forastero hanno una pelle spessa e un aroma intenso, più grossolano, non particolarmente raffinato e molto riconoscibile, ed infine abbiamo l'ibrido Trinitario che è molto ricercato da i cioccolatieri per il suo sapore fine e la sua ricchezza aromatica e il prezzo inferiore rispetto al Criollo.

Per arrivare alla tavoletta che tutti conosciamo (o al cacao in polvere), il seme del cacao deve subire una serie di trattamenti. Giunti a maturazione, i frutti vengono staccati dalla pianta mediante una torsione del peduncolo e ammucchiati al margine della piantagione dove vengono subito spaccati con appositi coltelli. I frutti appena raccolti hanno un sapore molto amaro e si lasciano fermentare a lungo per facilitare il distacco della polpa dal guscio. La fermentazione viene effettuata in vasche o fosse, scavate nel terreno per un periodo che varia da 2 a 10 giorni, oppure tra le foglie di banano. Durante questa fase si elimina la polpa residua sotto l'azione del calore del sole e dei microrganismi, con la perdita della maggior parte di acqua e degli zuccheri e la riduzione del sapore amaro dei semi. I microrganismi, responsabili della fermentazione del cacao, sono rappresentati soprattutto dai lieviti presenti sulla matrice vegetale e nell'ambiente, quando i frutti vengono rotti, i semi e la polpa vengono contaminati dai molteplici microrganismi presenti sui frutti, sulle mani dei lavoratori, insetti, ecc. Dopo la fermentazione, le fave vengono sottoposte ad essiccazione al sole per bloccare la fermentazione e per ridurre il contenuto di umidità che favorirebbe lo sviluppo di muffe durante la conservazione. I semi sono posti su ripiani con tettoie scorrevoli che li riparano dalle piogge, oppure industrialmente in essiccatori ad aria calda.

Dopo la prima lavorazione si procede con la tostatura delle fave per diversi motivi: dare un sapore di tostato, ridurre le sostanze indesiderate, migliorare la qualità del cacao ecc. Le fave vengono tostate per 15 o 20 minuti in sfere rotanti che raggiungono una temperatura tra i 110 e i 120°C. Con la tostatura (o torrefazione) si elimina l'umidità e l'acidità e si favorisce lo sviluppo di tutti i principi aromatici creando quell'inconfondibile profumo che emana il cacao.

Le fave di cacao vengono poi raffreddate velocemente con un sistema di ventilazione e poi trasportate alla macchina rompi cacao che provvede alla

decorticazione (separazione delle bucce) e degerminazione ed in seguito alla frantumazione in granella, il tutto viene poi setacciato selezionando la granella torrefatta che viene poi macinata ottenendo una pasta fluida.

La granella di cacao così ottenuta viene messa nel melangeur, una macchina trituratrice caratterizzata da due rulli girevoli di granito. L'intensa azione di macinazione converte i pezzi di cacao tostato in una pasta oleosa spessa e infine in un liquido denso, questa è poi divisa in pani, che necessitano di una breve stagionatura, protratta generalmente per 3-4 mesi. Nella fase seguente viene aggiunto zucchero semolato, ben miscelato nel cacao liquido. La miscela diventa più liscia e il risultato ottenuto è un liquido denso conosciuto come **cioccolato**, pronto per il processo di raffinazione e concaggio.

Il cioccolato raffinato ha una consistenza friabile, si rende quindi necessaria un'altra operazione che è appunto quella del concaggio, dove si ha la riduzione dell'umidità, la riduzione della viscosità e la rimozione di alcune componenti quali acidi organici e aldeidi e la riduzione dei composti fenolici. Il concaggio avviene in grosse vasche dette conche, con temperatura controllata, dotate di bracci oscillanti di rimescolamento che amalgamano alla perfezione gli ingredienti. Il procedimento si conclude dopo circa 8 ore, successivamente viene aggiunta la quota di burro di cacao richiesta in base al tipo di cioccolato in produzione.

Prima della lavorazione finale, il cioccolato deve essere sottoposto a un trattamento molto importante, il temperaggio. Durante questa operazione, il cioccolato passa dai 40° C del concaggio ai 28°C per poi rialzarsi a 31°C. All'interno della massa di cioccolato si formano così dei piccolissimi cristalli di burro di cacao che hanno delle proprietà particolari. Quando il cioccolato viene raffreddato fino alla completa solidificazione, tutto il burro di cacao cristallizza nella stessa forma generata dal temperaggio. Il cioccolato acquista così delle caratteristiche importanti quali la facile estraibilità dagli stampi, una struttura vellutata e omogenea, un aspetto brillante e una lunga conservazione.

La fase finale consiste nel versare il prodotto semiliquido in stampi di metallo o legno, appoggiati su nastri in movimento che vibrando lasciano fuoriuscire eventuali bolle d'aria rendendo il prodotto perfettamente uniforme. A questo

punto, si lascia raffreddare il cioccolato nello stampo, e dopo pochi istanti la tavoletta è pronta per esser confezionata. Il raffreddamento degli stampi avviene in un tunnel in continuo a più sezioni con aria fredda. Un punto importante da tenere sotto controllo è l'umidità dell'aria del tunnel, per evitare la formazione di condensa sulla superficie del cioccolato.

Il luogo ideale per la conservazione del cioccolato dovrebbe avere una temperatura compresa tra 10 e 18°Ce un'umidità compresa tra il 20% e il 50%. Per quanto riguarda la durata del cioccolato confezionato bisogna tenere in considerazione che il cioccolato fondente mantiene intatte per anni le sue caratteristiche organolettiche. Il cioccolato al latte si conserva per un anno, il più sensibile ai mutamenti è il cioccolato bianco.

Caratteristiche chimiche

Il cioccolato ha una particolare composizione chimica che dipende, oltre che dalla lavorazione, anche dalle fave di cacao da cui viene prodotto. Ciò che garantisce la qualità di una barretta di cioccolato sono i vari tipi di ingredienti utilizzati e soprattutto la loro proporzione (cioccolato fondente dovrebbe contenere il 35% di cacao e non più del 65% di zucchero, quello al latte almeno il 14% di latte e 25% cacao, ma non più del 55% di zucchero).

Nella tabella 4 vengono riportati i principali componenti del cioccolato espressi in massa per 100 g di prodotto:

Tabella 4 Composizione chimica del cioccolato

	PURO	*AL LATTE*	*BIANCO*
Proteine	3.2 g	7.6 g	7.5 g
Grassi	33.5 g	32.3 g	37 g
Zuccheri	60.3 g	57 g	52 g
Lecitina	0.3 g	0.3 g	0.3 g
Teobromina	0.6 g	0.2 g	
Calcio	20 mg	220 mg	250 mg
Magnesio	80 mg	50 mg	30 mg
Fosforo	130 mg	210 mg	200 mg
Ferro	2 mg	0.8 mg	
Rame	0.7 mg	0.4 mg	
Vitamina A	40 UI	300 UI	220 UI
Vitamina B1	0.06 mg	0.1 mg	0.1 mg
Vitamina B2	0.02 mg	0.3 mg	0.3
Vitamina C	1.14 mg	0.3 mg	3 mg
Vitamina D	50 UI	70 UI	15 UI
Vitamina E	2.4 mg	1.2 mg	
Calorie	555.5 Kcal	549.1 Kcal	571 Kcal

Come si può notare la presenza del latte arricchisce la cioccolata di proteine e calcio, oltre che di vitamine B2 ed A, mentre diminuisce la quantità di ferro, maggiormente presente nella pasta di cacao.

Nella tabella 5 vengono riportati esclusivamente i componenti del cacao essendo questo l'elemento principale che attribuisce al cioccolato le sue caratteristiche fondamentali:

Tabella 5 Compisizione chimica del cacao

		Cacao in polvere (valore medio riferito a 100g di prodotto)
Composizione generale	**Acqua**	5,60 g
	Azoto totale	3,17 g
	Proteine (N x 6,25)	19,8 g
	Grassi	24,5 g
	Carboidrati disp.	10,8 g
	Minerali	6,53 g
Carboidrati	**Saccarosio**	--
	Lattosio	--
	Amido	8,6 g
Minerali ed elementi in tracce	**Sodio**	17 µg
	Potassio	1920 µg
	Magnesio	414 µg
	Manganese	2,5 µg
	Ferro	13 µg
	Rame	3,8 µg
	Zinco	8,2 µg
	Nickel	937 µg
	Cromo	159 µg
	Fosforo	656 µg
	Cloro	32 µg
	Fluoro	3,1 µg
	Iodio	
Vitamine	**Vitamina B1**	130 µg
	Vitamina B2	400 µg
	Nicotinamide	2700 µg
	Acido pantotenico	1100 µg
	Vitamina B6	140 µg
	Biotina	20 µg
	Acido folico	38 µg
Acidi	**Acido ossalico**	396 µg

Oltre a questi che sono i componenti primari, esistono altri definiti minoritari, presenti solo in tracce, ma non per questo meno importanti, in quanto responsabili anch'essi delle proprietà organolettiche e nutrizionali del cioccolato. Questi componenti sono responsabili di alcuni effetti benefici (antitumorale, eccitante, stimolante, antiossidante, ecc.), ma non bisogna dimenticare che il cacao ha anche la caratteristica di possedere un'elevata quantità di calorie, quindi non bisogna abusarne.

Tra i componenti minoritari abbiamo:

- Ammine biogene: feniletilamina e serotonina;
- Endocannabinoli: anandamide e N-acil-etanolamine;
- Metilxantine;
- Polifenoli.

Ammine biogene

Il cacao, come tutti gli alimenti fermentati microbiologicamente (vino, formaggi stagionati, birra, caffè…), può contenere ammine biogene, in particolare 2-feniletilammina (derivante dalla decarbossilazione della fenilalanina), tiramina (dalla tirosina) triptamina e serotonina (dal triptofano).

Le ammine biogene sono sostanze basiche derivanti dalla decarbossilazione microbica degli aminoacidi. I batteri decarbossilanti in grado di produrre ammine biogene negli alimenti sono rappresentati principalmente dalla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Tra le ammine biogene contenute nel cacao, merita maggior considerazione la 2-feniletilammina, sostanza analoga alle anfetamine sia dal punto di vista strutturale che farmacologico. Questa ammina è conosciuta come "love-drug" (droga dell'amore) perché è in grado di produrre sensazioni come quelle sperimentate quando una persona è "innamorata" e si pensa sia responsabile degli effetti afrodisiaci che il cioccolato sembra possedere. Infatti la feniletilammina (PEA) viene rilasciata nel cervello quando l'individuo sperimenta sentimenti di gioia e amore.

Endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono necessari al normale funzionamento del cervello: regolano la sensazione di fame, hanno effetti rilassanti sui muscoli, riducono l'aggressività e la sensazione di dolore, influenzano la creazione e il mantenimento della memoria. Il cioccolato, essendo ricco di grassi, potrebbe contenere lipidi legati all'anandamide. L'anandamide è prodotto a partire dai fosfolipidi, costituito dall'acido arachidonico, per mezzo di una via metabolica in cui entrano in gioco gli enzimi Naciltransferasi e fosfodiesterasi NAPE-PLD. L'inattivazione invece è promossa da un'idrolisi catalizzata dall'enzima FAAH. Il suo nome deriva dal Sanscrito «ananda» e significa felicità, poiché il prodotto produce effetti simili a quelli della cannabis (hashish e marjuana).

Metilxantine

La struttura delle metilxantine è caratterizzata da una base purinica metil-sostituita, ovvero da un composto eterociclo metil-sostituito ottenuto dalla

condensazione fra la piridina e l'imidazolo. Le metilxantine, anche se non dotate di valore nutritivo, sono fra i componenti più importanti della cioccolata. Sono proprio questi i componenti responsabili della "voglia di cioccolato". Nella famiglia delle metilxantine, fanno parte la teobromina, caffeina e teofillina, le prime due, sono eccitanti del sistema nervoso.



Figura 6 Strutture molecolari della teobromina, caffeina e teofillina

Questi composti, attivano la muscolatura cardiaca, accelerando il battito, promuovono la diuresi, ma, soprattutto, stimolano le funzioni del sistema nervoso centrale e, per quest'attività, sono ben conosciute e apprezzate. Oltre a stimolare le funzioni del sistema nervoso centrale, queste sostanze, in modo particolare la teobromina, aumentano la concentrazione e lo stato di veglia, favorendo così un flusso di pensiero più rapido e più fluido; la caffeina migliora inoltre la capacità di lavoro dei muscoli, accrescendone la contrattilità, e allevia il senso di fatica. Bassi dosaggi possono produrre effetti benefici per l'organismo, dosaggi elevati possono causare effetti negativi o tossici. Nella cioccolata prevale nettamente la teobromina sulla caffeina.

Polifenoli

I polifenoli sono antiossidanti naturali e possono risultare utili nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine e contro i radicali liberi; tra gli effetti benefici a loro imputati, quelli a livello cardiovascolare, a livello cognitivo e contro la crescita tumorale. Il cioccolato ed altri prodotti contenenti cacao, sono ricchi di polifenoli, quali catechine, epicatechine (unità monomeriche) e procianidine (oligomeri). Questi composti sono presenti nella buccia delle fave di cacao. I flavanoli sono un tipo di fitonutrienti appartenenti al più ampio gruppo dei flavonoidi: sono naturalmente contenuti nel cacao ma la gran parte si disperde nel processo di lavorazione per ottenere il cioccolato. Tra le proprietà loro riconosciute, quella di mantenere in salute i vasi sanguigni e di abbassare il rischio di aggregazione piastrinica che provoca la coagulazione del sangue.

Valenza salutistica

Da alcuni anni, il cioccolato non è più considerato solo come un piacere per il palato, ma un vero alimento: con una sua efficacia "terapeutica", avvalorata da un numero sempre crescente di studi scientifici, sugli animali e sull'uomo. I benefici per la salute sono tantissimi: tiene sotto controllo la pressione, riduce il pericolo di trombosi, rivitalizza le pareti dei vasi sanguigni, aumenta il flusso di sangue a pelle e cervello, ecc. Per questo motivo l'EFSA sta valutando l'indicazione del cioccolato amaro (10 g al giorno con 200 mg di flavanoli) per affrontare la pressione arteriosa elevata e l'angina pectoris.

La recente scoperta di composti fenolici biologicamente attivi nel cacao ha stimolato la ricerca sui suoi effetti sull'invecchiamento, regolazione della pressione arteriosa e aterosclerosi (Pellatti, 2012). Come suggerito dagli scienziati del Top Institute Food and Nutrition e della Wageningen University (Paesi Bassi), il cioccolato può essere un toccasana per cuore e sistema vascolare**.** Il merito di questa attività benefica del cioccolato fondente è attribuibile alle sostanze antiossidanti in esso contenute, tuttavia se per esempio si modifica il contenuto in flavanoli aumentandone la presenza, gli effetti salutari non cambierebbero; quello che invece cambia è il gusto.

Il cioccolato influisce sulla salute endoteliale è stato osservato che il consumo di cioccolato, oltre a migliorare la funzione vascolare, riduce anche la capacità di adesione dei leucociti nella circolazione. I ricercatori hanno anche mostrato come la combinazione della fibra di cacao con prebiotici è in grado di migliorare la salute generale di una persona e contribuire a convertire i polifenoli nello stomaco in composti antinfiammatori.

Quando questi composti vengono assorbiti dal corpo, riducono l'infiammazione del tessuto cardiovascolare, riducendo il rischio a lungo termine di ictus.

SEZIONE SPERIMENTALE

CAPITOLO 5
SCOPO DEL LAVORO

Gli alimenti probiotici rappresentano una delle tematiche di maggiore interesse per la ricerca scientifica. Oltre alle documentate e accertate attività dei probiotici nella cura e nella prevenzione di malattie come l'intolleranza al lattosio, la gastrite da *Helicobacter pylori*, la diarrea, la sindrome del colon irritabile, le malattie infiammatorie croniche intestinali, il cancro del colon e l'ipercolesterolemia, molte altre sembrano le patologie per le quali è possibile una cura basata o coadiuvata dall'uso di microrganismi probiotici.

Sulla base delle innanzi citate potenzialità e dell'efficace comunicazione e pubblicizzazione, promossa anche dai mezzi di comunicazione di massa, i probiotici hanno conquistato, nell'immaginario collettivo, una posizione particolarmente privilegiata.

Condizione necessaria affinchè i probiotici possano esercitare il loro effetto benefico nell'ospite, è conservare la loro vitalità fino al raggiungimento del sito di destinazione nonostante le condizioni avverse (pH, enzimi digestivi, sali biliari) che essi incontrano durante il transito gastrointestinale.

A tale scopo, la prima parte del lavoro di tesi di dottorato ha inteso valutare la capacità di sopravvivenza di diverse preparazioni probiotiche farmaceutiche, sia monoceppo che multiceppo, quando sottoposte agli stress tipici del transito gastrointestinale. Tale valutazione, a differenza di numerosi studi precedenti, non ha previsto un preliminare step di reidratazione delle preparazioni liofilizzate, dal momento che la loro ingestione da parte del consumatore, e il successivo passaggio lungo in tratto gastrointestinale, non viene preceduto da uno step di reidratazione.

Il mantenimento della vitalità di un probiotico rappresenta un obiettivo fondamentale anche durante la produzione e lo stoccaggio di alimenti funzionali, dove una miriade di stress dovuti ai parametri di fabbricazione (reazioni chimiche, calore, diffusione e pressione meccanica) influenza il metabolismo cellulare.

La matrice alimentare è considerata come uno dei principali fattori in grado di influenzare la colonizzazione dei microrganismi nel tratto gastrointestinale, e

quindi può svolgere un ruolo importante nella buona riuscita della somministrazione dei probiotici con la dieta.

Al fine di preservare la vitalità dei probiotici non solo durante i processi produttivi degli alimenti funzionali, ma anche durante il delivery nel tratto gastrointestinale, le proteine del latte trovano largo impiego, ad esempio nei protocolli di microincapsulazione.

L'introduzione di probiotici in un alimento è in grado non solo di aumentarne la valenza salutistica ma anche di migliorarne l'immagine percepita dal consumatore. Il loro impiego può divenire un approccio vincente dal punto di vista economico e lodevole per il carattere nutrizionale quando è associato con alimenti adeguatamente presenti nelle diete dei consumatori, eventualmente già in possesso di componenti di interesse salutistico nonché accattivanti per le più ampie fasce di età. Candidato in possesso della totalità dei requisiti sembra essere il cioccolato fondente. Dunque, l'impiego di probiotici potrebbe enfatizzare ed arricchire la valenza salutistica del cioccolato fondente. Oggi, il mercato è in grado di offrire preparazioni arricchite di probiotici a base di cioccolato a latte o a basse concentrazioni di cioccolato fondente. Questo perché l'elevato contenuto di polifenoli del cioccolato fondente potrebbe rappresentare una condizione proibitiva per la vitalità di microrganismi probiotici ed inoltre occorre tener conto che la presenza, in altri cioccolati, di latte e di più elevate concentrazioni di burro di cacao potrebbe meglio proteggere i probiotici al passaggio gastro-enterico. Dunque sembrerebbe poco possibile la coniugazione dei due importanti caratteri salutistici, polifenoli e probiotici.

Sulla base di quest'ultima considerazione, altra parte del lavoro (attività II) svolto durante il dottorato di ricerca ha preliminarmente inteso valutare la sopravvivenza di lattobacilli probiotici in cioccolato fondente ricco di polifenoli e quindi indagare in merito all'eventuale effetto protettivo espresso dal cioccolato fondente nei confronti dei probiotici durante il passaggio gastro intestinale.

Ultima attività di ricerca (attività III) ha avuto come oggetto lattobacilli isolati da diverse matrici (caciocavallo e feci di infanti): nello specifico, è stata valutata la sopravvivenza di ceppi di *Lb. rhamnosus* (di origine umana ed alimentare) in seguito ad esposizione sia a stress acido (pH 2,0-2,5-3.0) sia a stress acido in

presenza di pepsina, seguiti dall'esposizione ai sali biliari. Tali attività rappresentano uno screening preliminare al fine di valutare le potenziali caratteristiche probiotiche dei ceppi oggetto di studio. Infine, è stato valutato l'eventuale effetto protettivo esercitato dalla caseina nei confronti delle avverse condizioni di acidità.

CAPITOLO 6
MATERIALI E METODI (attività I)

Formulazioni probiotiche

Nove formulazioni commerciali, contenenti colture monoceppo o multiceppo di specie di *Lactobacillus* spp e *Streptococcus* spp, sono state acquistate, conservate alla temperatura di 4°C ed analizzate prima della data di scadenza. Le principali caratteristiche dei prodotti sono riportate nella tabella ….. La simulazione degli stress gastrointestinali in vitro è stata preceduta dell'enumerazione dei LAB vitali in ciascuna formulazione farmaceutica e dall'accertamento dell'identità di specie, confrontando i risultati con quelli riportati in etichetta. Tali obiettivi sono stati raggiunti applicando metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti.

Enumerazione presuntiva ed isolamento di batteri vitali

Il contenuto liofilizzato di una bustina di ciascun preparato farmaceutico è stato pesato asetticamente e diluito 1:10 in soluzione fisiologica sterile (9 g/L NaCl). La formulazione J, in compresse, è stata triturata direttamente all'interno del blister per impedire contaminazioni e successivamente diluita 1:10 in soluzione fisiologica sterile. I campioni sono stati omogenizzati in uno Stomacher 400 Lab Blender (PBI International, Milano, Italia) fino alla loro completa dissoluzione. Le diluizioni seriali decimali sono state piastrate in appropriati substrati colturali ed incubate nelle condizioni ottimali come segue:

Lactobacillus bulgaricus e *Lb. casei* (formulazione A) sono stati enumerati rispettivamente in MRS agar (Oxoid, Milano, Italia) a pH 5,2 incubato a 43°C e in MRS + 0,01% di vancomicina incubato a 37°C. Le formulazioni contenenti *Lb. rhamnosus* (B e C), *Lb. casei* (E), *Lb. paracasei* (F) e *Lb. reuteri* (J) come uniche specie sono state piastrate in MRS agar (Oxoid) incubato a 37°C. *Lb. paracasei* e *Lb. salivarius* (formulazione D) sono stati enumerati in maniera differenziale in Homofermentative-Heterofermentative Differential (HHD) agar incubato a 37°C. Il Tryptone Soy Agar incubato a 37°C è stato utilizzato per enumerare *Bacillus coagulans* nella formulazione G, che viene indicato in etichetta erroneamente con

il nome di "Lactobacillus sporogenes". *Lb. acidophilus* e *Lb. coagulans* dalle formulazioni G ed H sono stati rispettivamente enumerati in maniera differenziale in BA-maltose agar incubato a 37°C o in MRS pH 5,2 incubato a 43°C (Tharmaraj & Shah, 2003). *Streptococcus thermophilus*, contenuto nelle formulazioni G e H, è stato contato in M17 agar ed in ST agar, incubato a 37°C rispettivamente per 72 ore o per 24 ore, come descritto da Dave e Shah (1996). L'incubazione è stata eseguita in condizioni di anaerobiosi (Anaerogen, Oxoid, Milano, Italia), tranne che per *B. coagulans* (Lb sporogenes) e per *S. thermophilus*, che hanno richiesto condizioni aerobiche di incubazione. MRS agar (Oxoid) incubato a 37°C è stato regolarmente usato per confermare le cariche dei lattobacilli e, quando necessario, per l'isolamento delle colonie.

Le conte sono state effettuate in duplicato su 2 differenti dosi appartenenti alla stessa confezione.

Un numero di colonie compreso tra 5 e 10, di varie forme e colori, sono state raccolte a caso dalle piastre agarizzate contenenti un numero di colonie compreso tra 30 e 300, successivamente sono state purificate e conservate in microbank (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canada) (Succi *et al*., 2007) alla temperatura di - 80°C.

Sopravvivenza dopo gli stress gastrointestinali

Come fatto in precedenza, gli esperimenti sono stati condotti in doppio su due diverse dosi appartenenti alla stessa confezione, seguendo il protocollo descritto da de Palencia e colleghi (2008) e da Ritter e colleghi (2009) con alcune modifiche.

In dettaglio, una dose di ciascuna formulazione farmaceutica è stata trasferita in una bottiglia Drechsel sterile da 100 mL (Carlo Erba, Milano, Italia) collegata ad una bombola di azoto, e ad ogni bottiglia sono stati aggiunti 45 mL di acqua sterile. Al fine di simulare la composizione della saliva in vivo, sono stati aggiunti 10 mL di una soluzione elettrolitica sterile (6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, 0,22 g/L CaCl2 e 1,2 g/L NaHCO3) e lisozima (Sigma-Aldrich) allo 0,01% (concentrazione finale). Per simulare l'ambiente gastrico, sono stati aggiunti 10 mL di soluzione elettrolitica contenente pepsina (0,3%, concentrazione finale,

Sigma-Aldrich), e successivamente il pH è stato corretto al valore di 2,0 aggiungendo HCl 1,0 M. I campioni sono stati incubati per 60 minuti in condizione di anaerobiosi. Per simulare lo stress intestinale, si è provveduto a sostituire l'ossigeno con l'azoto per ottenere un'atmosfera anaerobica, ed il pH è stato portato al valore di 5,0 con una soluzione satura di bicarbonato di sodio (8 g di bicarbonato di sodio in 100 mL di acqua distillata, sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti). Successivamente, sono stati aggiunti 8 mL di una soluzione elettrolitica sterile contenente sali biliari allo 0,45% e pancreatina all'1% (concentrazioni finali, Sigma-Aldrich). Infine, il pH è stato corretto al valore di 6,3 e lentamente portato a 7,5 fino alla fine dell'esperimento (durato 7 ore).

Le soluzioni utilizzate sono state preparate al momento e le prove sono state eseguite alla temperatura di 37°C.

La vitalità dei ceppi presenti nelle preparazioni utilizzate è stata saggiata attraverso la conta in piastra effettuata come segue:

a) MRS 37°C in condizioni di anaerobiosi per i lattobacilli;
b) M17 37°C in condizioni di anaerobiosi per *Streptococcus thermophilus*;
c) TSA 37°C in condizioni di anaerobiosi per i batteri sporigeni.

Estrazione del DNA dalle colture pure

Le colture pure isolate da ciascuna formulazione farmaceutica e conservate a –80°C sono state dapprima rivitalizzate nei substrati opportuni. In seguito, 2 mL di ciascuna brodocoltura overnight è stata centrifugata a 14.000 g per 10 minuti a 4°C (Centrifuga 5415 R; Eppendorf, Hamburg, Germany) ed il pellet cellulare è stato sottoposto al protocollo di estrazione del DNA descritto da Querol e colleghi (1992) con l'aggiunta di lisozima (25 mg/mL, Sigma) e mutanolisina (10 U/mL, Sigma) per la digestione della parete cellulare batterica.

Ciascuna miscela ottenuta dal processo di estrazione è stata diluita 70 volte utilizzando acqua deionizzata sterile (10 µl di DNA diluito in tampone TE + 690 µl di acqua) e sottoposta ad una lettura spettrofotometrica nel campo della luce ultravioletta, in cuvette di quarzo, alla lunghezza d'onda di 260 nm, in accordo con quanto descritto da Sambrook e colleghi (1989); il valore ottenuto è stato poi

utilizzato per calcolare la concentrazione, espressa in µg/ml, di DNA effettivamente estratto usando la formula :

$$\mu g/\mu l \text{ DNA} = A \times d \times 0{,}05/c.o.$$

dove

A = assorbanza a 260 nm;

d = diluizione del campione;

0,05 = costante di calcolo per DNA a doppia elica;

c.o. = cammino ottico della cuvetta (1 cm).

Il DNA quindi è stato opportunamente diluito con acqua deionizzata sterile calcolando gli esatti volumi dalla seguente formula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

dove

C_1 = concentrazione iniziale del DNA;

V_1 = volume di DNA concentrato da prelevare;

C_2 = concentrazione desiderata di DNA (100 ng);

V_2 = volume finale

Parallelamente è stata valutata la purezza dei campioni di DNA tenendo conto del rapporto tra il valore di assorbanza a 260 nm e quello ottenuto alla lunghezza d'onda di 280 nm: tale rapporto è sempre risultato compreso tra 1.8 e 2.0, indice di campioni ad elevato grado di purezza.

Amplificazione del DNA

La reazione di amplificazione che precede la corsa elettroforetica in gradiente di denaturante è stata condotta con la massima accuratezza per evitare inquinamenti esogeni dei campioni e dei reagenti. La preparazione della miscela di reazione è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare e i reagenti sono stati tenuti sotto cappa e in ghiaccio, prima e dopo la miscelazione, sino alla fase di

amplificazione. Al fine di ottenere gli ampliconi da differenziare in un secondo tempo tramite DGGE, è stata eseguita una reazione di PCR per il DNA dei batteri lattici utilizzando i primers che amplificano la regione variabile V1 del gene che codifica per l'rRNA 16S, aventi tali sequenze:

- P1V1 (5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') (Cocolin *et al*. 2001)
- P2V1 (5'-TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC-3') (Rantsiou *et al*. 2005)

All'estremità 5' del primer P1V1, inoltre, è stata attaccata una coda GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') (Sheffield et al., 1989): tale accorgimento consente di prevenire la completa denaturazione degli ampliconi, permettendone dunque la rilevazione.
La miscela di reazione, avente volume finale di 50 µl, era così costituita:

Buffer	10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl
dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0.2 mM per ciascuna classe nucleotidica
MgCl2	1.5 mM
Primer senso	0.2 µM
Primer antisenso	0.2 µM
Taq polimerasi	1.25 UI

Preparato e porzionato il mix, si è proceduto al caricamento di 2 µl (circa 200 ng) di DNA campione. Come controllo di reazione, è stata aggiunta ai campioni una prova in bianco, dove il DNA stampo è stato sostituito con acqua. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate come descritto da Reale e colleghi (2011), in termociclatore MASTERCYCLER GRADIENT (EPPENDORF, Hamburg, Germany) usando il seguente ciclo di amplificazione:

Denaturazione	95°C per 1 minuto
Annealing	45°C per 1 minuto
Estensione	72°C per 1 minuto

Il primo ciclo è stato preceduto da uno step iniziale a 95°C per 5 minuti; dopo 35 cicli, c'è stato uno step di estensione finale alla temperatura di 72°C della durata di 7 minuti.

Per confermare l'avvenuta amplificazione, prima di eseguire l'analisi DGGE è stata effettuata una breve corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% p/v . L'agarosio (Sigma, Italia) è stato sciolto nel tampone fino al raggiungimento dell'illimpidimento della soluzione; successivamente, una volta raggiunta la temperatura di circa 50°C è stato versato nello stampo di formatura. In seguito, sono stati miscelati 7 µl dell'amplificato e 3 µl di colorante Gel Loading Buffer. Il tampone di corsa è stato il TBE (Tris Borato EDTA) 0.5X. Ogni miscela è stata caricata in un pozzetto e sottoposta a corsa elettroforetica dapprima a 40V per 10 minuti, e successivamente a 120V per 60 minuti. Alla fine della corsa, il gel è stato colorato in una soluzione di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 50 µg/ml per circa 30 minuti. Dopo decolorazione in acqua per circa 40 minuti, si è proceduto all'acquisizione delle immagini mediante l'impiego del GEL DOC XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Analisi DGGE

Per analizzare gli ampliconi ottenuti dai campioni di batteri lattici collezionati, è stato usato il DCode^{TM} Universal Mutation Detection System (BioRad, CA, USA). L'elettroforesi è stata eseguita in gel di poliacrilamide (8% [p/v] acrilamide:bisacrilamide 37.5:1) dello spessore di 0.8 mm, utilizzando un range di denaturante compreso tra il 40% ed il 60%, crescente nella direzione della corsa elettroforetica.

Le soluzioni denaturanti utilizzate sono state ottenute partendo da una soluzione base di acrilamide-bisacrilamide al 40% p/v (37.5:1 acrialmide/bisacrilamide), TAE buffer 50X e acqua deionizzata sterile, a cui sono state aggiunte formamide e

urea per ottenere le percentuali denaturanti volute, come riportato nella seguente tabella:

Reagenti	Concentrazioni	
	40%	60%
Formamide (ml)	16	24
Urea (g)	16.8	25.2

La soluzione a concentrazione più alta è stata chiamata HIGH, la più bassa LOW, ed entrambe sono state conservate alla temperatura di 4°C. Prima di preparare il gel, è stato necessario preparare tutto l'occorrente sul banco di lavoro, vista la rapidità con cui si deve operare. La polimerizzazione dell'acrilamide avviene, infatti, in 7-10 minuti dopo l'aggiunta del TEMED (15 µl in 15 ml di ciascuna soluzione denaturante) e dell'APS al 10% p/v (150 µl in ciascuna soluzione denaturante). Quindi, dopo lieve agitazione, le due soluzioni denaturanti sono state caricate velocemente in due siringhe, a loro volta agganciate ad una ruota che, mossa con regolarità, ha permesso la creazione di un gradiente orizzontale di denaturante. Dopo 1 ora di polimerizzazione, sono stati rimossi i pettini ed i pozzetti formati sono stati lavati con tampone TAE 1X. I gel sono stati montati su uno specifico supporto che è stato immerso nella vasca di corsa quando il tampone di corsa (TAE 1X) raggiungeva la temperatura di 60°C. A questo punto, 7 µl di ciascun campione di DNA amplificato sono stati mescolati con 7 µl di Gel Loading Dye e caricati nei vari pozzetti con puntali dotati di capillari. La corsa elettroforetica è stata impostata ad un voltaggio costante di 120V, per 5 ore, alla temperatura costante di 60°C. Al termine della corsa elettroforetica, i gel sviluppati fino a questo momento sono stati colorati attraverso immersione in soluzione di TAE 1X contenente 50 µg/ml di bromuro di etidio, per 20 minuti al buio. Successivamente, i gel sono stati esaminati e fotografati mediante l'impiego del GEL DOC XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), usando il software Quantity One Analysis (Bio-Rad). Per valutare il grado di similitudine tra i profili DGGE dei ceppi isolati, per studiarne le relazioni ed identificarli a livello di specie è stato utilizzato il software GEL COMPARE II (Applied Maths, Kortrijk,

Belgium) che, attraverso l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) (Vauterin and Vauterin, 1992) il quale ha assegnato un valore alle varie bande in base ad intensità e peso molecolare, ha calcolato le similarità tra i profili dei vari ceppi mediante coefficiente di correlazione "product-moment" di Pearson. Alla fine è risultato un dendrogramma, dove le bande corrispondenti ai diversi ceppi sono state disposte in base al grado di similarità trovato.

Sequenziamento

Un ceppo rappresentativo da ogni cluster ottenuto con l'analisi DGGE è stato scelto per l'amplificazione utilizzando i primer P1V1 e P4V3, che amplificano 700 bp della regione V1-V3 del 16S rDNA. La sequenza dei primer è la seguente (Klijn *et al*., 1991):

- P1V1 (senso) 5' – GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC – 3'
- P4V3 (antisenso) 5' – ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC – 3'

Il volume finale della miscela di reazione è stato di 100 µl, così costituiti:

Buffer	100 mM Tris HCl, ph 8.3, 50 mM KCl
dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,2 mM ognuno
$MgCl_2$	1,5 mM
Primer P1V1	0,2 µM
Primer P4V3	0,2 µM
Taq polimerasi	1,25 UI

Le amplificazioni sono state eseguite in termociclatore MASTERCYCLER GRADIENT (Eppendorf, Hamburg, Germany) usando il seguente ciclo di amplificazione:

Denaturazione iniziale	95°C x 5 minuti
Denaturazione Annealing Estensione	95°C x 1 minuto 42°C x 1 minuto 72°C x 1,5 minuti
Estensione finale	72°C x 7 minuti

Dopo una reazione di purificazione (QIAquick PCR Purification kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germania), che ha permesso di allontanare dal DNA i primers, i nucleotidi in eccesso, la polimerasi ed i sali i campioni sono stati inviati ad una facility per il sequenziamento (Eurofins MWG Biotech Company, Ebersberg, Germania). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state allineate con quelle presenti in GenBank attraverso il programma Blast, sulla base della parziale omologia con il gene rRNA 16S.

Estrazione diretta del DNA dalle preparazioni e PCR-DGGE

L'estrazione diretta del DNA dalle formulazioni farmaceutiche è stata eseguita secondo il protocollo di Iacumin e colleghi (2009). Il DNA ottenuto da ciascun campione è stato successivamente sottoposto a reazioni di PCR-DGGE, come descritto in precedenza.

Non è chiara la seconda parte del paragrafo 2.6 del lavoro

CAPITOLO 5
MATERIALI E METODI (attività II)

5.1 Cioccolato

E' stato utilizzato cioccolato fondente all'80% di cacao e in possesso di un livello di composti fenolici pari a 20 mg/g.
Il cioccolato, reperito presso distributori specializzati, è stato conservato nelle opportune condizioni secondo quanto riportato nella scheda tecnica e quindi sciolto a bagnomaria al momento dell'utilizzo per la preparazione di cioccolatini monodose prevedenti l'impiego di microrganismi probiotici.

5.2 Probiotici utilizzati

Sono stati utilizzati lattobacilli probiotici disponibili in commercio sotto forma di formulati liofilizzati o in compressa. In dettaglio sono stati utilizzati i ceppi *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. paracasei* F19, e Lb. casei DG disponibili in commercio in forma liofilizzata e il ceppo *Lb. reuteri* DSM17938 disponibile in commercio in forma liofilizzata-compressa. In tabella 6 sono riportate le caratteristiche delle quattro preparazioni probiotiche utilizzate.

Tabella 6 Caratteristiche delle preparazioni probiotiche utilizzate

Preparazione	Ceppo	Forma	Concentrazione dichiarata	Concentrazione riscontrata
Dicoflor®	*Lb. rhamnosus* GG	Liofilizzata in polvere	6,0*10^9	8,8*10^9
Genefilus®	*Lb. paracasei* F19	Liofilizzata in polvere	1,2*10^10	1,1*10^9
Enterolactis®	*Lb. casei* DG	Liofilizzata in polvere	2,4*10^10	4,8*10^9
Reuterin®	*Lb. reuteri* DSM 17938	Liofilizzata compressa	1,0*10^8	1,6*10^8

Preventivamente, attraverso un precedente studio condotto presso il Dipartimento, è stata accertata la concentrazione al fine di valutare la congruenza rispetto a quanto riportato in etichetta.

Dal raffronto tra le concentrazioni riscontrate e quelle dichiarate in etichetta è emersa una buona corrispondenza fra i due dati per le preparazioni Dicoflor e Reuterin.

Per le altre due preparazioni, quali Genefilus e Enterolactis carica microbica evidenziata dal conteggio in piastra è risultata di circa un logaritmo (90% delle cellule) più bassa rispetto alla concentrazione dichiarata in etichetta. Tuttavia, in questi due preparati le cellule vitali sono risultate in numero comunque molto alto, ovvero superiore a 10^9 UFC/dose

5.3 Inclusione di probiotici in cioccolatini monodose

Sono state realizzate preparazioni monodose a base di cioccolato fondente arricchite di differenti microrganismi probiotici. A tal proposito il cioccolato portato in forma liquida mediate trattamento in bagnomaria a 40 °C è stato suddiviso in quattro differenti lotti. Il cioccolato di ciascun lotto è stato distribuito in stampi capaci di accogliere circa 15 grammi di cioccolato. Quindi in ogni stampo, in funzione del lotto di appartenenza, è stato aggiunto il contenuto della bustina o capsula (triturata) della relativa preparazione probiotica.

Lotto	Ceppo	preparazione
GG	*Lb. rhamnosus* GG	Dicoflor
F19	*Lb. paracasei* F19	Genefilus
DG	*Lb. casei* DG	Enterolactis
DSM	*Lb. reuteri* DSM 17938	Reuterin

Le preparazioni ottenute sono state confezionate in carta argentata sterile e frigo-conservate a 15 °C.

5.4 Valutazione della sopravvivenza

Al fine di valutare la sopravvivenza dei ceppi probiotici oggetto dello studio al momento della preparazione (tempo 0) e dopo 24 ore, 7 e 40 giorni sono stati valutati i livelli di carica di ciascun lotto mediante conteggio vitale in piastra. A proposito, il cioccolato di una preparazione proveniente da ciascun lotto è stato prelevato asetticamente, pesato e addizionato di soluzione fisiologica sterile (9 g/l di NaCl) in rapporto 1:10. Dopo omogeneizzazione dei campioni in Stomacher (Seward Medical, London, UK) per 2 min, sono state allestite le diluizioni decimali impiegate per il piastramento e i conteggi microbici. Le analisi sono state effettuate in doppio. I differenti microrganismi sono stati contati su piastre di MRS (OXOID, Milano) dopo 72 ore di incubazione a 37° C in condizione di anaerobiosi (Gas Pack Anaerobic System). Le analisi sono state condotte in doppio. I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante OriginPro 7.5 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5.5 Sopravvivenza allo stress gastro-intestinale

5.5.1 Inclusione dei probiotici GG e F19 in cioccolatini monodose

Il cioccolato portato in forma liquida mediate trattamento in bagnomaria a 40 °C è stato suddiviso in quattro differenti lotti. Il cioccolato di ciascun lotto è stato distribuito in stampi capaci di accogliere circa 15 grammi di cioccolato. Quindi, in ogni stampo, in funzione del lotto di appartenenza, è stato aggiunto il contenuto della bustina (triturata) della relativa preparazione probiotica contenente *Lb. rhamnosus* GG o *Lb. paracasei* F19.

5.5.2 Simulazione del transito gastrointestinale

Al fine di valutare la sopravvivenza dei lattobacilli al transito gastro intestinale e di valutare l'eventuale effetto protettivo esercitato dal cioccolato nei confronti dei

probiotici durante tale transito è stato sviluppato un adeguato disegno sperimentale tale da simulare le condizioni simulanti il transito gastro-intestinale. In dettaglio, i cioccolatini monodose includenti i probiotici e, come controllo, le rispettive preparazioni probiotiche sono state sottoposte a trattamenti per 5 minuti a 37 °C con la soluzione elettrolitica simulante la saliva (tipica della bocca e del tratto esofageo), per 120 minuti a 37 ° C con la soluzione gastrica (tipica dello stomaco) nonché per 60 minuti a 37 ° C con la soluzione elettrolitica simulane i succhi gastrici tipici del tratto duodenale.

Nello specifico la soluzione elettrolitica la saliva risultava essere costituita da 6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, o,22 g/L $CaCL_2$, 1,2 g/L $NaHCO_3$ e 100 ppm lisozima ed in possesso di un pH pari a 6,9.

La soluzione elettrolitica simulante il succo gastrico risultava costituita da 6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, o,22 g/L $CaCL_2$, 1,2 g/L $NaHCO_3$, 0,3% pepsina e caratterizzata da un pH pari a 2,5. Tali valori di pH venivano raggiunti impiegando HCl 5 M.

La soluzione simulante i succhi gastrici era caratterizzata da un pH pari a 7, raggiunto attaverso l'impiego di una soluzione satura di bicarbonato e costituita da 0,8 g/L di $NaHCO_3$, 2,0% di sali biliari e dallo 0,1% di pancratina.

La sopravvivenza dei probiotici è stata valutata mediante conteggio vitale in piastra dopo ciascun tempo di incubazione nelle tre differenti soluzioni elettrolitiche. Il conteggio vitale in piastra è stato condotto come riportato nel paragrafo 6.4

MATERIALI E METODI (attività III)

PREPARAZIONE E PRELIEVO DEI CAMPIONI SPERIMENTALI

I campioni alimentari oggetto di studio (caciocavallo ed intermedi di lavorazione) sono stati preparati presso il caseificio Barone, situato nel comune di Vinchiaturo (CB), secondo il convenzionale protocollo utilizzato dall'azienda produttrice, ma impiegando un sieroinnesto ottenuto lasciando acidificare del siero risultante da una precedente lavorazione per 24 ore a 40°C ± 2.

In seguito è stata avviata la produzione del caciocavallo impiegando del latte crudo fresco con aggiunta di caglio liquido microbico (40 mg/L) e sieroinnesto al 3% v/v.

I campioni di feci utilizzati provengono da infanti di età compresa tra i 3 ed i 10 mesi, nati con parto naturale ed allattati al seno.

I campioni da sottoporre ad analisi sono stati prelevati asetticamente, trasportati presso i laboratori del DiAAA (Dipartimento Agricoltura Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise) in contenitori sterili, mantenuti alla temperatura di 4°C e processati entro due ore dal prelievo.

ISOLAMENTO DEI BATTERI LATTICI

I campioni oggetto di studio sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche tradizionali nell'ambito di un progetto di più ampio respiro.

Da ciascuna piastra di MRS concernente i campioni analizzati e contenente un numero di colonie compreso tra 30 e 300, sono state isolate 5 colonie con differente morfologia. Le colonie isolate sono state sottoposte a purificazione per striscio superficiale su substrato nutritivo agarizzato. Gli isolati ottenuti sono stati conservati in glicerolo sterile (40%) alla temperatura di – 30 °C. La totalità degli isolati è stata riattivata mediante doppio passaggio in brodo di coltura sterile e sottoposta a preliminare caratterizzazione fenotipica.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEI BATTERI LATTICI ISOLATI

I batteri lattici isolati sono stati sottoposti a preliminare caratterizzazione fenotipica e biochimica attraverso le seguenti analisi:

- osservazione al microscopio;
- colorazione di Gram;
- saggio della catalasi.

OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

L'osservazione al microscopio ha consentito di determinare la morfologia dei LAB isolati e il loro grado di purezza. Gli isolati che non costituivano colture pure sono stati sottoposti a successiva purificazione come descritto in precedenza.

Le osservazioni sono state eseguite su brodocolture di microrganismi "over-night" con microscopio ottico a contrasto di fase a 1000 ingrandimenti (ZEISS Axiophot).

COLORAZIONE DI GRAM

Brodocolture over night di LAB isolati sono state fissate mediante calore su vetrini porta oggetto, sui quali è stata eseguita la colorazione di Gram secondo la metodica prevista. I vetrini ottenuti sono stati osservati al microscopio con obiettivo a immersione 100X senza contrasto di fase.

SAGGIO DELLA CATALASI

Su un vetrino portaoggetti è stata mescolata una goccia di brodocoltura e una di H_2O_2 al 10%. Lo sviluppo di bollicine di gas è stato ritenuto come indice di positività all'attività catalasica. Questa prova, consente di suddividere i microrganismi in due categorie:

- batteri CATALASI + , cioè capaci di scindere l'H_2O_2 in H_2O e ½ O_2;
- batteri CATALASI - , incapaci di compiere tale reazione.

ESTRAZIONE DEL DNA, PCR-DGGE E SEQUENZIAMENTO

Le colture pure isolate sia da campioni alimentari che biologici sono state dapprima rivitalizzate nei substrati opportuni, e successivamente sottoposte ad analisi genetica per risalire all'identificazione a livello di specie. I protocolli utilizzati per l'estrazione del DNA, l'amplificazione, l'elettroforesi in gradiente di denaturante degli ampliconi ottenuti e l'amplificazione per il sequenziamento sono stati gli stessi descritti nei paragrafi ……

CEPPI DI LB. RHAMNOSUS UTILIZZATI

I ceppi identificati quali appartenenti alla specie *Lb. rhamnosus* e sottoposti alle successive prove di laboratorio sono illustrati nella tabella seguente:

Tabella Ceppi utilizzati nell'attività III, e matrice di isolamento

Ceppo	Origine
GG	Preparazione farmaceutica
34	Sieroinnesto
39	Sieroinnesto
40	Caciocavallo
50	Caciocavallo
FLC1	Feci neonato
FLC4	Feci neonato
FLC5	Feci neonato
FL3	Feci neonato

Come si può evincere, è stato utilizzato anche il ceppo GG, isolato dalla preparazione farmaceutica DICOFLOR©.
Tali ceppi, conservati in glicerolo sterile (40%) alla temperatura di – 30 °C, sono stati riattivati con due successivi passaggi in MRS Broth (OXOID) ed incubati alla temperatura di 37 °C prima di essere sottoposti alle successive analisi.

Esposizione a stress acido e biliare

Ciascun ceppo oggetto di analisi, riattivato come descritto in precedenza, è stato impiegato per effettuare un inoculo all'1% di 100 mL di MRS Broth, e le brodocolture così ottenute sono state incubate overnight alla temperatura di 37°C. Al termine di tale periodo di incubazione, si è provveduto al porzionamento di ciascuna brodocoltura in 4 aliquote di uguale volume (25 ml), in 4 tubi monouso sterili (FALCON) da 50 mL.
Ciascuna aliquota è stata centrifugata a 6000 rpm per 5 minuti, il pellet così ottenuto è stato sottoposto a doppio lavaggio con PBS 1X, al fine di rimuovere eventuali residui metabolici e colturali.
Al fine di valutare la sopravvivenza in seguito all'esposizione allo stress acido, per ciascun ceppo sono state, quindi, realizzate quattro diverse condizioni sperimentali: il pellet di una delle aliquote è stato risospeso in 25 mL di soluzione fisiologica sterile 0,9% (controllo), mentre i pellets delle altre aliquote sono stati risospesi ognuno in 25 mL di soluzione fisiologica sterile 0,9% acidificata a 3 diversi valori di pH, ovvero 2.0, 2.5 e 3.0. Tutte le soluzioni utilizzate sono state preventivamente sterilizzate in autoclave ed incubate alla temperatura di 37 °C. Per correggere il pH è stato utilizzato HCl sterile 1M.
Subito dopo la risospensione del pellet, da ogni tubo è stato prelevato 1 mL e sottoposto a diluizioni decimali al fine di enumerare i microrganismi prima della loro esposizione allo stress acido (t0). Successivamente, i 4 tubi sono stati incubati alla temperatura di 37 °C per 90 minuti (t90), al termine dei quali si è proceduto ad un ulteriore prelievo di 1 mL per valutare la sopravvivenza dei ceppi al termine dello stress acido. Il conteggio, dopo incubazione in condizione di anaerobiosi alla

temperatura di 37 °C, è stato effettuato su due tipi di substrati colturali: in MRS Agar dopo 24-48 ore di incubazione, e in MRS Agar addizionato dello 0,3 % di sali biliari (BIOLIFE) dopo 5 giorni di incubazione, per valutare l'eventuale azione battericida esercitata dai sali di bile.

Esposizione a stress acido e biliare, in presenza di pepsina

La sopravvivenza dei ceppi oggetto di studio è stata valutata sottoponendoli ad un ulteriore fattore di stress, rappresentato dalla pepsina, un enzima proteolitico facente parte del succo gastrico. A tal fine, i ceppi sono stati riattivati e processati come descritto in precedenza (paragrafo …). Tuttavia, per questa indagine sono state realizzate solo tre condizioni sperimentali (non è stata presa in considerazione quella di controllo), e le soluzioni fisiologiche acidificate utilizzate in questo caso sono state addizionate al momento delle analisi con pepsina 0,3% (concentrazione finale, SIGMA-ALDRICH) e sterilizzate a freddo con filtri 0,22 μm.

Effetto protettivo della caseina

Come ulteriore indagine, è stato valutato l'eventuale effetto protettivo svolto dalla caseina sulla vitalità dei ceppi oggetto di studio quando sottoposti agli stress esercitati dall'acido e dalla pepsina.
I ceppi sono stati dapprima riattivati e processati come descritto in precedenza (paragrafo). Anche per questa indagine sono state realizzate solo tre condizioni sperimentali (pH 2,0, pH 2,5, pH 3,0), e le soluzioni fisiologiche acidificate utilizzate in questo caso sono state addizionate con pepsina 0,3% (concentrazione finale, SIGMA-ALDRICH) e sterilizzate a freddo con filtri 0,22 μm.
L'effetto protettivo è stato dunque indagato addizionando a ciascun pellet, rispettivamente, diverse concentrazioni di caseina (concentrazione finale, 2%, 1% e 0,5%) (SIGMA-ALDRICH). Il conteggio sia a t0 che a t90, dopo incubazione in condizione di anaerobiosi alla temperatura di 37 °C, è stato effettuato in MRS

Agar, ed in MRS Agar addizionato con sali biliari allo 0,3%, dopo 24-48 ore di incubazione.

CAPITOLO
RISULTATI

Le colture probiotiche, eventualmente incluse in alimenti, devono essere assunte per via orale e devono essere in grado di sopravvivere al transito gastrointestinale in un numero elevato (Succi et al. 2014) Dunque, un prerequisito essenziale è rappresentato dalla presenza di cariche microbiche sufficientemente alte e tali da garantire la colonizzazione dell'intestino nonostante la probabilità che un numero più o meno elevato di batteri non sia in grado di resistere alle ingiurie costituite principalmente dalla acidità gastrica e dalla presenza di bile nel piccolo intestino (Succi 2005).
Ulteriore requisito è rappresentato dalla capacità di resistere agli stress gastro-intestinali e quindi raggiungere le porzioni intestinali più avanzate.
Di seguito sono riportati i risultati relativi alle attività precedentemente descritte.

ATTIVITA' I

Conte vitali prima e dopo gli stress GI

Le cariche microbiche riportate sull'etichetta delle formulazioni farmaceutiche sono state confrontate con quelle ottenute mediante il conteggio in piastra (tabella).

Tabella

		CFU dose $^{-1}$		CFU dose $^{-1a}$	
Campione	Specie	Etichetta	Substrato[b]	Rilevata	Rilevata dopo stress GI
A	*Lactobacillus bulgaricus*	4,0 x 10^9	MRS pH 5,2	ND	
	Lactobacillus casei	1,6 x 10^{10}	MRS-V	4,6 x 10^8 (±0,2)	
			MRS 37°[c]	4,9 x 10^8 (±0,2)	3,8 x 10^1 (±0,4)
B	*Lactobacillus rhamnosus* XX	6,0 x 10^9	MRS 37°	4,4 x 10^8 (±0,2)	5,8 x 10^2 (±0,3)
C	*Lactobacillus rhamnosus* XX	6,0 x 10^9	MRS 37°	3,5 x 10^8 (±0,4)	3,5 x 10^2 (±0,4)
D	*Lactobacillus paracasei* XX	0,1-10 x 9[d]	HHD	1,4 x 10^7 (±0,3)	
	Lactobacillus salivarius XX (12:1)		HHD	2,0 x 10^7 (±0,3)	
			MRS 37°[c]	3,6 x 10^7 (±0,2)	1,2 x 10^3 (±0,3)
E	*Lactobacillus casei sub. casei* XX	8,0 x 10^9	MRS 37°	3,8 x 10^7 (±0,2)	1,3 x 10^3 (±0,2)
F	*Lactobacillus paracasei sub. paracasei* XX	1,25 x 10^{10}	MRS 37°	7,1 x 10^8 (±0,2)	2,4 x 10^3 (±0,2)
G	*Lactobacillus sporogenes*	1,5 x 10^{9d}	TSA 37°	1,0 x 10^7 (±0,1)	3,6 x 10^5 (±0,3)
	Lactobacillus acidophilus		BA-M	2,2 x 10^8 (±0,2)	
	Lactobacillus bulgaricus		MRS pH 5,2	ND	
			MRS 37°[c]	3,6 x 10^8 (±0,2)	4,5 x 10^6 (±0,2)
	Streptococcus thermophilus		M17 37°	2,0 x 10^7 (±0,2)	6,4 x 10^4 (±0,4)
			ST 37°	ND	
H	*Lactobacillus acidophilus* XX	1,0 x 10^7	BA-M	ND	
	Lactobacillus delbrueckii XX	5,0 x 10^6	MRS pH 5,2	ND	
			MRS 37°[c]	8,0 x 10^7 (±0,3)	6,0 x 10^2 (±0,2)
	Streptococcus thermophilus XX	4,0 x 10^9	M17 37°	2,7 x 10^9 (±0,1)	5,3 x 10^2 (±0,3)
			ST 37°	ND	
J	*Lactobacillus reuteri* XX	1,0 x 10^8	MRS 37°	8,3 x 10^8 (±0,2)	7,7 x 10^3 (±0,3)

a I dati in tabella sono riportati come media ± DS, ottenuti da due repliche

b L'incubazione è stata eseguita a 37°C, mentre per MRS pH 5,2 è stata eseguita a 43°C

c La carica totale dei lattobacilli è stata confermata in MRS per le formulazioni multiceppo

d E' riportata la carica microbica totale

Nella formulazione A, le cariche microbiche sono risultate comparabili in MRS 37 °C (ordine 10^8) ed in MRS-V, usato per la conta selettiva di Lb. casei in presenza di Lb. bulgaricus (14); la presenza del solo ceppo Lb. casei è sembrata confermata dai risultati delle conte in MRS pH 5,2 usato per l'enumerazione selettiva di Lb. bulgaricus (Tharmaraj & Shah, 2003), che hanno evidenziato l'assenza di colonie in piastra. In generale, la carica di lattobacilli in questo prodotto è risultata di 1 – 1,5 cicli logaritmici inferiore rispetto a quella riportata in etichetta.

La carica microbica registrata nei diversi substrati utilizzati per enumerare i lattobacilli nella formulazione D è risultata dell'ordine di 10^7 , ovvero di due cicli inferiore rispetto a quella riportata in etichetta. In dettaglio, le conte selettive di Lb. paracasei e Lb. salivarius in HHD sono state eseguite considerando le colonie bianche appartenenti alla prima specie, e quelle blu-verdi appartenenti alla seconda specie. Questi risultati sono stati confermati dalle conte eseguite in MRS 37°C.

Nella formulazione multiceppo G non sono state individuate colonie in MRS pH 5,2, mentre in BA-M, usato per l'enumerazione selettiva di Lb. acidphilus, ed in

MRS 37°C le cariche sono state di circa 10^8; questo lascia supporre la presenza del solo Lb. acidophilus nel preparato. In questa formulazione, sono state evidenziate conte di circa 10^7 in TSA 37°C ed in M17 37°C, usati rispettivamente per la conta selettiva dei batteri sporigeni e di S. thermophilus, mentre non sono state rilevate colonie in ST 37°C, utilizzato anch'esso per l'enumerazione selettiva di S. thermophilus (Dave & Shah, 1996).

Nella formulazione multiceppo H, l'unico substrato che ha permesso la crescita di lattobacilli è stato l'MRS 37°C, nel quale i livelli di carica sono risultati intorno a 10^7, in accordo a quanto riportato in etichetta. In BA-M ed in MRS pH 5,2 non sono state rilevate colonie. Anche in questo caso, M17 37°C ha presentato la migliore capacità di evidenziare colonie di S. thermophilus, la cui concentrazione è risultata corrispondente a quella dichiarata in etichetta (circa 10^9), mentre in ST 37°C dopo 24 ore di incubazione non sono state rilevate colonie.

Per quanto concerne le formulazioni monoceppo, la carica microbica è risultata inferiore di circa 1 ciclo logaritmico rispetto a quella dichiarata nei preparati B e C, ed inferiore di circa 2 cicli nei preparati E ed F. Solo nella formulazione J sono state rilevate conte di circa 1 ciclo logaritmico superiori a quella riportata.

Nel complesso, in tutte le formulazioni analizzate, i conteggi registrati nei substrati appropriati hanno evidenziato la presenza di un numero elevato di batteri vitali. L'esposizione agli stress gastrointestinali ha indotto seri danni in quasi tutte le preparazioni saggiate. La riduzione maggiore nelle conte si è osservata nei lattobacilli della formulazione A e in S. thermophilus del preparato H, ed è stata rispettivamente pari a 7,1 e 6,7 cicli dopo gli stress GI.

Una drastica riduzione dei lattobacilli vitali è stata osservata anche nei preparati B e C, con cariche di 5,9 e 6,0 cicli logaritmici inferiori dopo il transito simulato. Parallelamente, i microrganismi contenuti nella formulazione G hanno mostrato una discreta capacità di sopravvivenza, giacché i valori ottenuti dopo gli stress GI sono risultati inferiori di circa 1,4 – 2,5 cicli rispetto a quelli registrati prima dell'esposizione agli stress.

Tutte le altre formulazioni (D, E, F, H e J) hanno mostrato cariche di lattobacilli da 4,5 a 5,5 cicli più basse dopo gli stress GI.

Analisi DGGE

I profili di migrazione ottenuti in seguito all'analisi DGGE delle colture pure ha permesso di individuare 18 clusters con un livello di similarità pari all'80%, scelto arbitrariamente per definire le specie (figura).

MANCA FIGURA 1 DELL'ARTICOLO CON DENDROGRAMMA

Un ceppo per ciascun cluster è stato in seguito sottoposto a sequenziamento per l'identificazione. Sulle basi dei risultati del sequenziamento (tabella) e dell'analisi dei clusters, è stato possibile identificare 10 ceppi di *S. thermophilus* (clusters 1 e 3), 9 ceppi di *Bacillus coagulans* (clusters 2, 6 e 7), 5 ceppi di *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (clusters 4 e 5), 5 ceppi di *Lb. reuteri* (cluster 8), 9 ceppi di *Lb. paracasei* (clustres 9 e 12), 10 ceppi di *Lb. rhamnosus* (clusters 10, 11 e 13), 6 ceppi di *Lb. salivarius* (cluster 14), 6 ceppi di *Lb. acidophilus* (cluster 15) e 15 ceppi di *Lb. casei* (clusters 16, 17 e 18). Confrontando questi risultati con quelli dichiarati in etichetta (tabella), è stata trovata una completa corrispondenza per 6 prodotti (B, C, D, E, F e J) ed una parziale per gli altri 3 (A, G e H).

Tabella Identificazione dei ceppi ottenuti dall'analisi DGGE eseguita utilizzando primers universali per batteri

Cluster	Strain	Size	Closest relative	% Identity	Source[a]
1	H10	621	*S. thermophilus*	99%	HM059005.1
2	G17	617	*B. coagulans*	99%	GU904695.1
3	G11	622	*S. thermophilus*	100%	HM462405.1
4	H1	626	*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*	99%	HM058598.1
5	H5	601	*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*	99%	HM007590.1
6	G20	617	*B. coagulans*	99%	GU904695.1
7	G3	613	*B. coagulans*	99%	GU904695.1
8	J5	647	*Lb. reuteri*	98%	AB494732.1
9	F4	638	*Lb. paracasei*	99%	HM067019.1
10	C4	622	*Lb. rhamnosus*	99%	GU550100.1
11	C5	621	*Lb. rhamnosus*	99%	FM179322.1
12	D9	612	*Lb. paracasei*	99%	HM462420.1
13	B1	626	*Lb. rhamnosus*	99%	GU550100.1
14	D1	618	*Lb. salivarius*	99%	EU099039.1
15	G8	582	*Lb. acidophilus*	98%	HM162411.1
16	A1	640	*Lb. casei*	99%	HQ111078.1
17	A10	610	*Lb. casei*	98%	HQ111078.1
18	E5	641	*Lb. casei*	98%	HQ111078.1

[a]Accession number of the sequence of the closest relative found by BLAST search

In dettaglio, nella preparazione A sono stati ottenuti 5 isolati dalle piastre di MRS-V, identificati come *Lb. casei* (clusters 16 e 17, figura), mentre *Lb. bulgaricus* non è stato rilevato. Questo dato conferma i risultati ottenuti dai conteggi in piastra, che avevano mostrato l'assenza di colonie in MRS pH 5,2 incubato a 43°C.

Dalle piastre di MRS 37°C, usato per i conteggi delle preparazioni B e C, sono state isolate 10 colonie e raggruppate nei clusters 10, 11 e 13 (figura), confermando la presenza della sola specie *Lb. rhamnosus* in questi preparati.

Nella formulazione D, 6 colonie su 10 sono state identificate come *Lb. salivarius* (figura , cluster 14), mentre le restanti 4 sono state identificate come *Lb. paracasei* (cluster 12), confermando la composizione microbica riportata in etichetta.

Tutte le colonie isolate dal preparato monoceppo E sono state raggruppate nel cluster 18 ed identificate come *Lb. casei*. Analogamente, tutti i ceppi di *Lb. paracasei* e di *Lb. reuteri* dalle formulazioni monoceppo F e J sono stati raggruppati nei cluster 9 ed 8, rispettivamente (figura), confermando i dati riportati in etichetta.

Sono state riscontrate delle differenze tra i dati ottenuti nel corso degli esperimenti e quelli riportati in etichetta, relativamente ai preparati G ed H. Infatti, *Lb. bulgaricus* non è stato rilevato nella formulazione G; inoltre, nello stesso preparato la specie riportata come *Lb. sporogenes* è stata identificata correttamente come *B. coagulans* in seguito al sequenziamento (tabella e figura , clusters 2, 6 e 7). Come precedentemente riportato per la formulazione A, anche nel campione G non è stato rilevato *Lb. bulgaricus*, confermando i risultati ottenuti dai conteggi in piastra, che avevano mostrato l'assenza di colonie in MRS pH 5,2 incubato a 43°C. Per confermare questo dato, è stato utilizzato MRS agar per isolare 5 ulteriori colonie, ma tutti gli isolati sono risultati ascrivibili alle specie *Lb. acidophilus* o *B. coagulans*.

Per quanto riguarda la formulazione H, non è stata riscontrata crescita microbica in MRS pH 5,2 ed in BA-M; anche in questo caso è stato utilizzato MRS agar per isolare colonie di presunti lattobacilli, identificate tutte come *Lb. bulgaricus* (figura , clusters 4 e 5) mentre *Lb. acidophilus*, riportato in etichetta, non è stato

trovato. *S. thermophilus* è stato isolato da piastre di M17, confermando la presenza di questa specie nel campione H.
L'analisi DGGE eseguita sui campioni di DNA estratto direttamente dalle preparazioni tal quali ha confermato in parte i risultati esposti in precedenza.

MANCA FIGURA 2 ARTICOLO CON PROFILI ELETTROFORETICI

Il profilo A (figura) ha mostrato 3 bande (A1, A2 e A3) corrispondenti a quelle della lane *Lb. casei* A, la sola specie isolata da questo campione. La lane A ha mostrato anche la presenza di un'ulteriore banda, A4, che è risultata assente nella lane *Lb. casei* A e che potrebbe essere ascrivibile a *Lb. delbruackii* ssp *bulgaricus*, la seconda specie indicata in etichetta nel campione A e non rilevata con il metodo coltura-dipendente usato in precedenza.
I profili dei campioni B e C (figura) hanno evidenziato la presenza di un'unica banda, indicata come B-C1, corrispondente a quella di *Lb. rhamnosus* B e C, isolato da entrambe le formulazioni e raggruppato nello stesso cluster, come riportato in precedenza (figura). La banda B1, che caratterizza il profilo di altri 2 ceppi di *Lb. rhamnosus* isolati dal campione B (figura . cluster 13), non è stata rilevata nel profilo B. La lane D ha evidenziato la presenza di una banda indicata come D1, correlata a quella di *Lb. salivarius* D, mentre la banda D2 non ha trovato corrispondenza con la banda D3 di *Lb. paracasei* D, la seconda specie isolata da questo preparato, e la cui presenza è stata riportata in etichetta.
Il profilo E ha mostrato la presenza di 1 sola banda E1, correlata a quella di *Lb. casei* E. Sono state rilevate 4 bande (F1 – F4) nel profilo F e tutte possono essere attribuite a *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* isolato da questo preparato monoceppo.
La lane G ha mostrato la presenza di una sola banda, G1, corrispondente a quella di *Lb. acidophilus* G. Non sono state evidenziate ulteriori bande, nemmeno quelle relative a B. coagulans, erroneamente indicato come *Lb. sporogenes* in etichetta (bande G2 e G3), quelle corrispondenti a *S. thermophilus* G (bande G-H1), specie isolate da questo campione, e quelle relative a *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, l'altra specie riportata in etichetta e la cui presenza non è stata confermata con metodi coltura-dipendenti.

La formulazione multiceppo H ha mostrato 2 bande, indicate come G-H1 e H2. Se la prima può essere attribuita a *S. thermophilus* H (banda G-H1), la seconda non corrisponde ad alcuna banda relativa a *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* H (bande H3-H5), la seconda specie rilevata attraverso l'uso di tecniche coltura-dipendenti. E' interessante notare che la banda H2 ha mostrato lo stesso profilo di migrazione della banda G1 (lane G), corrispondente a *Lb. acidophilus* G, anche se questa specie non è stata riscontrata nella formulazione H con metodi coltura-dipendente. Infine, il profilo della formulazione J ha mostrato almeno due bande (J1 e J2) relative a *Lb. reuteri* J, la sola specie riportata in etichetta.

ATTIVITA' II

Sopravvivenza nell'ambiente cioccolato

La capacità dei microrganismi probiotici di sopravvivere agli stress causati dal processo di produzione, trasformazione e conservazione rappresenta, come innanzi descritto, un importante prerequisito affinché essi possano permanere intorno a livelli adeguatamente elevati al momento del consumo.

Pertanto è stata valutata la capacità di sopravvivenza dei microrganismi oggetto dello studio agli eventi di stress determinati dal particolare ambiente caratterizzante il cioccolato fondente, ascrivibile essenzialmente alla elevata presenza di polifenoli. Dalla figura è possibile apprezzare che i ceppi esibiscono una differente sensibilità alle condizioni di stress investigate.

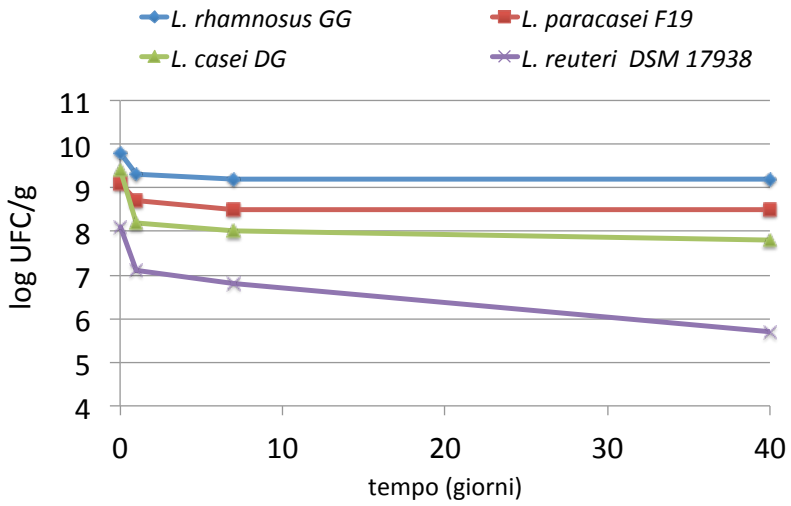


Figura Andamento dei livelli di carica di ceppi di lattobacilli probiotici integrati in cioccolato fondente durante 40 giorni di conservazione

In dettaglio, il ceppo *Lb. paracasei* F19 (proveniente dalla preparazione Genefilus®) ha fatto apprezzare un iniziale decremento, registrato dopo 24 ore di frigo-conservazione, seguito da un andamento lievemente decrescente o sostanzialmente costante.

Simile è stato il comportamento esibito dal ceppo *Lb. rhamnosus* GG (proveniente dalla preparazione Dicoflor®) che, dopo un iniziale e lieve decremento di circa mezzo ciclo logaritmico, ha fatto apprezzare un andamento costante o, addirittura, lievemente crescente.

Una discreta sopravvivenza, ma meno performante rispetto a quella dei precedenti due ceppi, ha caratterizzato anche il ceppo *Lb. casei* DG (proveniente dalla preparazione Enterolactis®) che ha evidenziato un iniziale decremento iniziale di circa 1 ciclo logartimico e un andamento lievemente decrescente durante il successivo periodo di conservazione.

Il ceppo *Lb. reuteri* DSM 17938 (proveniente dalla preparazione Reuterin®) ha mostrato una scarsa capacità di sopravvivenza nell'ambiente cioccolato evidenziando un sensibile decremento delle cariche di oltre 3 cicli logaritmici durante il periodo di frigo-conservazione.

Sopravvivenza al transito gastro-intestinale di probiotici inclusi in cioccolato fondente

La resistenza dei probiotici agli stress dettati dalle condizioni gastro-intestinali rappresenta un requisito fondamentale. Tuttavia, è da sottolineare che spesso i ceppi probiotici, anche quelli derivanti da note preparazioni del commercio, sono fortemente ingiuriati dalle condizioni di acidità, caratterizzanti lo stomaco, e dalla presenza di sali biliari a livello duodenale (Succi *et al*., 2014).

In tale ottica si è inteso valutare l'eventuale effetto protettivo esercitato dal cioccolato fondente nei confronti di due microrganismi probiotici durante il passaggio gastro intestinale.

Dalla figura emerge che il ceppo *Lb. rhamnosus* GG impiegato in forma liofilizzata, come preparazione commerciale tal quale, ha subito una forte ingiuria quando esposto alle condizioni gastriche. Infatti, al termine del periodo di incubazione in tali condizioni i livelli di carica hanno fatto registrare una riduzione di circa 6 log UFC. Al contrario, la presenza del cioccolato, come apprezzabile nella figura , ha determinato un significativo effetto protettivo nei confronti del medesimo ceppo. Infatti, i livelli di carica di GG integrato nel cioccolato, dopo esposizione alla soluzione elettrolitica simulante l'ambiente gastrico, si sono attestate intorno a valori di poco inferiori a 4 log UFC/mL evidenziando un decremento di circa 4,2 cicli logaritmici.

Occorre sottolineare, tuttavia, che il cioccolato fondente non ha prodotto il medesimo effetto protettivo a livello duodenale. Infatti, dopo l'esposizione alla soluzione elettrolitica simulante le condizioni duodenali, il ceppo ha fatto registrare un incremento delle cariche raggiungendo livelli simili indipendentemente dalla presenza o meno di cioccolato fondente.

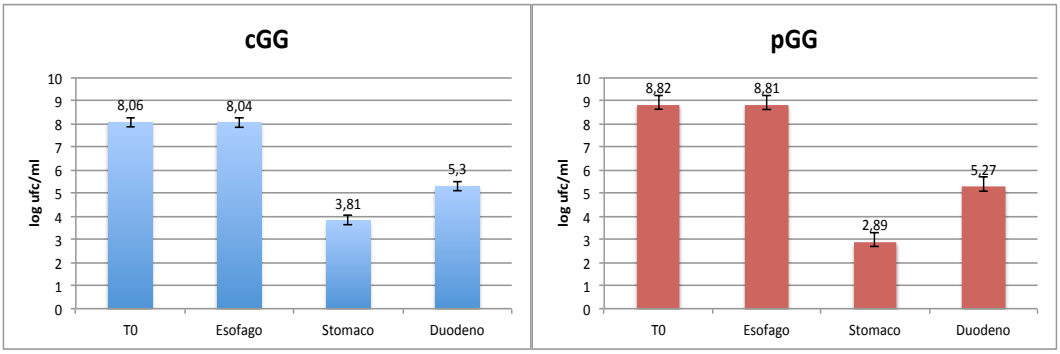


Figura Sopravvivenza di *Lb. rhamnosus* GG integrato in cioccolato fondente (cGG) e in forma liofilizzata -derivante dalla preparazione probiotica commerciale tal quale- (pGG)

Dunque, l'incremento delle cariche in presenza di cioccolato fondente appare addirittura rallentato a livello duodenale. Pertanto, è ipotizzabile che il cioccolato sia stato in grado di esplicare un effetto protettivo nelle condizioni acide, tipiche dello stomaco, mentre a livello duodenale, probabilmente a causa dell'elevata presenza di polifenoli, abbia rallentato lo sviluppo dello stesso ceppo.

Il comportamento al passaggio gastro-intestinale del ceppo *Lb. paracasei* F19 integrato o meno in cioccolato fondente è riportato in Figura .

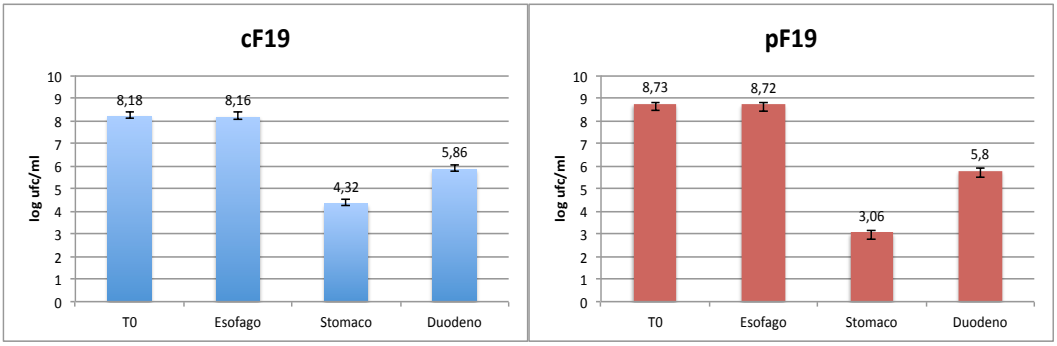


Figura 9 Sopravvivenza di *Lb. paracasei F19* integrato in cioccolato fondentE (cGG) e in forma liofilizzata -derivante dalla preparazione probiotica commerciale tal quale- (pGG)

Dai risultati è emersa una situazione sostanzialmente analoga a quella già riscontrata per il ceppo di *Lb. rhamnosus* GG.

Il passaggio al tratto bocca-esofago non ha determinato alcuna riduzione delle cariche dei probiotici sia impiegati tal quali, in forma liofilizzata, sia se integrati in cioccolato fondente. Le condizioni gastriche hanno determinato una sensibile riduzione dei livelli di carica facendo riscontrare, nel contempo differenze in funzione dell'integrazione o meno in cioccolato fondente. In dettaglio, la presenza di cioccolato ha esplicato un effetto protettivo nei confronti delle cellule

probiotiche. Infatti, dal un lato, il ceppo impiegato come preparazione tal quale ha fatto apprezzare una riduzione delle cariche di oltre 5 cicli logaritmici, mentre, dall'altro, il ceppo integrato nel cioccolato fondente ha mostrato una minore sensibilità evidenziando un decremento delle cariche di 3,8 cicli logaritmici.

Al termine della simulazione al tratto duodenale il ceppo probiotico ha mostrato in entrambi i casi un incremento delle cariche. Come già apprezzato precedentemente per il ceppo GG, l'incremento è risultato maggiore in assenza di cioccolato. Dunque, ancora una volta, appare chiaro che l'effetto protettivo del cioccolato fondente è esercitato solo al passaggio gastrico, mentre a livello duodenale, dove si assiste ad una ripresa della vitalità delle cellule, la presenza di polifenoli potrebbe rappresentare un elemento inibente.

ATTIVITA' III

Dall'attività di isolamento è stato possibile rinvenire 68 isolati da campioni di caciocavallo e relativi intermedi di lavorazione, e 32 isolati da campioni fecali (tabella).

In seguito ai test fenotipici condotti sui 100 isolati, dai campioni di natura alimentare sono stati individuati 3 isolati di forma coccica e 65 isolati di morfologia bastoncellare, mentre dai campioni fecali sono stati caratterizzati 18 isolati di morfologia coccica e 14 isolati di morfologia bastoncellare.

Tutti i ceppi sono risultati positivi alla colorazione di Gram, ad eccezione dell'isolato Fa2, che è risultato Gram-negativo.

Inoltre, il ceppo Fa2 è stato l'unico ad aver mostrato reazione positiva al test della catalasi, mentre tutti gli altri isolati hanno fornito esito negativo al test.

Tabella Elenco dei ceppi isolati dai campioni oggetto di analisi, e relativa caratterizzazione fenotipica.

	Matrice isolamento	Morfologia	Colorazione Gram	Attività catalasica
2	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
3	Caciocavallo	Coccica	+	-
4	Caciocavallo	Coccica	+	-
5	Caciocavallo	Coccica	+	-
6	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
7	Cacuocavallo	Coccica	+	-
8	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
9	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
10	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
11	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
12	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
13	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
14	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
15	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
16	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
17	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
18	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
19	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
20	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
21	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
22	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
23	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
24	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
25	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
26	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
27	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
28	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
29	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
30	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
31	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
33	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
34	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
35	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
36	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
37	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
38	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
39	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
40	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
41	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
42	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
44	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
45	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
46	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
47	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
48	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
49	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
50	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
51	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
52	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
54	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
55	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
56	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
57	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
58	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
59	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
60	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
61	Sieroinnesto	Bastoncellare	+	-
63	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
64	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
64bis	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
65	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
66	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
67	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
68	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
69	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
70	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
71	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-
72	Caciocavallo	Bastoncellare	+	-

	Matrice isolamento	Morfologia	Colorazione Gram	Attività catalasica
Fa1	Feci neonato	Coccica	+	-
Fa2	Feci neonato	Bastoncellare	-	+
Fa3	Feci neonato	Coccica	+	-
Fa4	Feci neonato	Coccica	+	-
Fa5	Feci neonato	Coccica	+	-
Fa6	Feci neonato	Coccica	+	-
Fa7	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac1	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac2	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac3	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac4	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac5	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac6	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac7	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac8	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac9	Feci neonato	Coccica	+	-
Fac10	Feci neonato	Coccica	+	-
FL1	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FL2	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FL3	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FL4	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FL5	Feci neonato	Coccica	+	-
FL6	Feci neonato	Coccica	+	-
FL7	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FL8	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc1	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc2	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc3	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc4	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc5	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc6	Feci neonato	Bastoncellare	+	-
FLc7	Feci neonato	Bastoncellare	+	-

Analisi DGGE

Dall'analisi dei profili di migrazione ottenuti in seguito all'analisi DGGE (immagine) delle colture pure, sono stati scelti 34 ceppi da sottoporre al sequenziamento per l'identificazione. Sulle basi dei risultati del sequenziamento (tabella) e dell'analisi dei clusters, è stato possibile identificare 32 ceppi ascrivibili alla specie *Lactobacillus rhamnosus* (ceppo 8, ceppi da 33 a 41, ceppo 44, ceppi da 46 a 52, ceppo 54, ceppo da FL1 a FL4, ceppi FL7 e FL8, ceppi da FLC1 a FLC7), 23 ceppi ascrivibili alla specie *Lactobacillus casei* (ceppo 2, ceppo 6, ceppi 9 e 10, ceppi da 12 a 30), 20 ceppi ascrivibili alla specie *Lactobacillus delbrueckii* subsp indicus (ceppo 42, ceppo 45, ceppi da 55 a 72), 1 ceppo ascrivibile alla specie *Lactobacillus buchneri* (ceppo 11), 1 ceppo ascrivibile alla specie *Lactobacillus helveticus* (ceppo 31), 1 ceppo ascrivibile alla specie *Lactococcus lactis* (ceppo 7) 2 ceppi scrivibili alla specie *Leuconostoc citreum* (ceppi 4 e 5), 15 ceppi ascrivibili alla specie *Enterococcus faecalis* (ceppo 3, ceppi FL5, FL6, FA3, FA6, ceppi da FAC1 a FAC10), 4 ceppi ascrivibili alla specie *Enterococcus casseliflavis* (ceppi FA1, FA4, FA5, FA7).

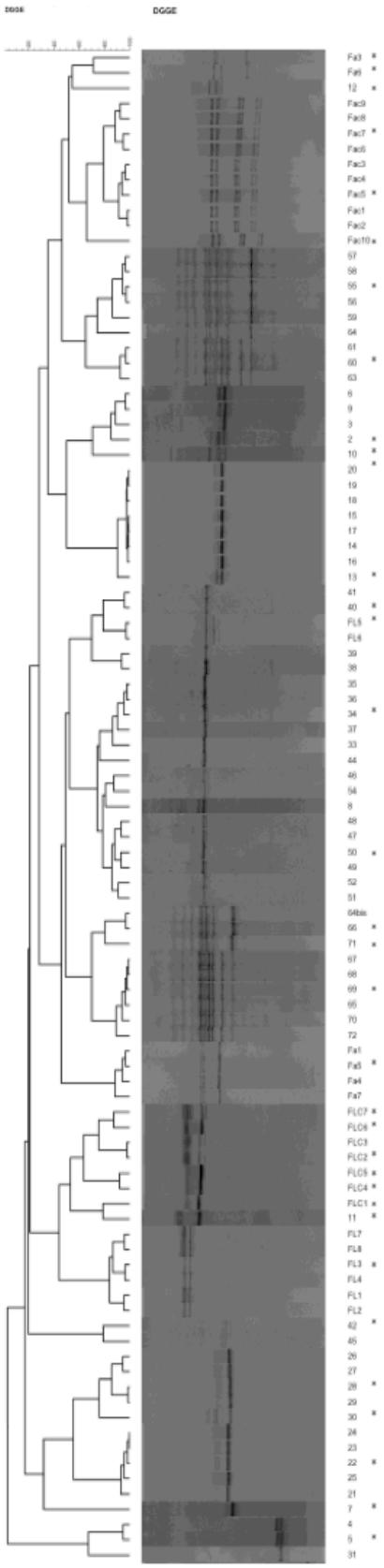


Figura Dendrogramma ottenuto dopo elaborazione dei profili DGGE del DNA estratto dai microorganismi isolati dai campioni alimentari e fecali.

Tabella Identificazione dei ceppi ottenuti dall'analisi DGGE eseguita utilizzando primers universali per batteri

STRAIN	SIZE	CLOSEST RELATIVE	% IDENTITY	SOURCE
2	643	*Lactobacillus casei*	99%	NR_075032.1
3	626	*Enterococcus faecalis*	99%	KF_777374.1
5	623	*Leuconostoc citreum*	99%	NR_074694.1
7	621	*Lactococcus lactis*	100%	NR_103918.1
9	637	*Lactobacillus casei*	99%	KR_055511.1
10	625	*Lactobacillus casei*	99%	NR_075032.1
11	633	*Lactobacillus buchneri*	99%	NR_041293.1
12	641	*Lactobacillus casei*	100%	NR_075032.1
13	643	*Lactobacillus casei*	100%	NR_075032.1
20	641	*Lactobacillus casei*	100%	NR_075032.1
22	634	*Lactobacillus casei*	99%	NR_075032.1
28	637	*Lactobacillus casei*	99%	NR_075032.1
30	625	*Lactobacillus casei*	99%	NR_075032.1
31	627	*Lactobacillus helveticus*	99%	KJ_026578.1
34	632	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
39	644	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	KC_755104.1
40	632	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
42	619	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	99%	NR_029106.1
50	647	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
55	630	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	100%	NR_029106.1
60	616	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	99%	NR_029106.1
66	629	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	99%	NR_029106.1
69	638	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	99%	NR_029106.1
71	629	*Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus*	99%	NR_029106.1
FL 3	646	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FL 5	618	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1
FLc1	632	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FLc2	608	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FLc4	637	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FLc5	643	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FLc6	650	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
FLc7	644	*Lactobacillus rhamnosus*	99%	NR_102778.1
Fa3	612	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1
Fa5	629	*Enterococcus casseliflavus*	99%	NR_102793.1
Fa6	321	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1
Fac5	618	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1
Fac7	610	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1
Fac10	420	*Enterococcus faecalis*	99%	NR_074637.1

Esposizione a stress acido e biliare

Nell'attività II l'attenzione si è soffermata sulle condizioni *in vitro* che probabilmente rappresentano *in vivo* gli ostacoli maggiori al delivery di cellule vitali nel tratto intestinale, ovvero l'acidità e l'azione della pepsina presenti nello stomaco, e l'azione battericida esercitata dai sali biliari a livello duodenale.

I risultati dell'esposizione alle tre diverse condizioni di pH, riportati nella tabella 8, sono espressi come differenza tra il logaritmo della carica a t0 e quella a t90 (Δ logUFC/ml).

Tabella 8 Decremento della vitalità dei ceppi in seguito ad esposizione a soluzione fisiologica acidificata

	ΔlogUFC/mL		
Ceppo	***pH2***	***pH2,5***	***pH3,0***
GG	3,44 (±0,02)	2,63 (±0,01)	0,06 (±0,02)
34	5,34 (±0,01)	4,16 (±0,02)	0,12 (±0,02)
39	4,65 (±0,02)	3,8 (±0,03)	0,08 (±0,01)
40	5,33 (±0,02)	4,12 (±0,03)	0,3 (±0,01)
50	6,78 (±0,03)	4,87 (±0,02)	0,17 (±0,01)
FLC1	4,83 (±0,01)	3,7 (±0,01)	0,08 (±0,03)
FLC4	4,26 (±0,02)	3,38 (±0,01)	0,06 (±0,02)
FLC5	4,92 (±0,02)	3,74 (±0,03)	0,07 (±0,01)
FL3	4,54 (±0,01)	3,82 (±0,01)	0,04 (±0,01)

Come previsto, per tutti i ceppi si è evinto un maggiore decremento della vitalità nella condizione sperimentale caratterizzata da un pH più basso (pH 2,0), mentre tale decremento è risultato essere minore con l'aumento dei valori di pH.

Il ceppo 50, di origine alimentare, ha mostrato la maggiore riduzione di vitalità a pH 2,0 rispetto al livello di carica iniziale (Δ logUFC/ml = 6,78). Il ceppo GG, isolato dalla preparazione farmaceutica DICOFLOR, ha mostrato invece un andamento opposto rispetto al precedente, facendo registrare una riduzione della vitalità di soli 3,44 cicli logaritmici dopo 90 minuti di esposizione a pH 2,0.

I suddetti ceppi hanno mostrato analogo comportamento anche nelle altre due condizioni sperimentali, ovvero a pH 2,5 e pH 3,0.

In linea generale, nei ceppi di provenienza umana (GG, FLC1, FLC4, FLC5, FL3) si è osservata una maggiore preservazione della vitalità, in tutte le condizioni sperimentali, rispetto ai ceppi di origine alimentare (34, 40, 50), ad eccezione del ceppo 39, il quale ha mostrato una riduzione della vitalità a pH 2,0 di 4,65 cicli logaritmici, addirittura di poco inferiore rispetto alla vitalità mostrata dai ceppi fecali FLC1 e FLC5).

Tabella 9 Decremento della vitalità dei ceppi coltivati in presenza di sali biliari dopo esposizione a stress acido

	ΔlogUFC/mL		
Ceppo	***pH2***	***pH2,5***	***pH3,0***
GG	0,15 (±0,01)	0,08 (±0,01)	0,02 (±0,01)
34	0,42 (±0,01)	0,31 (±0,01)	0,28 (±0,02)
39	0,36 (±0,02)	0,27 (±0,02)	0,2 (±0,02)
40	3,86 (±0,03)	1,65 (±0,02)	1,01 (±0,02)
50	2,18 (±0,02)	1,1 (±0,04)	0,7 (±0,02)
FLC1	0,22 (±0,01)	0,13 (±0,01)	0,1 (±0,03)
FLC4	0,35 (±0,01)	0,17 (±0,02)	0,13 (±0,02)
FLC5	0,37 (±0,02)	0,19 (±0,02)	0,14 (±0,01)
FL3	0,31 (±0,02)	0,22 (±0,01)	0,17 (±0,02)

Nella tabella 9 sono mostrati i risultati relativi allo stress esercitato dai sali biliari, espressi come differenza tra il logaritmo della carica mostrata a t90 in MRS Agar, e quella ottenuta in MRS Agar + 0,3 % di sali biliari, sempre dopo 90 minuti di esposizione allo stress acido.

L'esposizione ai sali di bile ha determinato un'ulteriore riduzione della vitalità dei ceppi, soprattutto a pH 2,0. Tuttavia, per i ceppi di origine umana (GG, FLC1, FLC4, FLC5, FL3), tale riduzione è stata di entità inferiore rispetto a quella riscontrata nei ceppi isolati da caciocavallo (34, 40, 50). Anche in questo caso, il ceppo GG è risultato essere quello che ha presentato una maggiore capacità di crescita in presenza di sali biliari, ed il ceppo 39 ha mostrato un decremento della vitalità comparabile a quello subito dai ceppi isolati da feci.

I ceppi 40 e 50 sono quelli che hanno risentito, più di tutti, dell'azione dei sali di bile: in seguito ad esposizione a pH 2,0 hanno riportato valori di carica pari non rilevabili in MRS Agar + sali biliari, mentre a pH 2,5 e a pH 3,0 hanno mostrato un decremento superiore agli altri ceppi.

Esposizione a stress acido e biliare, in presenza di pepsina

Dall'analisi dei dati mostrati in tabella 10 e relativi ai ceppi sottoposti a stress acido e biliare in presenza di pepsina, è emerso che l'azione dell'enzima

proteolitico inficia in maniera rilevante la vitalità di tali ceppi, per tutte le condizioni sperimentali.

Tabella 10 Decremento della vitalità dei ceppi in seguito ad esposizione a soluzione fisiologica acidificata e pepsina

	ΔlogUFC/mL		
Ceppo	***pH2***	***pH2,5***	***pH3,0***
GG	8,85 (±0,03)	3,93 (±0,03)	0,17 (±0,02)
34	9,00 (±0,02)	5,43 (±0,02)	0,23 (±0,03)
39	8,95 (±0,01)	5,73 (±0,01)	0,19 (±0,02)
40	9,69 (±0,02)	6,1 (±0,03)	0,41 (±0,02)
50	9,6 (±0,03)	6,7 (±0,03)	0,28 (±0,02)
FLC1	8,89 (±0,02)	4,43 (±0,01)	0,19 (±0,01)
FLC4	9,11 (±0,02)	4,89 (±0,02)	0,17 (±0,01)
FLC5	9,06 (±0,03)	4,96 (±0,02)	0,18 (±0,01)
FL3	8,98 (±0,01)	4,33 (±0,01)	0,15 (±0,02)

In particolare, a pH 2,0 si è osservato un abbattimento totale della vitalità, dal momento che sono stati ottenuti valori di carica non rilevabili in MRS Agar. Per quanto concerne le altre due condizioni sperimentali, generalmente si è avuto un decremento maggiore rispetto a quello osservato nelle stesse condizioni sperimentali ma in assenza di pepsina. Analogamente a quanto ottenuto in precedenza, il ceppo GG è risultato quello che ha conservato una maggiore vitalità rispetto agli altri ceppi, mentre il 39 non ha confermato lo stesso andamento dal momento che il suo decremento dopo 90 minuti di esposizione all'enzima (oltre che a soluzione acidificata) risulta essere comparabile più a quello esibito dai ceppi di provenienza alimentare.

L'enumerazione in MRS Agar + sali biliari (dati mostrati in tabella 11) ha evidenziato un abbattimento totale della vitalià a pH 2,0 per tutti i ceppi, mentre a pH 2,5 e a pH 3,0 si sono avuti risultati analoghi a quelli ottenuti in tabella 10.

Tabella 11 Decremento della vitalità dei ceppi coltivati in presenza di sali biliari dopo esposizione a stress acido e pepsina

	ΔlogUFC/mL		
Ceppo	***pH2***	***pH2,5***	***pH3,0***
GG	8,85 (±0,02)	0,09 (±0,03)	0,04 (±0,02)
34	9,00 (±0,02)	0,33 (±0,02)	0,3 (±0,02)
39	8,95 (±0,01)	0,29 (±0,01)	0,25 (±0,02)
40	9,69 (±0,03)	1,72 (±0,04)	1,12 (±0,02)
50	9,6 (±0,03)	1,17 (±0,03)	0,77 (±0,03)
FLC1	8,89 (±0,02)	0,17 (±0,01)	0,13 (±0,01)
FLC4	9,11 (±0,03)	0,2 (±0,01)	0,16 (±0,01)
FLC5	9,06 (±0,02)	0,21 (±0,02)	0,17 (±0,02)
FL3	8,98 (±0,02)	0,25 (±0,02)	0,21 (±0,02)

Effetto protettivo della caseina

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Capitolo 1

Kunz, C., Kuntz, S., & Rudloff, S. (2009). Intestinal flora. In *Breast-Feeding: Early Influences on Later Health* (pp. 67-79). Springer Netherlands. Kunz, C., Kuntz, S., & Rudloff, S. (2009). Intestinal flora. In *Breast-Feeding: Early Influences on Later Health* (pp. 67-79). Springer Netherlands.

Morelli, L. (2008). Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *The Journal of nutrition*, *138*(9), 1791S-1795S.

Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, *136*(1), 65-80.

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, *326*(5960), 1694-1697.

Grice, E. A., Kong, H. H., Conlan, S., Deming, C. B., Davis, J., Young, A. C., ... & Turner, M. L. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *science*, *324*(5931), 1190-1192.

Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., ... & Brotman, R. M. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 1), 4680-4687.

Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., & Stoneking, M. (2009). Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome research*, *19*(4), 636-643.

Robinson, C. J., Bohannan, B. J., & Young, V. B. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 453-476.

Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, *124*(4), 837-848.

Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*, *31*(1), 107-133.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 6578-6583.

Raoult, D. (2008). Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *27*(8), 631-634.

Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafian, H., & Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in microbiology*, *19*(7), 349-359.

Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, *361*(9356), 512-519.

Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., ... & Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Research in microbiology*, *159*(3), 187-193.

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., ... & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 1), 4578-4585.

Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica*, *98*(2), 229-238.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(26), 11971-11975.

Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H., & Francino, M. P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome biology and evolution*, *2*, 53-66.

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, *5*(7), e177.

Grölund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *28*(1), 19-25.

Harmsen, H. J., Wildeboer–Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *30*(1), 61-67.

Enck, P., Zimmermann, K., Rusch, K., Schwiertz, A., Klosterhalfen, S., & Frick, J. S. (2009). The effects of maturation on the colonic microflora in infancy and childhood. *Gastroenterology research and practice*, *2009*.

Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H. J., & Paliy, O. (2011). Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS microbiology ecology*, *77*(2), 404-412.

Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., ... & van Sinderen, D. (2009). Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, *75*(6), 1534-1545.

Flegal, K. M., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Ogden, C. L. (2012). Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *Jama*, *307*(5), 491-497.

Clément, K., & Sorensen, T. I. (Eds.). (2007). *Obesity: genomics and postgenomics*. CRC Press.
Bengmark, S. (2001). Pre-, pro-and synbiotics. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *4*(6), 571-579.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ... & Mende, D. R. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, *464*(7285), 59-65.

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, *307*(5717), 1915-1920.
Woodmansey, E. J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. *Journal of applied microbiology*, *102*(5), 1178-1186.

Fallani, M., Amarri, S., Uusijarvi, A., Adam, R., Khanna, S., Aguilera, M.,... & Scott, J. A. (2011). Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first

complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*, *157*(5), 1385-1392.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., ... & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(33), 14691-14696.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... & Bertalan, M. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, *473*(7346), 174-180.

Perry, G. H., Dominy, N. J., Claw, K. G., Lee, A. S., Fiegler, H., Redon, R., ... & Carter, N. P. (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nature genetics*, *39*(10), 1256-1260.

Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, *22*(1), 283-307.

Nicholson, J. K., Holmes, E., & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(5), 431-438.

Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., & Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, *40*(3), 235-243.

Berggren, A. M., Nyman, E. M. G., Lundquist, I., & Björck, I. M. (1996). Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *British Journal of Nutrition*, *76*(02), 287-294.

Pierro, A., van Saene, H. K., Donnell, S. C., Hughes, J., Ewan, C., Nunn, A. J., & Lloyd, D. A. (1996). Microbial translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Archives of Surgery*, *131*(2), 176-179.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, *80*(S1), S147-S171.

Chacko, A., & Cummings, J. H. (1988). Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut*, *29*(6), 809-815.

Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1997). Collaborative JPEN-Clinical Nutrition Scientific Publications Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *21*(6), 357-365.

Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., Drasar, B. S., & Cummings, J. H. (1995). Metabolic significance of the gut microflora. *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*, 249-74.

Ducluzeau, R., Bellier, M., & Raibaud, P. (1970). Transit through the digestive tract of the inocula of several bacterial strains introduced" per Os" into axenic and" Holoxenic" mice. The antagonistic effect of the microflora of the gastrointestinal tract. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale*, *213*(4), 533.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, *41*(2), 85-101.

Gismondo, M. R. (1998). Antibiotic impact on intestinal microflora. *Gastroenterol Int*, *11*(1), 29-30.

Nord, C. E., & Edlund, C. (1990). Impact of antimicrobial agents on human intestinal microflora. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, *2*(4), 218-237.

Nord, C. E. (1990). Studies on the ecological impact of antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *9*(7), 517-518.

Gorbach, S. L. (1992). Perturbation of intestinal microflora. *Veterinary and human toxicology*, *35*, 15-23.

Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*, *81*(3), 1031-1064.

Coudray, C., Bellanger, J., Castiglia-Delavaud, C., Remesy, C., Vermorel, M., & Rayssignuier, Y. (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, *51*(6), 375-380.

Clausen, M. R. (1998). Production and oxidation of short-chain fatty acids in the human colon: implications for antibiotic-associated diarrhea, ulcerative colitis, colonic cancer, and hepatic encephalopathy. *Danish medical bulletin*.

Sakata, T. (1997). Influence of short chain fatty acids on intestinal growth and functions. In *Dietary fiber in health and disease* (pp. 191-199). Springer US.

Hentges, D. J. (1983). Role of the intestinal flora in host defense against infection. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, 311-331.

Kilkkinen, A., Pietinen, P., Klaukka, T., Virtamo, J., Korhonen, P., & Adlercreutz, H. (2002). Use of oral antimicrobials decreases serum enterolactone concentration. *American Journal of Epidemiology*, *155*(5), 472-477.

Pengally A. *The Constituents of Medicinal Plants,* 2nd ed. Crows Nest, Australia: Allen & Unwin; 2004:43-58.

Lenz, H. J., Burlage, M., Raedler, A., & Greten, H. (1988). Central nervous system effects of corticotropin-releasing factor on gastrointestinal transit in the rat. *Gastroenterology*, *94*(3), 598-602.

Lenz, H. J., & Druge, G. (1990). Neurohumoral pathways mediating stress-induced inhibition of gastric acid secretion in rats. *Gastroenterology*, *98*(6), 1490-1492.

Lenz, H. J. (1989). Regulation of duodenal bicarbonate secretion during stress by corticotropin-releasing factor and beta-endorphin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(4), 1417-1420.

Bailey, M. T., & Coe, C. L. (1999). Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Developmental psychobiology*, *35*(2), 146-155.

Lizko, N. N. (1987). Stress and intestinal microflora. *Food/Nahrung*, *31*(5-6), 443-447.

Hentges, D. J. (1992). Gut flora and disease resistance. In *Probiotics* (pp. 87-110). Springer Netherlands.

Jemmott III, J. B., & McClelland, D. C. (1989). Secretory IgA as a measure of resistance to infectious disease: Comments on Stone, Cox, Valdimarsdottir, and Neale. *Behavioral Medicine*, *15*(2), 63-71.

Drummond, P. D., & Hewson-Bower, B. (1997). Increased psychosocial stress and decreased mucosal immunity in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Journal of psychosomatic research*, *43*(3), 271-278.

Lyte, M., & Ernst, S. (1992). Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life sciences*, *50*(3), 203-212.

Gibson, G. R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *The British journal of nutrition*, *80*(4), S209-12.

Levitt, M. D., Gibson, G. R., & Christl, S. U. (1995). Gas metabolism in the large intestine. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*, 131-54.

Roediger, W. E. W., Moore, J., & Babidge, W. (1997). Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, *42*(8), 1571-1579.

Jones GP. Food Processing. In: Wahlqvist ML, ed. *Food and Nutrition: Australasia, Asia, and the Pacific*. St. Leonards, NSW: Allen and Unwin; 1997:89-96.

Marz, R. B. (1999). *Medical Nutrition from Marz: A Textbook in Clinical Nutrition*. Omni-Press.

Macfarlane, G. T., & Gibson, G. R. (1994). Metabolic activities of the normal colonic flora. In *Human Health* (pp. 17-52). Springer London.

Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., & O'Dea, K. (1996). Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *63*(5), 766-772.

Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1997). Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, *3*(5), 327-337.

Gorbach, S. L. (1986). Function of the normal human microflora. *Scand J Infect Dis*, *49*(Suppl), 17-30.

Kruis, W., Forstmaier, G., Scheurlen, C., & Stellaard, F. (1991). Effect of diets low and high in refined sugars on gut transit, bile acid metabolism, and bacterial fermentation. *Gut*, *32*(4), 367-371.

Lewis, S. J., & Heaton, K. W. (1999). The metabolic consequences of slow colonic transit. *The American journal of gastroenterology*, *94*(8), 2010-2016.

McKay, D. M. (1998). Intestinal inflammation and the gut microflora. *Canadian journal of gastroenterology= Journal canadien de gastroenterologie*, *13*(6), 509-516.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 11070-11075.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022-1023.

Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, *32*(11), 1720-1724.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., ... & Leonard, P. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, *500*(7464), 541-546.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., ... & Derrien, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, *143*(4), 913-916.

Cotillard, A., Kennedy, S. P., Kong, L. C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., ... & Gougis, S. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, *500*(7464), 585-588.

Son, G., Kremer, M., & Hines, I. N. (2010). Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterology research and practice*, *2010*.

Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D., & Gill, S. R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, *57*(2), 601-609.

Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., ... & Vecchio, F. M. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *49*(6), 1877-1887.

Nanji, A. A., Khettry, U., Sadrzadeh, S. M., & Yamanaka, T. (1993). Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *The American journal of pathology*, *142*(2), 367.

Pande, C., Kumar, A., & Sarin, S. K. (2009). Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *29*(12), 1273-1281.

Yan, A. W., E Fouts, D., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., ... & Schnabl, B. (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*, *53*(1), 96-105.

Yan, A. W., & Schnabl, B. (2012). Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome associated with alcoholic liver disease. *World J Hepatol*, *4*(4), 110-118.

Hold, G. L., Smith, M., Grange, C., Watt, E. R., El-Omar, E. M., & Mukhopadhya, I. (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years. *World J Gastroenterol*, *20*(5), 1192-1210.

Peterson, D. A., Frank, D. N., Pace, N. R., & Gordon, J. I. (2008). Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell host & microbe*, *3*(6), 417-427.

Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N., Rayment, N., ... & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC microbiology*, *11*(1), 7.

Hansen, R., Russell, R. K., Reiff, C., Louis, P., McIntosh, F., Berry, S. H., ... & Flynn, D. M. (2012). Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased Faecalibacterium prausnitzii and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*, *107*(12), 1913-1922.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., ... & Roca, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, *55*(2), 205-211.

Mukhopadhya, I., Thomson, J. M., Hansen, R., Berry, S. H., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2011). Detection of Campylobacter concisus and other Campylobacter species in colonic biopsies from adults with ulcerative colitis. *PLoS One*, *6*(6), e21490.

Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe*, *2*(2), 119-129.

Barnich, N., Denizot, J., & Darfeuille-Michaud, A. (2013). E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients. *Pathologie Biologie*, *61*(5), e65-e69.

Tuohy, K., & Del Rio, D. (Eds.). (2014). *Diet-microbe interactions in the gut: effects on human health and disease*. Academic Press.

Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., ... & Doré, J. (2010). Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *51*(1), 77-84.

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, *308*(5728), 1635-1638.

de Martel, C., & Franceschi, S. (2009). Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Critical reviews in oncology/hematology*, *70*(3), 183-194.

O'Keefe, S. J., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., ... & Mawhinney, T. (2009). Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *The Journal of nutrition*, *139*(11), 2044-2048.

Vannucci, L., Stepankova, R., Grobarova, V., Kozakova, H., Rossmann, P., Klimesova, K., ... & Tlaskalova-Hogenova, H. (2009). Colorectal carcinoma: Importance of colonic environment for anti-cancer response and systemic immunity. *Journal of immunotoxicology*.

Chung, K. T., Stevens, S. E., & Cerniglia, C. E. (2008). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical reviews in microbiology*.

Babu, S. D., Jayanthi, V., Devaraj, N., Reis, C. A., & Devaraj, H. (2006). Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in Helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Molecular Cancer*, *5*(1), 1.

Fukata, M., & Abreu, M. T. (2008). Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*, *27*(2), 234-243.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, *65*(2), 87-108.

De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*, *13*(6), 607-615.

Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., ... & Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS one*, *6*(1), e16393.

Shen, X. J., Rawls, J. F., Randall, T. A., Burcall, L., Mpande, C., Jenkins, N., ... & Keku, T. O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut microbes*, *1*(3), 138-147.
Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., ... & Zhao, G. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME journal*, *4*(2), 232-241.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, *90*(3), 859-904.

Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, *1*(6), 6ra14-6ra14.

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., ... & Louis, P. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal*, *5*(2), 220-230.

Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., ... & Azcona, C. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*, *17*(10), 1906-1915.

Walker, A. W., Sanderson, J. D., Churcher, C., Parkes, G. C., Hudspith, B. N., Rayment, N., ... & Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC microbiology*, *11*(1), 7.

Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1997). Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, *3*(5), 327-337.

Cummings, J. H., Hill, M. J., Bone, E. S., Branch, W. J., & Jenkins, D. J. A. (1979). The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism; II. Bacterial metabolites in feces and urine. *American Journal of Clinical Nutrition (USA)*.

Birkett, A., Muir, J., Phillips, J., Jones, G., & O'Dea, K. (1996). Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *63*(5), 766-772.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition*, *6*(3), 285-306.

Berg, A. M., Kelly, C. P., & Farraye, F. A. (2012). Clostridium difficile infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflammatory bowel diseases*.

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, *72*(3), 1729-1738.

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., ... & Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European journal of clinical nutrition*, *66*(1), 53-60.

Capitoli successivi

Abadía-García, L., Cardador, A., del Campo, S. T. M., Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., ... & Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, *33*(2), 191-197.

Adolfsson, O., Meydani, S. N., & Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *The American journal of clinical nutrition*, *80*(2), 245-256.

Agrawal, R. (2005). Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnology, 19(3), 227-246.

Akın, M. B., Akın, M. S., & Kırmacı, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food chemistry*, *104*(1), 93-99.

Angiolillo, L., Conte, A., Faccia, M., Zambrini, A. V., & Del Nobile, M. A. (2014). A new method to produce synbiotic Fiordilatte cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *22*, 180-187.

Arvola, T., Laiho, K., Torkkeli, S., Mykkänen, H., Salminen, S., Maunula, L., & Isolauri, E. (1999). Prophylactic LactobacillusGGReduces Antibiotic-Associated Diarrhea in Children With Respiratory Infections: A Randomized Study. Pediatrics, 104(5), e64-e64.

Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M., & Tanaka, R. (2001). Increased resistance of mice to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection by synbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 91(6), 985-996.

Ashwell, M. (2002). Concepts of functional foods. VVB Laufersweiler.

Bajaj, J. S., Saeian, K., Christensen, K. M., Hafeezullah, M., Varma, R. R., Franco, J., ... & Binion, D. G. (2008). Probiotic yogurt for the treatment of minimal hepatic encephalopathy. The American journal of gastroenterology, 103(7), 1707-1715.

Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and environmental microbiology, 72(3), 1729-1738.

Bender, G. R., & Marquis, R. E. (1987). Membrane ATPases and acid tolerance of Actinomyces viscosus and Lactobacillus casei. Applied and environmental microbiology, 53(9), 2124-2128.

Bennett, R. G., Gorbach, S. L., Goldin, B. R., Chang, T. W., Laughon, B. E., GREENOUGH, W. B., & Bartlett, J. G. (1996). Treatment of Relapsing Clostridium difficile Diarrhea with Lactobacillus GG. Nutrition Today, 31(6), 39S.

Bernstein, H., Payne, C. M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S. E., & Crowley, C. L. (1999). Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein malfolding by the bile salt, deoxycholate. Toxicology letters, 108(1), 37-46.

Blum, S., Haller, D., Pfeifer, A., & Schiffrin, E. J. (2002). Probiotics and immune response. Clinical reviews in allergy & immunology, 22(3), 287-309.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, *122*(2), 416-423.

Brenner, D. M., Moeller, M. J., Chey, W. D., & Schoenfeld, P. S. (2009). The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. The American journal of gastroenterology, 104(4), 1033-1049.

Bron, P. A., Marco, M., Hoffer, S. M., Van Mullekom, E., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2004). Genetic characterization of the bile salt response in Lactobacillus plantarum and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. Journal of bacteriology, 186(23), 7829-7835.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*(4), 467-483.

Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Bartolozzi, F., Pola, P., ... & Gasbarrini, A. (2000). A lyophilized and inactivated culture of Lactobacillus acidophilus increases Helicobacter pylori eradication rates. Alimentary pharmacology & therapeutics, 14(12), 1625-1629.

Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, *39*(2), 203-211.

Capurso, G., Marignani, M., Piciucchi, M., Merola, E., & Delle Fave, G. (2008). Probiotics and severe acute pancreatitis. Journal of clinical gastroenterology, 42, S148-S151.

Cartun, R. W., Van Kruiningen, H. J., Pedersen, C. A., & Berman, M. M. (1993). An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn's disease. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 6(2), 212-219.

Caswell, J. A., & Siny, J. (2007). Consumer demand for quality: Major determinant for agricultural and food trade in the future?. Available at SSRN 976707.

Cheng, A. C., & Thielman, N. M. (2002). Update on traveler's diarrhea. Current infectious disease reports, 4(1), 70-77.

Cindoruk, M., Erkan, G., Karakan, T., Dursun, A., & Unal, S. (2007). Efficacy and Safety of Saccharomyces boulardii in the 14‐day Triple Anti‐Helicobacter pylori Therapy: A Prospective Randomized Placebo‐Controlled Double‐Blind Study. Helicobacter, 12(4), 309-316.

Cocchi, M., Tonello, L., Martínez, Á. J., Lercker, G., & Caramia Giuseppe, M. (2009). Extra virgin olive oil and oleic acid. Nutr. clín. diet. hosp, 12-24.

Collado, M. C., & Sanz, Y. (2007). Induction of acid resistance in Bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. Journal of applied microbiology, 103(4), 1147-1157.

Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S., & Sanz, Y. (2009). The impact of probiotic on gut health. Current drug metabolism, 10(1), 68-78.

Cremonini, F., Di Caro, S., Nista, E. C., Bartolozzi, F., Capelli, G., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2002). Meta‐analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic‐associated diarrhoea. Alimentary pharmacology & therapeutics, 16(8), 1461-1467.

Cruz, A. G., Antunes, A. E., Sousa, A. L. O., Faria, J. A., & Saad, S. M. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*,*42*(9), 1233-1239.

da Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(8), 344-354.

De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P. S., & Gobbetti, M. (2001). The acid-stress response in Lactobacillus sanfranciscensis CB1. Microbiology, 147(7), 1863-1873.

De Roos, N. M., & Katan, M. B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. The American journal of clinical nutrition, 71(2), 405-411.

Deshpande, G., Rao, S., Patole, S., & Bulsara, M. (2010). Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. Pediatrics, 125(5), 921-930.

De Simone C., Famularo G., Moretti S., Marcellini S., Trinchieri V., Santini G., Vesely R. 1997. VSL-3, un farmaco probiotico. In: Simposio satellite *Probiotici: impiego dei preparati ad alta concentrazione*. Congresso Nazionale delle Malattie Digestive. Bologna. 22-27 Novembre 1997. Palazzo della Cultura e dei Congressi. Eds. UTET. Pp 1-4.

DiBaise, J. K., Lof, J., Taylor, K., & Quigley, E. M. (2000). Lactobacillus plantarum 299V in the irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study. Gastroenterology, 118(4), A615.

Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., & Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of dairy science*, *93*(10), 4555-4564.

Doleyres, Y., & Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, *15*(10), 973-988.

Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., & Schiffrin, E. J. (1999). Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. Journal of Dairy Science, 82(5), 863-869.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., ... & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications (pp. 279-292). Springer Netherlands.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... & Kiely, B. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 386s-392s.

EFSA (European Food Safety Authority). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. 19 novembre 2007. Disponibile all'indirizzo: http://www.efsa. europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178667590178.htm; ultima consultazione 10/10/2008.

El Soda M and Awad S. (2014) "Cheese/role of specific groups of bacteria," in *Encyclopaedia of Food Microbiology (Second Edition)*, C. A. Batt and M. L. Tortorello, Eds., pp. 416–420, Academic Press, Oxford, UK.

Fernandes, C. F., Shahani, K. M., & Amer, M. A. (1987). Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. FEMS microbiology letters, 46(3), 343-356.

Forssten, S. D., Sindelar, C. W., & Ouwehand, A. C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, *17*(6), 410-413.

Fozo, E. M., Kajfasz, J. K., & Quivey, R. G. (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. FEMS microbiology letters, 238(2), 291-295.

Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Sapin, C., & Trugnan, G. (2003). Host‐pathogens cross‐talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. Biology of the Cell, 95(8), 503-506.

Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A., & Hashiba, H. (2001). Establishment of orally‐administered Lactobacillus gasseri SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. Journal of Applied Microbiology, 90(3), 343-352.

Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J. H., Walsh, S. V., O'neil, D. A., & Macfarlane, G. T. (2005). Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. Gut, 54(2), 242-249.

Gill, H. S., Rutherfurd, K. J., Prasad, J., & Gopal, P. K. (2000). Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). British Journal of Nutrition, 83(02), 167-176.

Gilliland, S. E., & Speck, M. L. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology, 33(1), 15-18.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., ... & Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology, 119(2), 305-309.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., ... & Campieri, M. (2003a). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. Gastroenterology, 124(5), 1202-1209.

Gionchetti, P., Amadini, C., Rizzello, F., Venturi, A., Poggioli, G., & Campieri, M. (2003b). Diagnosis and treatment of pouchitis. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 17(1), 75-87.

Gomez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Perez, P., Disalvo, E., & De Antoni, G. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. Journal of applied microbiology, 93(5), 794-799.

Goossens, D., Jonkers, D., Stobberingh, E., Bogaard, A. V. D., Russel, M., & Stockbrugger, R. (2003). Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. Scandinavian Journal of Gastroenterology-Supplements, 38(239), 15-16.

Gorbach, S., Chang, T. W., & Goldin, B. (1987). Successful treatment of relapsing Clostridium difficile colitis with Lactobacillus GG. The Lancet, 330(8574), 1519.

Gratz, S. W., Mykkanen, H., & El-Nezami, H. S. (2010). Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. World journal of gastroenterology: WJG, 16(4), 403.

Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. International journal of food microbiology, 39(3), 237-238.

Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., Clara, G., & Margolles, A. (2009). Bile-inducible efflux transporter from Bifidobacterium longum NCC2705, conferring bile resistance. Applied and environmental microbiology, 75(10), 3153-3160.

Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., & Testoni, P. A. (2000). Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. Digestive diseases and sciences, 45(7), 1462-1464.

Guyton, A., & Hall, J. (2006). Textbook of medical physiology, 11th.

Harper, P. H., Lee, E. C., Kettlewell, M. G., Bennett, M. K., & Jewell, D. P. (1985). Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. Gut, 26(3), 279-284.

Heenan, C. N., Adams, M. C., Hosken, R. W., & Fleet, G. H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT-Food Science and Technology*, *37*(4), 461-466.

Hilton, E., Kolakowski, P., Singer, C., & Smith, M. (1997). Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrheal preventive in travelers. Journal of Travel Medicine, 4(1), 41-43.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. International journal of food microbiology, 41(2), 85-101.

Hoveyda, N., Heneghan, C., Mahtani, K. R., Perera, R., Roberts, N., & Glasziou, P. (2009). A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. Bmc Gastroenterology, 9(1), 15.

Isolauri, E., Rautanen, T., Juntunen, M., Sillanaukee, P., & Koivula, T. (1991). A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics, 88(1), 90-97.

Isolauri E., Majamaa H., Arvola T., Rantala I., Virtanen E., Arvilommi H. (1993) Lactobacilluscasei strain GG reverses increased intestinal permeabilità induced by cow milk in suckling rats. Gastroenterology 105: 1643-1650.

Isolauri, E. T. Y. E. S., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., & Salminen, S. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. Clinical & Experimental Allergy, 30(11), 1605-1610.

Joseph, P. J., Dave, R. I., & Shah, N. P. (1998). Antagonism between yoghurt bacteria and probiotic bacteria isolated from commercial starter cultures, commercial yoghurts and a probiotic capsule. *Food Australia*, *50*(1), 20-23.

Kaila, M., & Isolauri, E. (1996). Nutritional Management of Acute Diarrhea. Nutrition Today, 31(6), 19S.

Karapetkov, N., Georgieva, R., Rumyan, N., & Karaivanova, E. (2011). Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. Beneficial microbes, 2(4), 335-339.

Katan, M. B., & ROOS, N. M. (2004). Promises and problems of functional foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44(5), 369-377.

Kiessling, G., Schneider, J., & Jahreisl, G. (2002). Original Communication. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. Eur J Clin Nutr, 56, 843-849.

Kirpich, I. A., Solovieva, N. V., Leikhter, S. N., Shidakova, N. A., Lebedeva, O. V., Sidorov, P. I., ... & Cave, M. (2008). Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. Alcohol, 42(8), 675-682.

Kishi, A., Uno, K., Matsubara, Y., Okuda, C., & Kishida, T. (1996). Effect of the oral administration of Lactobacillus brevis subsp. coagulans on interferon-alpha producing capacity in humans. Journal of the American College of Nutrition, 15(4), 408-412.

Knasmüller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A. M., Rabot, S., Nobis, E. C., & Kassie, F. (2001). Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 480, 129-138.

Kollaritsch, H., Holst, H., Grobara, P., & Wiedermann, G. (1993). Prevention of Traveller's Diarrhea with Saccharomyces boulardii. Results of a Placebo-Controlled Double-Blind Study. FORTSCHRITTE DER MEDIZIN, 111, 44-44.

Kotowska, M., Albrecht, P., & Szajewska, H. (2005). Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic‐associated diarrhoea in children: a randomized double‐blind placebo‐controlled trial. Alimentary pharmacology & therapeutics, 21(5), 583-590.

Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., ... & Wolff, C. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut, 53(11), 1617-1623.

Kumprecht, I., Gasnarek, Z., Zobac, P., Prokop, V., & Mican, P. (1984). The effect of once-time and continuous administrations of Streptococcus faecium M-74 germs on the growth of broiler chickens and on metabolic processes in their digestive tract. Zivocisna Vyroba-UVTIZ (Czechoslovakia).

Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., & Yokota, A. (2006). Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. Journal of bacteriology, 188(5), 1979-1986.

Kurugöl, Z., & Koturoğlu, G. (2005). Effects of Saccharomyces boulardii in children with acute diarrhoea. Acta Paediatrica, 94(1), 44-47.

Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., ... & Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL‐1 and IL‐10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 38(2), 165-172.

Lankaputhra, W. E. V., Shah, N. P., & Britz, M. L. (1996). Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*, *51*(2), 65-69.

Lata, J., Novotný, I., Príbramská, V., Juránková, J., Fric, P., Kroupa, R., & Stiburek, O. (2007). The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child–Pugh score in cirrhotic patients:

results of a double-blind randomized study. European journal of gastroenterology & hepatology, 19(12), 1111-1113.

Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P. A., Moser, A. B., ... & Diehl, A. M. (2003). Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 37(2), 343-350.

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science, 147(3659), 747-748.

Limdi, J. K., O'Neill, C., & McLaughlin, J. (2006). Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology?. World journal of gastroenterology: WJG, 12(34), 5447-5457.

Ling, W. H., Korpela, R., Mykkänen, H., Salminen, S., & Hänninen, O. (1994). Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. The Journal of nutrition, 124(1), 18-23.

Link‐Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O., & Aeschlimann, J. M. (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 10(1), 55-63.

Liu, Q., Duan, Z. P., Ha, D. K., Bengmark, S., Kurtovic, J., & Riordan, S. M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. Hepatology, 39(5), 1441-1449.

Loguercio, C., Blanco, C. D. V., & Coltorti, M. (1987). Enterococcus lactic acid bacteria strain SF68 and lactulose in hepatic encephalopathy: a controlled study. Journal of international medical research, 15(6), 335-343.

Loguercio, C., Abbiati, R., Rinaldi, M., Romano, A., Blanco, C. D. V., & Coltorti, M. (1995). Long-term effects of Enterococcus faecium SF68 versus lactulose in the treatment of patients with cirrhosis and grade 1–2 hepatic encephalopathy. Journal of hepatology, 23(1), 39-46.

Lomovskaya, O., & Lewis, K. (1992). Emr, an Escherichia coli locus for multidrug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(19), 8938-8942.

Lovegrove J. Jackson K. Coronary heart disease. In: Mattila Sandholm T., Saarela M., eds. Functional dairy products. Cambridge, UK: Woodhill Publishing, 2003: 54-87.

Maassen, C. B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., den Bak-Glashouwer, M. J. H., Leer, R. J., Laman, J. D., ... & Claassen, E. (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. Vaccine, 18(23), 2613-2623.

Madden, J. A. J., & Hunter, J. O. (2002). A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. British Journal of Nutrition, 88(S1), s67-s72.

Madsen, K. L., Doyle, J. S., Jewell, L. D., Tavernini, M. M., & Fedorak, R. N. (1999). Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene–deficient mice. Gastroenterology, 116(5), 1107-1114.

Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., ... & De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology, 121(3), 580-591.

Maguin, E. (2000). Identification of stress-inducible proteins in Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus. Electrophoresis, 21, 2557-2561.

Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., & Vesikari, T. (1995). Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 20(3), 333-338.

Malaguarnera, M., Greco, F., Barone, G., Gargante, M. P., Malaguarnera, M., & Toscano, M. A. (2007). Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Digestive Diseases and Sciences, 52(11), 3259-3265.

Marette, S., & Beghin, J. (2010). Are standards always protectionist?. Review of International Economics, 18(1), 179-192.

Marquis, R. E., Bender, G. R., Murray, D. R., & Wong, A. (1987). Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. Applied and environmental microbiology, 53(1), 198-200.

Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F., & Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2. 1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. British Journal of Nutrition, 64(01), 71-79.

Martın-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, *13*(10), 827-833.

McCracken, V. J., Gaskins, H. R., & Tannock, G. W. (1999). Probiotics and the immune system. Probiotics: a critical review., 85-111.

McDonough, F. E., Wells, P., Wong, N. P., Hitchins, A. D., & Bodwell, C. E. (1983, January). ROLE OF VITAMINS AND MINERALS IN GROWTH-STIMULATION OF RATS FED YOGURT. In Federation Proceedings (Vol. 42, No. 3, pp. 556-556). 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL.

McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., ... & Harrington, G. (1994). A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease. Jama, 271(24), 1913-1918.

McFarland, L. V. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease. The American journal of gastroenterology, 101(4), 812-822.

McFarland, L. V. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Medicine and Infectious Disease, 5(2), 97-105.

Metchnikoff, E. (1908). The prolongation of life. Putnam.

Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., ... & Vecchio, F. M. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 49(6), 1877-1887.

Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M., & Julkunen, I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. Infection and Immunity, 66(12), 6058-6062.

Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., & Varkila, K. (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. Infection and immunity, 64(12), 5403-5405.

Moreno, Y., Collado, M. C., Ferrús, M. A., Cobo, J. M., Hernández, E., & Hernández, M. (2006). Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4 C using LIVE/DEAD® BacLightTM staining and conventional plate counts. International journal of food science & technology, 41(3), 275-280.

Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., & Yoshikai, Y. (1998). Heat-killed Lactobacillus plantarum L-137 suppresses naturally fed antigen–specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. Journal of allergy and clinical immunology, 102(1), 57-64.

Niedzielin, K., Kordecki, H., & ena Birkenfeld, B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome. European journal of gastroenterology & hepatology, 13(10), 1143-1147.

Nobaek, S., Johansson, M. L., Molin, G., Ahrné, S., & Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. The American journal of gastroenterology, 95(5), 1231-1238.

Noriega, L., Cuevas, I., Margolles, A., & Clara, G. (2006). Deconjugation and bile salts hydrolase activity by Bifidobacterium strains with acquired resistance to bile. International dairy journal, 16(8), 850-855.

Oberhelman, R. A., Gilman, R. H., Sheen, P., Taylor, D. N., Black, R. E., Cabrera, L., ... & Madico, G. (1999). A placebo-controlled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. The Journal of pediatrics, 134(1), 15-20.

Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001). Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria.*International Dairy Journal*, *11*(11), 935-942.

Orrhage, K., Sjöstedt, S., & Nord, C. E. (2000). Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46(4), 603-612.

Ortakci, F., Broadbent, J. R., McManus, W. R., & McMahon, D. J. (2012). Survival of microencapsulated probiotic Lactobacillus paracasei LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of dairy science*, *95*(11), 6274-6281.

O'Sullivan, E., & Condon, S. (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in Lactococcus lactis. Applied and environmental microbiology, 63(11), 4210-4215.

Österlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., ... & Joensuu, H. (2007). Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. British Journal of Cancer, 97(8), 1028-1034.

Perdigon, G., Vintini, E., Alvarez, S., Medina, M., & Medici, M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. Journal of dairy science, 82(6), 1108-1114.

Pessi, T., Sütas, Y., Saxelin, M., Kallioinen, H., & Isolauri, E. (1999). Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. Applied and environmental microbiology, 65(11), 4725-4728.

Pessi, T. Y. M. E., Sütas, Y., Hurme, M., & Isolauri, E. (2000). Interleukin‐10 generation in atopic children following oral Lactobacillus rhamnosus GG. Clinical & Experimental Allergy, 30(12), 1804-1808.

Pirovano, 1997 Criteri tecnologici nella preparazione di un probiotico. In: Simposio satellite *Probiotici: impiego dei preparati ad alta concentrazione*. Congresso Nazionale delle Malattie Digestive. Bologna. 22-27 Novembre 1997. Palazzo della Cultura e dei Congressi. Eds. UTET. Pp 10-11.

Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S., ... & Caggia, C. (2012). Survival of Lactobacillus rhamnosus strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. Food microbiology, 31(1), 57-63.

Pitsouni, E., Alexiou, V., Saridakis, V., Peppas, G., & Falagas, M. E. (2009). Does the use of probiotics/synbiotics prevent postoperative infections in patients undergoing abdominal surgery? A meta-analysis of randomized controlled trials. European journal of clinical pharmacology, 65(6), 561-570.

Plein, K., & Hotz, J. (1993). Therapeutic effects of Saccharomyces boulardii on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea--a pilot study. Zeitschrift fur Gastroenterologie, 31(2), 129-134.

Prantera, C., Scribano, M. L., Falasco, G., Andreoli, A., & Luzi, C. (2002). Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG. Gut, 51(3), 405-409.

Price, C. E., Reid, S. J., Driessen, A. J., & Abratt, V. R. (2006). The Bifidobacterium longum NCIMB 702259T ctr gene codes for a novel cholate transporter. Applied and environmental microbiology, 72(1), 923-926.

Quigley, E. M., & Quera, R. (2006). Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. Gastroenterology, 130(2), S78-S90.

Quigley, E. M. M., & Flourie, B. (2007). Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date. Neurogastroenterology & Motility, 19(3), 166-172.

Ranadheera, R. D. C. S., Ho, P. H., Luo, J., & Adams, M. C. (2007). Does the food substrate influence the functionality of probiotics?. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *16*, S81.

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria in Food and Agriculture Organization of the United Nations,World Health Organization, ottobre 2001.-292

Ricciardi, A., Blaiotta, G., Di Cerbo, A., Succi, M., & Aponte, M. (2014). Behaviour of lactic acid bacteria populations in Pecorino di Carmasciano cheese samples submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract: evaluation by means of a polyphasic approach.*International journal of food microbiology*, *179*, 64-71.

Richardson, P. (2004). I piaceri del cioccolato.

Roberfroid, M. B. (2000). A European consensus of scientific concepts of functional foods. Nutrition, 16(7), 689-691.

Roberfroid, M. B. (2002). Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87(S2), S139-S143.

Rodríguez, L. A. G., & Ruigómez, A. (1999). Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. Bmj, 318(7183), 565-566.

Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. The Journal of Nutrition, 130(2), 396S-402S.

Rossit, A. R. B., Gonçalves, A. C. M., Franco, C., & Machado, R. L. D. (2009). Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency virus-1: a review. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 51(2), 59-65.

Ruiz, L., Sánchez, B., Ruas-Madiedo, P., Clara, G., & Margolles, A. (2007). Cell envelope changes in Bifidobacterium animalis ssp. lactis as a response to bile. FEMS microbiology letters, 274(2), 316-322.

Ruiz, L., Zomer, A., O'Connell-Motherway, M., Van Sinderen, D., & Margolles, A. (2011). Discovering novel bile protection systems in Bifidobacterium breve UCC2003 through functional genomics. Applied and environmental microbiology, AEM-06060.

Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods—the European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78(1), 99-117.

Saint-Marc, T., Blehaut, H., Musial, C., & Touraine, J. L. (1995). Diarrhées en relation avec le sida: Essai en double aveugle de Saccharomyces boulardii. La Semaine des hôpitaux de Paris, 71(23-24), 735-741.

Sakamoto, K., Margolles, A., Van Veen, H. W., & Konings, W. N. (2001). Hop resistance in the beer spoilage bacterium Lactobacillus brevis is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. Journal of bacteriology, 183(18), 5371-5375.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition, 80(S1), S147-S171..

Sánchez, B., Los Reyes‐Gavilán, D., Clara, G., & Margolles, A. (2006). The F1F0‐ATPase of Bifidobacterium animalis is involved in bile tolerance. Environmental Microbiology, 8(10), 1825-1833.

Sartor, R. B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology, 126(6), 1620-1633.

Sartor, R. B. (2005). Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. Current opinion in gastroenterology, 21(1), 44-50.

Savino, F., Pelle, E., Palumeri, E., Oggero, R., & Miniero, R. (2007). Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. Pediatrics, 119(1), e124-e130.

Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., & Black, R. E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. The Lancet infectious diseases, 6(6), 374-382.

Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L. A., Wyrick, P. B., Tonkonogy, S. L., & Sartor, R. B. (1998). Continuous feeding of Lactobacillus plantarum attenuates established colitis in interleukin-10 deficient mice. Gastroenterology, 114, A1081.

Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*(11), 1262-1277.

Sharma, M., & Devi, M. (2014). Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. Critical reviews in food science and nutrition, 54(4), 537-552.

Smet, I. D., Hoorde, L. V., Saeyer, N. D., Woestyne, M. V., & Verstraete, W. (1994). In vitro study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic Lactobacillus plantarum 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. Microbial ecology in health and disease, 7(6), 315-329.

Smet, I., Hoorde, L., Woestyne, M., Christiaens, H., & Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 79(3), 292-301.

Sparks, S. G., Carman, R. J., Sarker, M. R., & McClane, B. A. (2001). Genotyping of enterotoxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. Journal of clinical microbiology, 39(3), 883-888.

Spiller, R. C. (2007). Role of infection in irritable bowel syndrome. Journal of gastroenterology, 42(17), 41-47.

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS microbiology letters, 244(1), 129-137.

Succi, M., Sorrentino, E., Di Renzo, T., Tremonte, P., Reale, A., Tipaldi, L., ... & Coppola, R. (2014). Lactic Acid Bacteria in Pharmaceutical Formulations: Presence and Viability of "Healthy Microorganisms". Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 4(1), 66-75.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology*, *62*(1), 47-55.

Surawicz, C. M., McFarland, L. V., Greenberg, R. N., Rubin, M., Fekety, R., Mulligan, M. E., ... & Elmer, G. W. (2000). The search for a better treatment for recurrent Clostridium difficile

disease: use of high-dose vancomycin combined with Saccharomyces boulardii. Clinical infectious diseases, 31(4), 1012-1017.

Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J. Z., Arma, M., & Mikolajczyk, W. (2001a). Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. The Journal of pediatrics, 138(3), 361-365.

Szajewska H., Mrukowicz J.Z. (2001b) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind,placebo-controlled trials. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 33: S17-S25.

Szajewska, H., Skorka, A., Ruszczyński, M., & Gieruszczak‐Białek, D. (2007). Meta‐analysis: Lactobacillus GG for treating acute diarrhoea in children. Alimentary pharmacology & therapeutics, 25(8), 871-881.

Tabaqchali, S., O'donoghue, D. P., & Bettelheim, K. A. (1978). Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Gut, 19(2), 108-113.

Tamime, A. Y., Marshall, V. M., & Robinson, R. K. (1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. Journal of Dairy Research, 62(01), 151-187.

Taranto, M. P., Medici, M., Perdigon, G., Holgado, A. R., & Valdez, G. F. (2000). Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice. Journal of Dairy Science, 83(3), 401-403.

Taranto, M. P., Fernandez Murga, M. L., Lorca, G., & Valdez, G. D. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of Lactobacillus reuteri. Journal of Applied Microbiology, 95(1), 86-91.

Taranto, M. P., Perez-Martinez, G., & de Valdez, G. F. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Research in microbiology, 157(8), 720-725.

The Functional Foods Revolution: Healthy People, Healthy Profits? Di Michael Heasman,Julian Mellentin The Scienze of chocolate – Stephen Beckett,2008

Thage, B. V., Broe, M. L., Petersen, M. H., Petersen, M. A., Bennedsen, M., & Ardö, Y. (2005). Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with Lactobacillus paracasei strains with different aminotransferase profiles. *International dairy journal*, *15*(6), 795-805.

Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G., & Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. Journal of agricultural and food chemistry, 48(9), 3973-3978.

Tromm, A., Niewerth, U., Khoury, M., Baestlein, E., Wilhelms, G., Schulze, J., & Stolte, M. (2004). The probiotic E. coli strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-label trial. Zeitschrift fur Gastroenterologie, 42(5), 365-369.

Ulisse, S., Gionchetti, P., D'Alò, S., Russo, F. P., Pesce, I., Ricci, G., ... & De Simone, C. (2001). Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. The American journal of gastroenterology, 96(9), 2691-2699.

Unione Europea. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative agli integratori alimentari. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L183/51, 12 luglio 2002.

Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., ... & Campieri, M. (1999). Impact on the composition of the faecal ora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther, 13(8), 11031108.

Wildt, S., Munck, L. K., Vinter‐Jensen, L., Hanse, B. F., Nordgaard‐Lassen, I., Christensen, S., ... & Rumessen, J. J. (2006). Probiotic treatment of collagenous colitis: A randomized, double‐blind, placebo‐controlled trial with lactobacillus acidophilus and bifidobacterium animalis subsp. lactis. Inflammatory bowel diseases, 12(5), 395-401.

Williams, P. E. V., Newbold, C. J., Haresign, W., & Cole, D. J. A. (1990). Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In Recent advances in animal nutrition-1990. (pp. 211-227). Butterworths.

Zocco, M. A., Dal Verme, L. Z., CREMONINI, F., Piscaglia, A. C., Nista, E. C., CANDELLI, M., ... & ARMUZZI, A. (2006). Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. Alimentary pharmacology & therapeutics, 23(11), 1567-1574.