

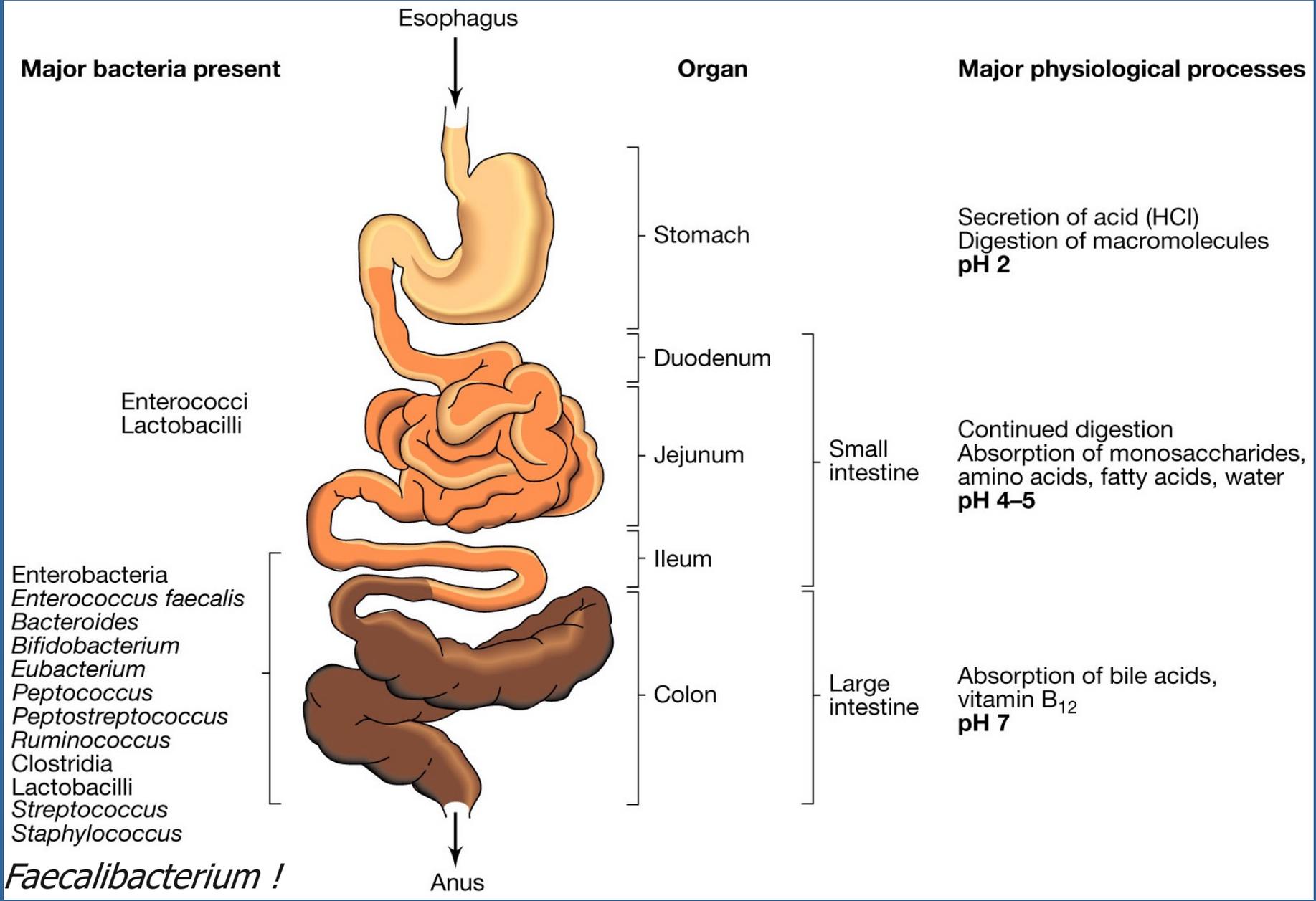


IL LATTE FERMENTATO (PARTE II)

A.A. 2023-2024
Prof.ssa Annalisa Serio

Materiale didattico
Riproduzione vietata senza espressa
autorizzazione del docente

1. Superamento ostacoli



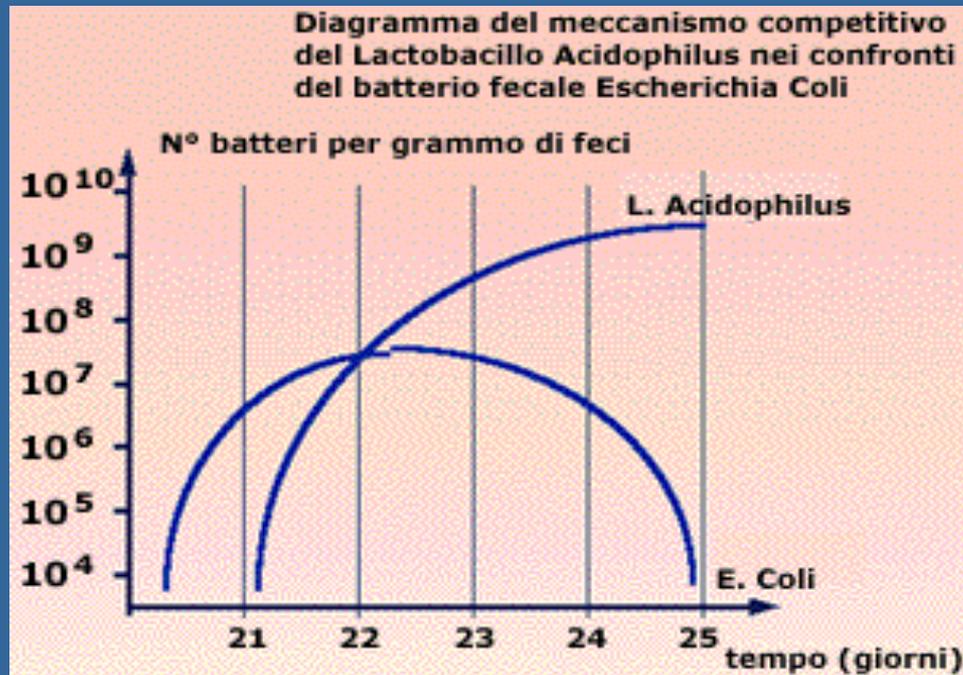
2. Colonizzazione

Dose giornaliera raccomandata per lattobacilli probiotici:

Ceppo	Dose effettiva (UFC/giorno)
<i>L. casei</i> Shirota	$6,5 \times 10^9$
<i>L. rhamnosus</i> GG	$10^9 - 10^{10}$
<i>L. plantarum</i> 299 V	5×10^8
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	3×10^{11}
<i>L. reuteri</i> (ceppi diversi)	$1 \times 10^8 - 10^{11}$
<i>L. rhamnosus</i> DSM 6594	$1,6 \times 10^9$
<i>L. johnsonii</i> LA	1×10^{10}

3. Moltiplicazione e meccanismo competitivo

Barriera mucosa!



I lattobacilli rappresentano una parte importante della popolazione microbica intestinale anche nell'adulto e la loro presenza nella giusta proporzione, è determinante per proteggere l'organismo da vari disturbi intestinali.

Il tratto gastro-intestinale nell'uomo

Il TGI è la più grande area del nostro organismo sottoposta a costante stimolo antigenico a causa degli alimenti ingeriti ed è la fonte immunitaria più importante dell'organismo.

E' un vero e proprio ecosistema composto da:

- Cellule dell'ospite,
- Microrganismi,
- Nutrienti

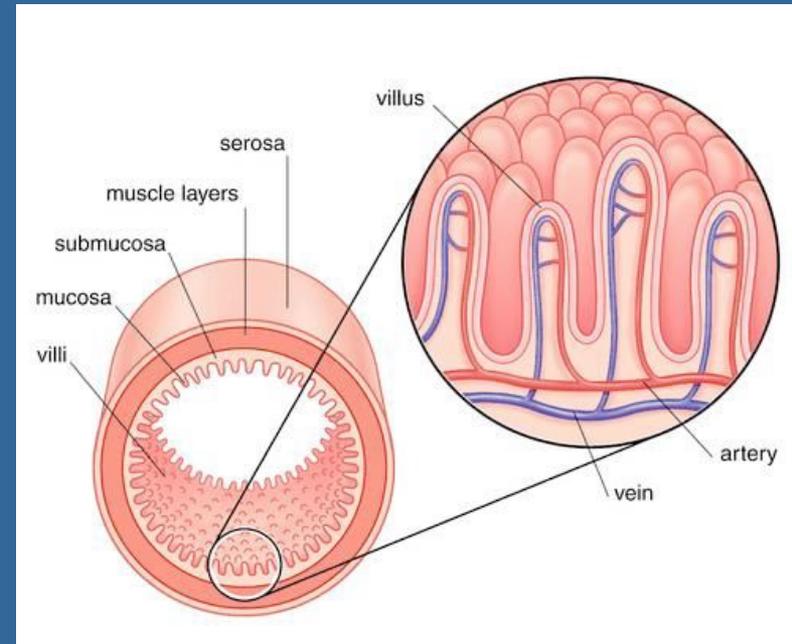


La superficie interna del tratto intestinale è rivestita con cellule che formano la mucosa epiteliale.

L'epitelio della mucosa intestinale è rivestito da un gel che può essere suddiviso in:

strato interno: formato da un gel idrosolubile ed è in contatto diretto con le cellule dell'epitelio intestinale.

strato esterno: più denso e sovrapposto all'interno; contaminato da batteri ed altre sostanze. Il suo spessore varia in diverse aree dell'intestino.

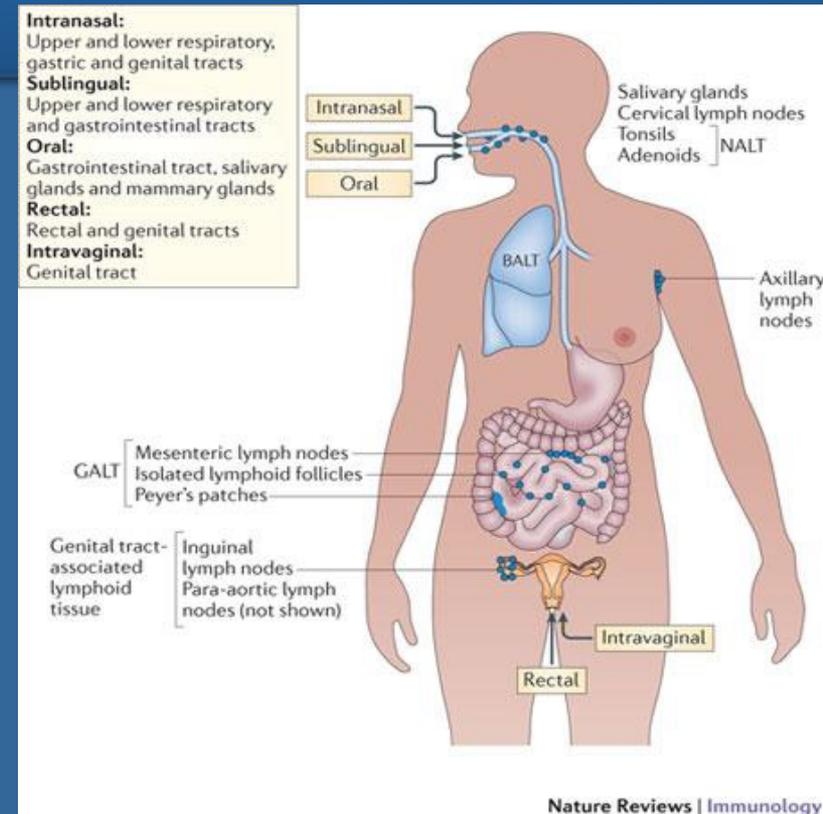


RESISTENZA DELL'OSPITE ALLE INFEZIONI

MALT= mucosa- associated lymphatic tissue. **Tessuto linfoide associato alle mucose.**

Tessuto linfatico presente in diverse parti del corpo.

MALT formato da **linfociti T, cellule B, cellule plasmatiche, macrofagi**, ognuno dei quali è adibito a incontrare determinati antigeni che entrano a contatto con gli epiteli.

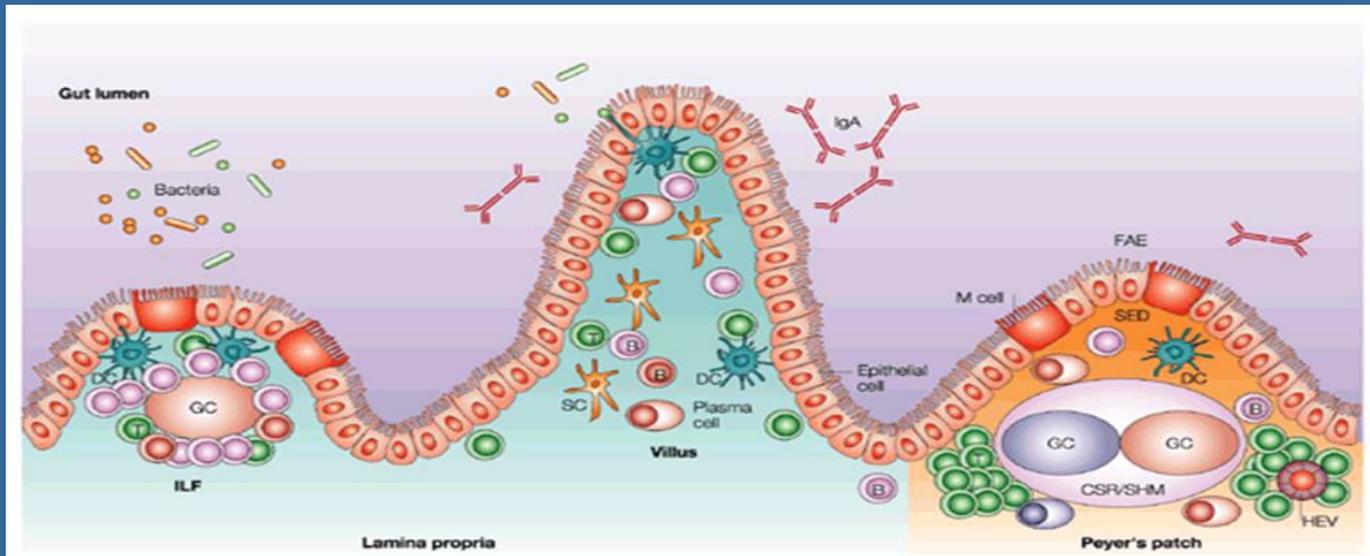


In base alla collocazione, il MALT si suddivide in :

- **GALT** (gut-associated lymphoid tissue)
- **BALT** (bronchus-associated lymphoid tissue)
- **NALT** (nasal-associated lymphoid tissue)
- **CALT** (conjunctival-associated lymphoid tissue)
- **D-MALT** (diffuse mucosa-associated lymphatic tissue)

GALT: sistema immunitario intestinale

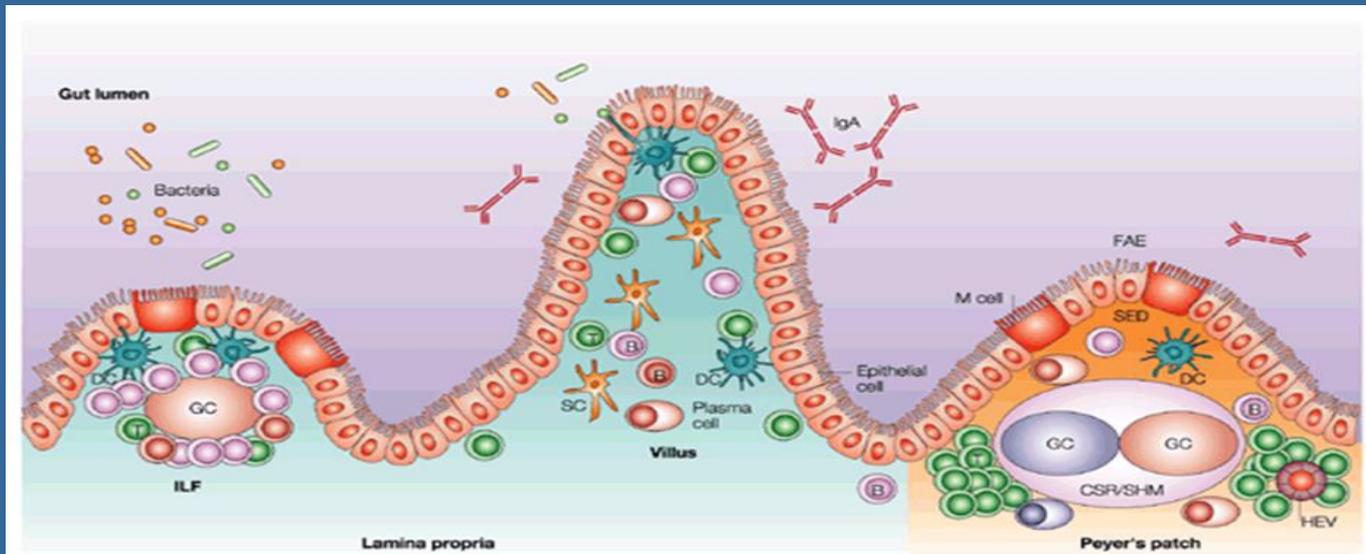
- ✓ Il sistema immunitario intestinale costituisce la parte più estesa e complessa del sistema immunitario.
- ✓ Riceve quotidianamente una enorme carica antigenica ed è in grado di distinguere tra patogeni invasivi e antigeni innocui che arrivano tramite alimenti e batteri commensali.



GALT: sistema immunitario intestinale

L'intestino ha meccanismi di difesa che limitano l'accesso delle sostanze nocive per l'organismo:

- enzimi digestivi pancreatici,
- epitelio intestinale,
- batteri costituenti la flora intestinale,
- GALT (Gut-associated lymphoid tissue).

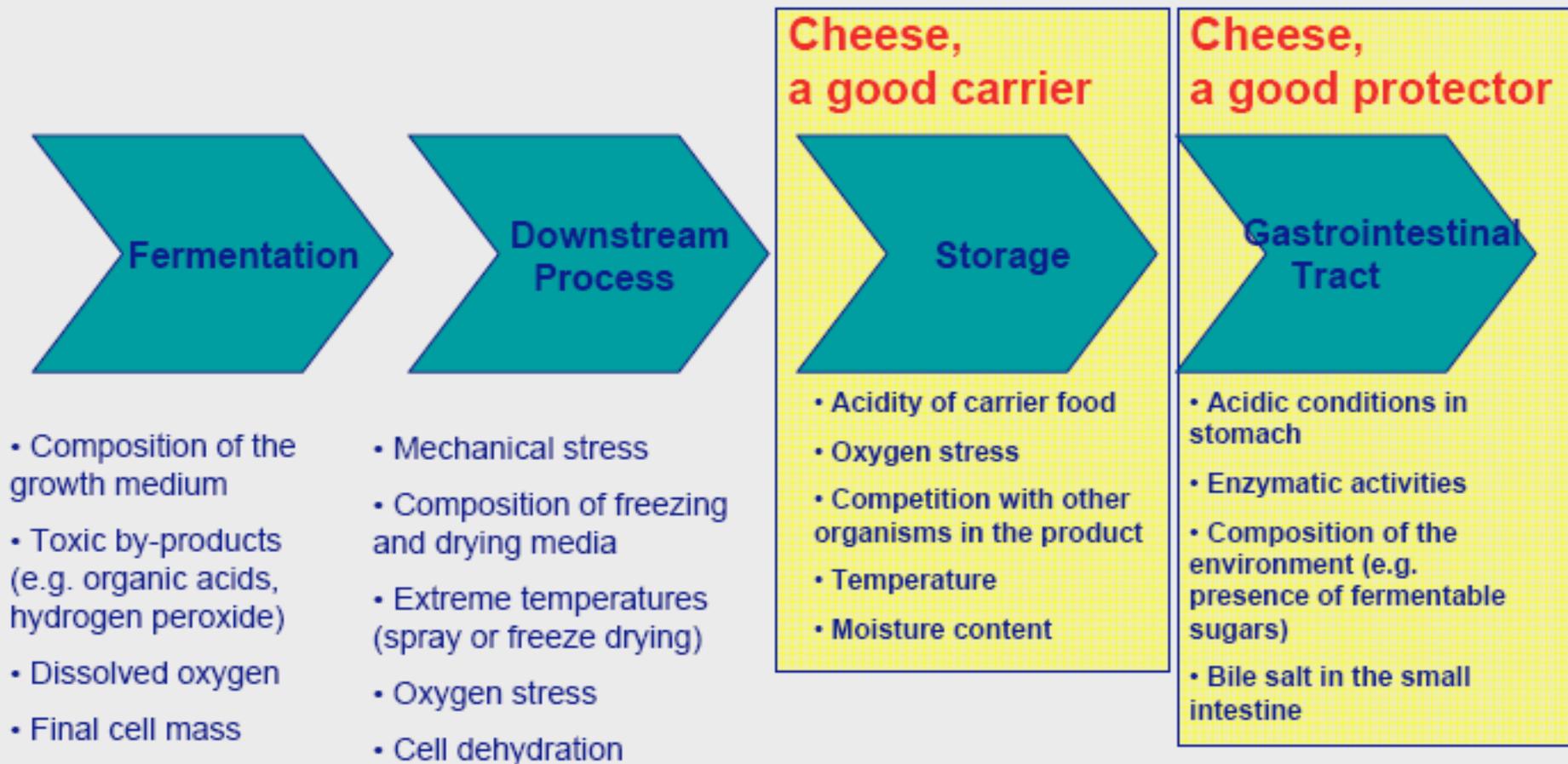


Selezione di un ceppo probiotico secondo le indicazioni FAO/OMS 2001

- identificazione del ceppo mediante metodi fenotipici e genotipici
- valutazione aspetti di sicurezza
- misura dell'efficacia non nell'uomo (test in vitro e in modelli animali)
- valutazione proprietà tecnologiche (prove di fermentazione e liofilizzazione)
- misura dell'efficacia nell'uomo (test clinici)

Formaggi probiotici

Main factors affecting viability, from production to human gut



Important characteristics of cheeses and yoghurts for probiotic survival



4.1 – 4.4 ← **pH** → 4.5 – 5.3
3.8 – 4.2

- 100 to
- 200 mV ← **E_H** → + 330 / + 360 mV
Core:
- 300 / - 360 mV

< 5°C ← **Storage
temperature** → 4 - 15°C



High probiotic survival in cheese shown by various studies

Cheese Type	Storage Conditions	Strains	Cell counts (log cfu·g ⁻¹)		Reference
			Start	End	
Cheddar	4°C, 24 wks	<i>Lb. acidophilus</i> 4962 <i>Lb. casei</i> 279 <i>B. longum</i> 1941 <i>Lb. acidophilus</i> L10 <i>Lb. paracasei</i> L26 <i>B. lactis</i> B94	8.3 8.5 8.0 8.4 8.5 7.5	No significant change	Ong et al., 2006 and 2007
White-brined cheese	4°C, 90 days	<i>B. bifidum</i> Bb02 <i>Lb. acidophilus</i> La5	9.0 9.0	7.0 7.0	Yilmaztekin et al., 2004
Semi-hard cheese	12°C, 4 wks	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. paracasei</i>	6.9 7.39	7.8 9.1	Bergamini et al., 2005 and 2006
Semi-hard goat cheese	6°C, 70 days	<i>B. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i>	8.3 - 8.6 7.8 - 8.5	6.9 - 8.0 6.8 - 7.5	Gomes and Malcata, 1998
Canestrato Pugliese Hard cheese	12°C, 86 days	<i>B. bifidum</i> Bb02 <i>B. longum</i> Bb46	7.1 7.0	6.0 5.0	Corbo et al., 2001

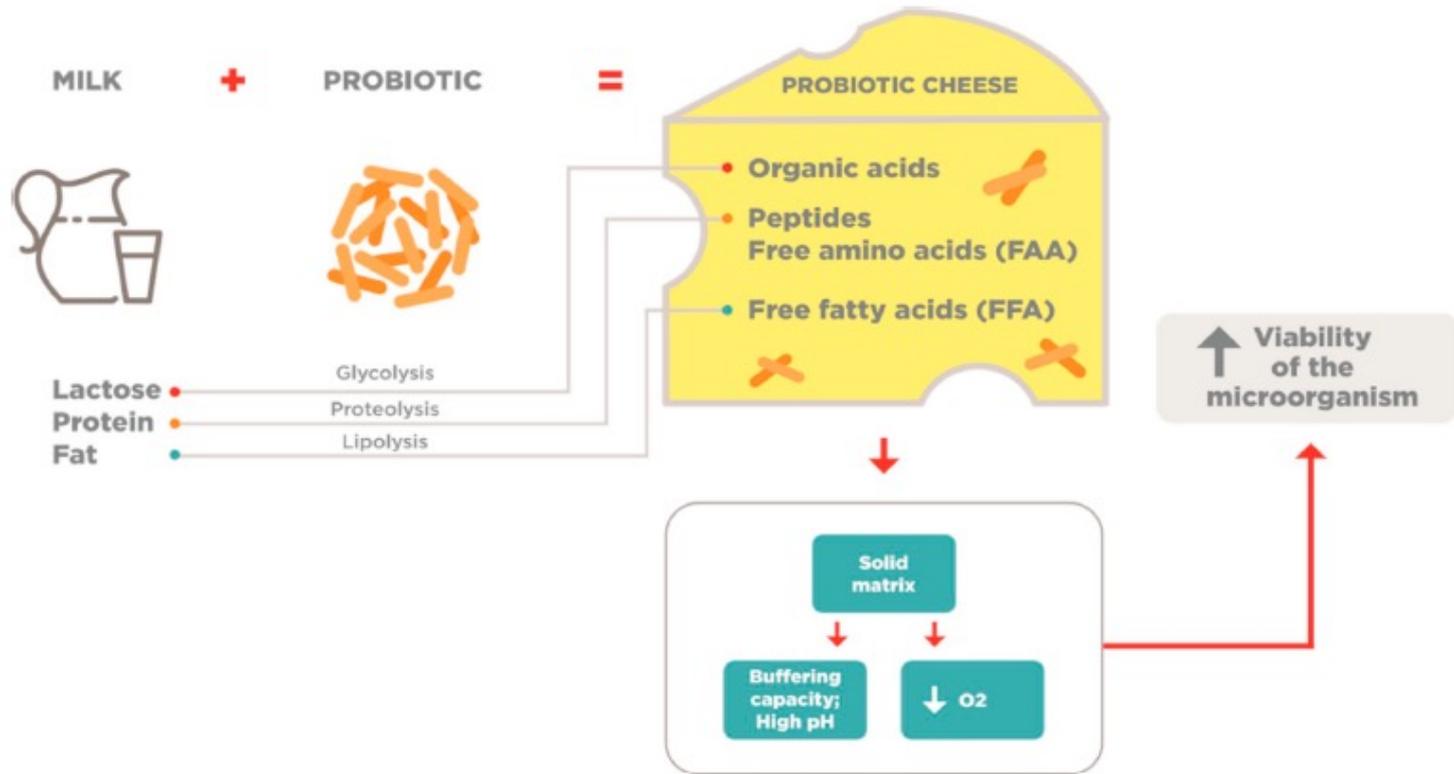


Fig. 1. Probiotic cheese has characteristics that contribute to preserving the viability of the probiotic and the probiotics modify the biochemical profile of protein, lipid and carbohydrate fractions of cheeses.

Cheeses act as protective matrixes for probiotic strains because they possess some factors that can contribute to the viability of these microorganisms in appropriate quantities, such as the availability of nutrients, fat and proteins that form a solid matrix with high buffering capacity, low oxygen contents and high pH values, as compared to other dairy products.

Cosa ne pensa l' EFSA?

In esame prodotti e ingredienti probiotici.

E' stata elaborata un a "lista positiva" detta QPS (Qualifica Presuntiva di Sicurezza) di specie batteriche, ritenute sicure per l' uso alimentare senza controlli analitici, eccetto la presenza di determinanti per antibiotico resistenza.

Dieci ingredienti respinti a titolo definitivo, mentre sugli altri il giudizio rimane sospeso per "mancanza di prove sufficienti per determinare le rivendicazioni".

L' EFSA pubblica una seconda serie di pareri sulle indicazioni “funzionali generiche” sulla salute

25 febbraio 2010

L' EFSA ha pubblicato una seconda serie di pareri su un elenco di indicazioni “funzionali generiche” sulla salute compilato dagli Stati membri e dalla Commissione europea. Il gruppo di esperti scientifici dell' EFSA sui prodotti dietetici, l' alimentazione e le allergie (NDA) ha valutato tutti i dati scientifici disponibili presentati a sostegno delle 416 indicazioni sulla salute. Tali pareri sono stati trasmessi alla Commissione europea e agli Stati membri, che decideranno in ultima istanza se autorizzare o meno tali indicazioni. Le valutazioni del gruppo di esperti scientifici NDA sono state positive ogniqualvolta le indicazioni erano fondate su prove scientifiche sufficienti, come quelle riguardanti vitamine e minerali. Gli esperti hanno tuttavia **espresso pareri sfavorevoli** sulla maggior parte delle indicazioni nella seconda serie a causa della scarsa qualità delle informazioni fornite all' EFSA, in particolare:

manca di informazioni per l' identificazione della sostanza su cui si basa l' indicazione, per esempio: “probiotici”;

manca di prove a sostegno dei vantati effetti benefici per il mantenimento o il miglioramento delle funzioni fisiologiche (per esempio, alimenti con “proprietà antiossidanti”);

manca di studi sull' uomo con misure attendibili dei vantati benefici per la salute.

Si tratta della seconda serie di pareri su indicazioni “funzionali generiche” sulla salute e il gruppo di esperti scientifici sta proseguendo il lavoro. L' EFSA collabora regolarmente con le parti interessate ed è consapevole dell' importanza di chiarire il procedimento seguito dal gruppo di esperti scientifici NDA nel valutare le indicazioni.

<http://www.efsa.europa.eu/it/press/news/nda100225.htm>

Troppe bugie sulle etichette. L'Efsa censura i probiotici e colpisce duramente gli alimenti funzionali

L' **Autorità europea per la sicurezza alimentare (Efsa)** ha bocciato buona parte delle 808 indicazioni salutistiche che le aziende alimentari utilizzano sulle etichette. Vittima illustre è il settore dei probiotici che, come è avvenuto nel dossier precedente, non ha superato i test di valutazione. Alcuni sostengono che proprio per evitare brutte figure Danone qualche mese fa ha ritirato la domanda presentata all' Efsa per un parere sulle diciture di Activia e Actimel.

Yakult ha invece mantenuto la richiesta ma non ha superato l' esame. Per il momento la bocciatura riguarda solo i batteri della specie *Lactobacillus casei Shirota* contenuti nei vasetti, che dovrebbero "aiutare a mantenere le difese immunitarie nel primo tratto respiratorio in caso di raffreddore". L' Efsa ha ritenuto insufficienti i 12 studi presentati dall' azienda. Yakult sostiene che la richiesta respinta riguarda solo un aspetto e attende fiduciosa il responso sulle altre diciture relative ai benefici per la flora intestinale e le difese immunitarie.

Questo ennesimo parere dell' Efsa, secondo *The Guardian*, infligge un duro colpo all'industria alimentare, che ha investito in modo massiccio nel settore degli alimenti funzionali. In ogni caso **tra aziende produttrici ed Efsa si è aperto un dibattito vivace sul sistema di valutazione dei probiotici e sui contenuti dei lavori scientifici senza approdare ad un punto di equilibrio. L' Efsa infatti chiede alle imprese per la validazione delle diciture salutistiche lavori scientifici simili a quelli dei farmaci e le aziende contestano questo principio.**

Per correttezza va però detto che alcuni claims salutistici presenti nei messaggi pubblicitari o sulle confezioni di famosi yogurt probiotici sono stati ritenuti non veritieri più di un anno fa.

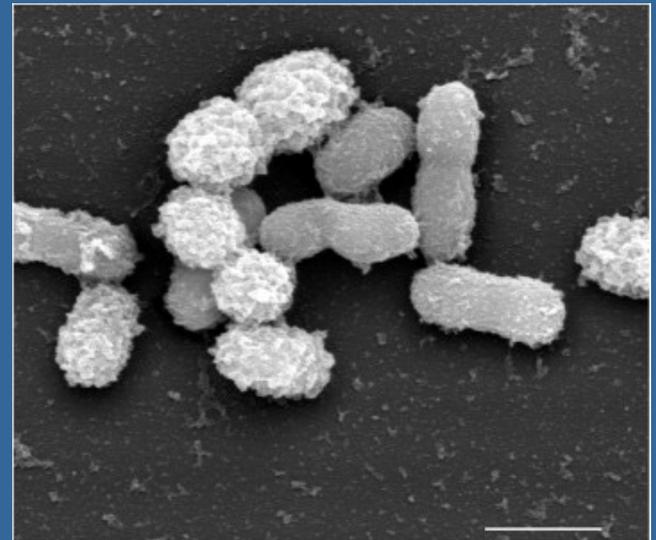
Roberto La Pira, Il Fatto Alimentare, 20 Ottobre 2010

Anno 2016: aggiornamento parere che ha sostanzialmente confermato questo!

Ma... A settembre 2021 l'**Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Efsa)** ha dato parere favorevole all'introduzione sul mercato di un nuovo probiotico, il batterio ***Akkermansia muciniphila*** pastorizzato, ritenuto sicuro ai livelli di assunzione specificati. Questo batterio è stato isolato dal microbiota umano nel 2004 dal professor Willem M de Vos, della Wageningen University (Paesi Bassi) ed è stato caratterizzato, mostrando una serie di benefici per la salute umana. In primis, **ristabilisce la funzione barriera intestinale**, riducendo quindi lo stato infiammatorio della mucosa. Inoltre **favorisce il controllo dell'accumulo di grasso**, il metabolismo del glucosio e un buon dispendio energetico.

NEXT GENERATION PROBIOTICS!

GRAM -, ANAEROBIO OBBLIGATO
Resistenza agli antibiotici?



I batteri lattici: amici o nemici ?



GRAS

Fermentanti

Probiotici

Antagonisti

Popolazione
microbica orale,
intestinale e
genitale

= AMICI!



I batteri lattici: GLI INSOSPETTABILI!



Characteristic	All cases (n=241)	Bacteremia (n=129)	Endocarditis (n=73)	Localized (n=39)	P value
Age (years)					
Mean	50.1	53.5	43.2	49.3	0.007 ^b
Median	52	57	43.5	52	
Range	<1-90	<1-90	6-80	<1-79	
Sex, n (%)					
Male	128 (53.1)	73 (56.6)	35 (48.0)	20 (51.3)	0.892 ^c
Female	86 (35.7)	51 (39.5)	21 (28.8)	14 (35.9)	
Unknown	27 (11.2)	5 (3.9)	17 (23.3)	5 (12.8)	
Species ^a , n (%)					
<i>L. acidophilus</i>	14 (10.0)	5 (9.4)	6 (9.4)	3 (13.0)	0.101 ^d
<i>L. brevis</i>	1 (0.7)	1 (1.9)	–	–	
<i>L. casei</i>	50 (35.7)	15 (28.3)	26 (40.6)	9 (39.1)	
<i>L. confusus</i>	3 (2.1)	1 (1.9)	–	2 (8.7)	
<i>L. curvatus</i>	3 (2.1)	2 (3.8)	1 (1.6)	–	
<i>L. delbrueckii</i>	1 (0.7)	1 (1.9)	–	–	
<i>L. fermentum</i>	4 (2.9)	1 (1.9)	1 (1.6)	2 (8.7)	
<i>L. gasseri</i>	1 (0.7)	1 (1.9)	–	–	
<i>L. jensenii</i>	3 (2.1)	1 (1.9)	2 (3.1)	–	
<i>L. lactis</i>	1 (0.7)	–	–	1 (4.4)	
<i>L. leichmannii</i>	2 (1.4)	2 (3.8)	–	–	
<i>L. paracasei</i>	10 (7.1)	4 (7.6)	5 (7.8)	1 (4.4)	
<i>L. plantarum</i>	14 (10.0)	2 (3.8)	11 (17.2)	1 (4.4)	
<i>L. rhamnosus</i>	32 (22.9)	17 (32.1)	11 (17.2)	4 (17.4)	
<i>L. salvarius</i>	1 (0.7)	–	1 (1.6)	–	
Polymicrobial, n (%)					
Yes	69 (28.6)	50 (38.8)	3 (4.1)	16 (41.0)	<0.001 ^d
No	172 (71.4)	79 (61.2)	70 (95.9)	23 (59.0)	

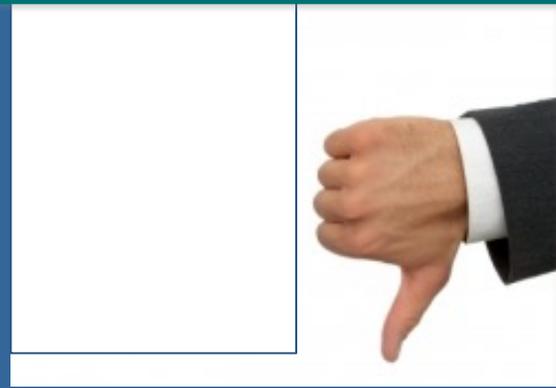
92
manoscritti:
1950-2003

Mortalità
totale ≈ 30%



= NEMICI!

Analizziamo i dati...



Infezioni ospedaliere in pazienti già immuno-compromessi (cancro, trapianti, diabete)

Lactobacillus in sangue e tessuti malati spesso considerato come contaminante.



MA



Possibile sottostima (anaerobiosi, richieste nutrizionali particolari, tempi di sviluppo)

Problema ospedaliero e non alimentare!

Elevata resistenza alla vancomicina (75-100% isolati a seconda dei lavori)

Presenza di fattori di virulenza che favoriscono l'adesione ai tessuti e la rottura di glicoproteine umane.





Finlandia 1999:

Paziente diabetica e ipertesa,
consumatrice di circa 500 ml/die di
bevanda probiotica, presenta
un'infezione con ascesso al fegato.

Patogeno: *Lactobacillus
rhamnosus*

Profili PFGE e fenotipico analoghi a
L. rhamnosus GG probiotico



Paziente



Probiotico

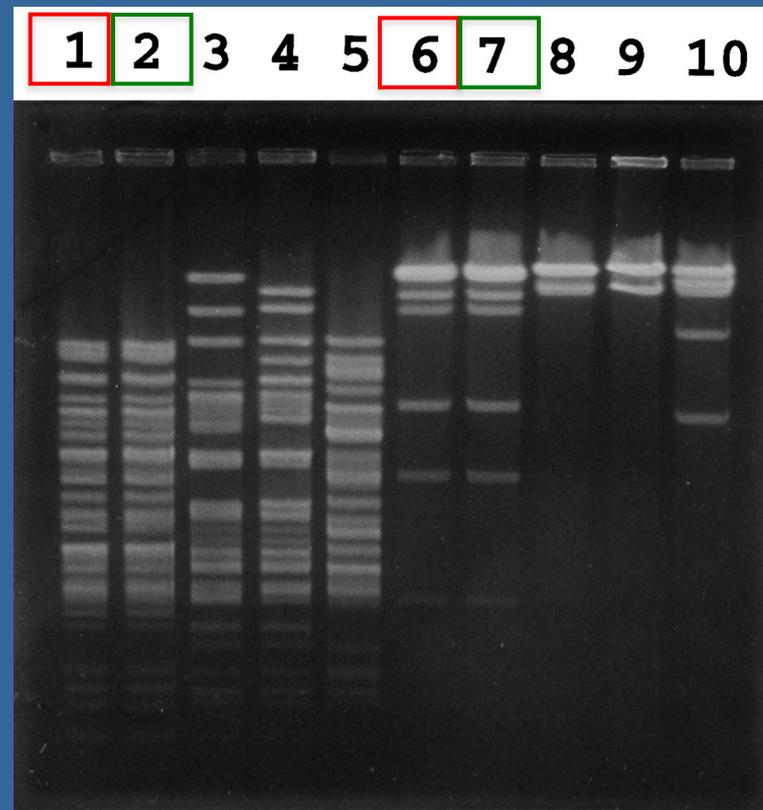


Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns with enzymes *NotI* (lanes 1–5) and *SfiI* (lanes 6–10) from different *Lactobacillus rhamnosus* strains. Restriction fragments of 4–500 kb and 23–500 kb are produced with *NotI* and *SfiI*, respectively. Lanes 1 and 6, isolate from the patient; lanes 2 and 7, *L. rhamnosus* GG; lanes 3 and 8, a strain of dairy origin (Lc705); lanes 4 and 9, *L. rhamnosus* ATCC 7469^T; and lanes 5 and 10, an unrelated strain of intestinal origin (42:15).

(Rautio et al., 1999)

Alimenti prebiotici

- ❖ Alimenti che contengono molecole o meglio “ingredienti non digeribili” nell’intestino tenue in grado di esplicare un effetto favorevole sullo sviluppo di uno o più gruppi di batteri intestinali presenti nel colon.
- ❖ Una caratteristica utile per un prebiotico è quella di essere fermentato da uno o pochi batteri probiotici.

I prebiotici hanno funzioni importanti nell'organismo:

- Sono essenziali per la crescita e il funzionamento della mucosa intestinale

- Aiutano a mantenere l'equilibrio idro-elettrolitico e forniscono energia e nutrienti per il microbiota intestinale

- Alleviano la costipazione o diarrea (proprietà anti-adesive che ostacolano l'attecchimento di patogeni sulla mucosa intestinale. Il cellobiosio riduce la virulenza di *L. monocytogenes*)

- Riducono i trigliceridi sierici, colesterolo e lipoproteine a bassa densità

- Riducono l'indice glicemico dopo i pasti

- Riducono la produzione di enzimi genotossici, legati allo sviluppo di tumori

- GOS incrementano l'assorbimento di Ca e Mg

Applicazioni in ambito alimentare



Prodotti da forno:

+ fibra, + umidità ed estensione della shelf-life

Succhi e creme:

+ fibra e proprietà gelificanti



Prodotti low-fat

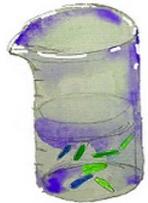
+ fibra e proprietà gelificanti. mantenimento cremosità ed emulsione

Molecole prebiotiche

- Peptidi
- Proteine
- Carboidrati non digeribili
 - Oligosaccaridi
 - Frutto-oligosaccaridi (FOS) (glucosio + fruttosio)
 - Lattulosio
 - Galatto-oligosaccaridi (contenuti in gomma arabica)
 - Malto-oligosaccaridi

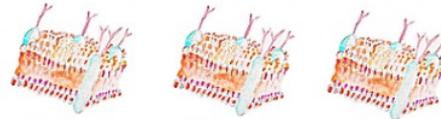
Principali metodi di acquisizione dei postbiotici

Estrazione enzimatica



Supernatanti

Sonicazione

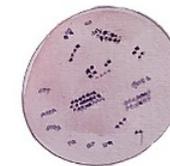


Frammenti della parete cellulare

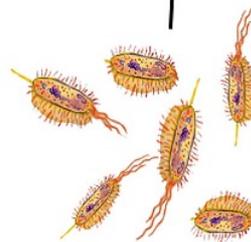
Calore



Estrazione Chimica



Esopolisaccaridi (EPSs)



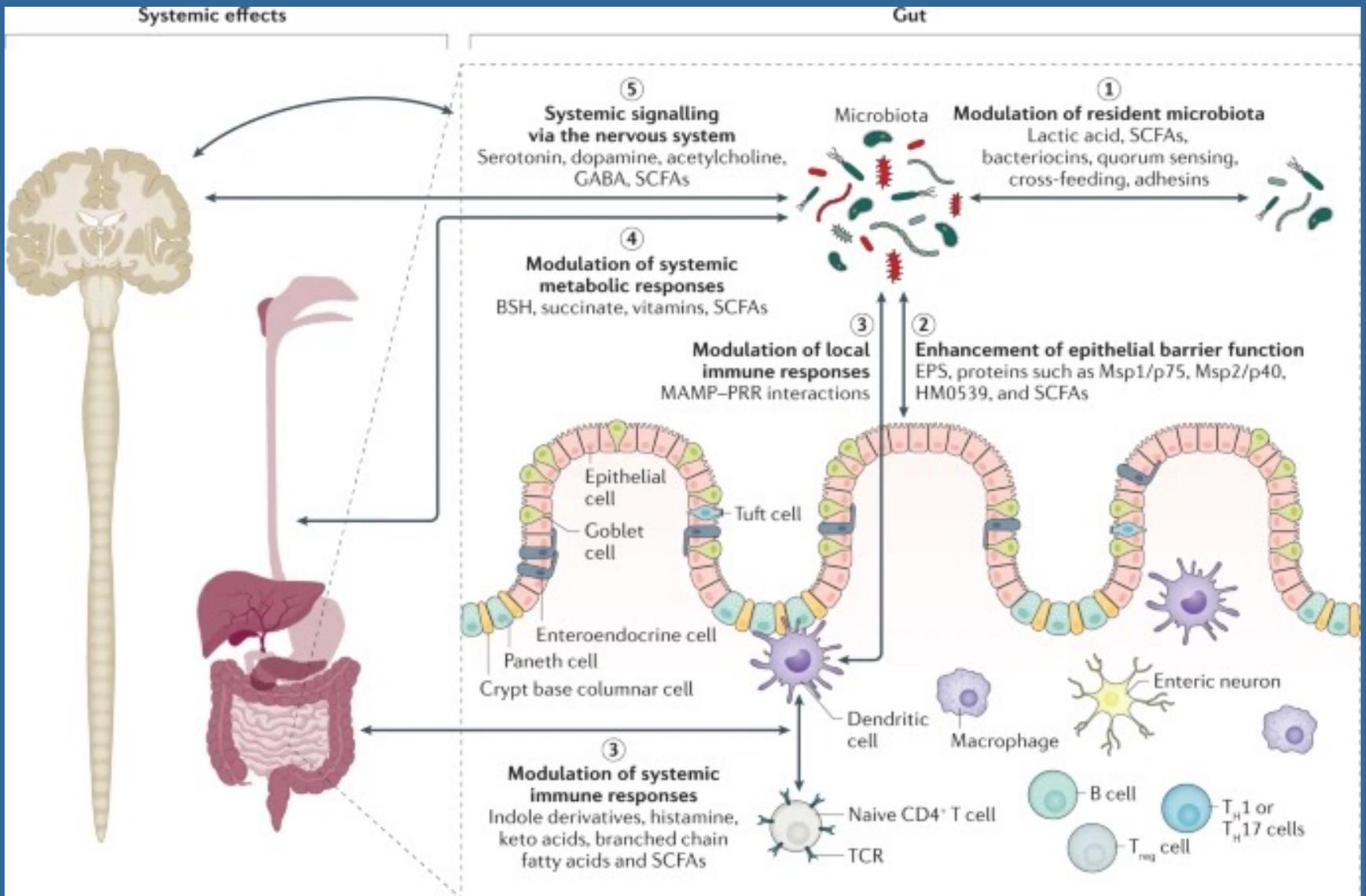
Acidi grassi a catena corta (SCFAs),
vitamine, fenoli



Enzimi



Lisati batterici



Di AA, VV. - Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 May 4. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6. Epub ahead of print. PMID: 33948025., CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=105565503>

Bioactive peptides

- products of protein degradation with a physiological effect
- inactive within the sequence of the proteins
- physiological effect is liberated by proteolysis
- fermentation or digestion
- in 1979 provided evidence of peptides with a biological activity
→ casomorphins with an opioid effect

Definition

Peptides with hormone- or drug-like activity that eventually modulate physiological function through binding interactions to specific receptors on target cells leading to induction of physiological responses (Fitzgerald & Murray, J.Nutr., 2006)

Componenti (naturali o generati) di alimenti che esercitano un effetto regolatore sull'organismo umano, indipendentemente dal loro possibile ruolo nutrizionale.

Alimenti funzionali: Peptidi bioattivi

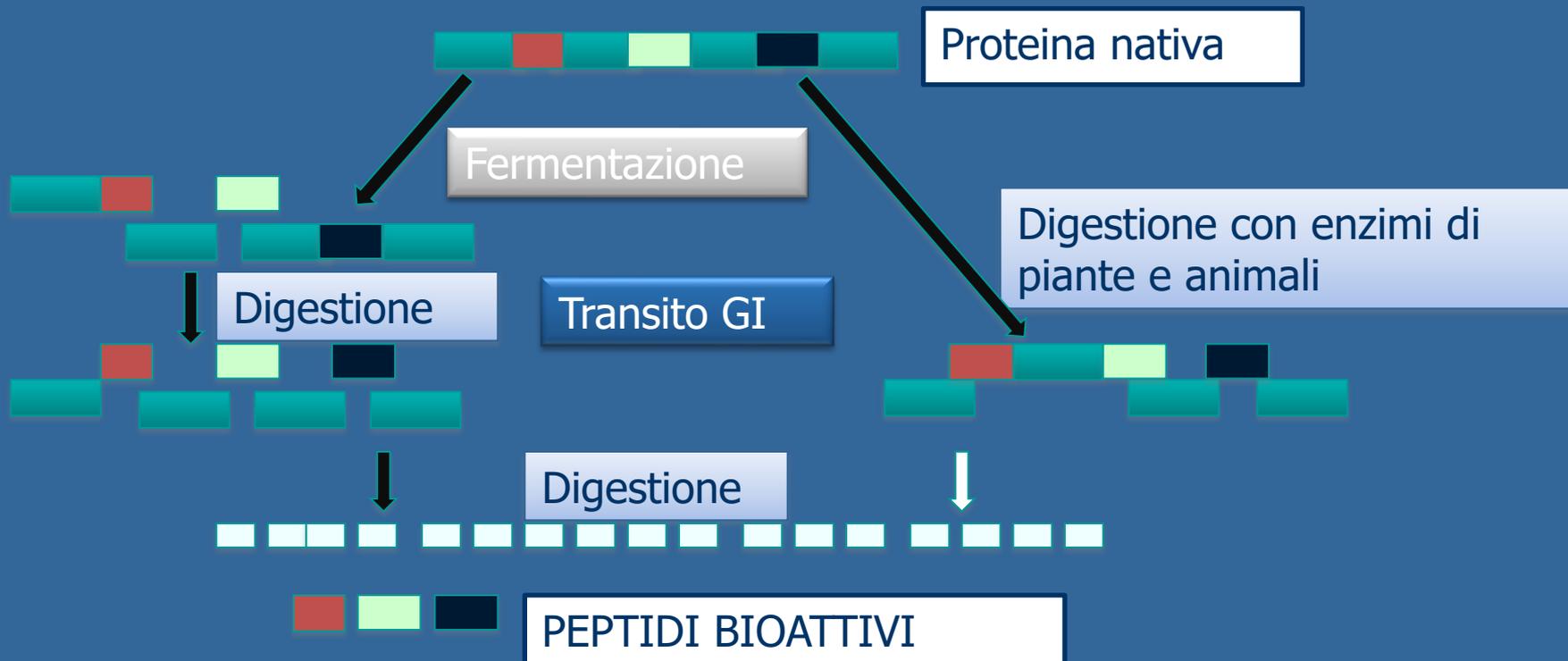


Bioactive peptides in milk

blood pressure lowering, immunomodulating, antimicrobial, cellmodulating, anticancerogenic, anticariogenic, antithrombotic, antiinflammatory, cholesterol-lowering, opioid, mineral-binding...

	1			31			
α_{s1} -Kasein	199	RPKHPIKBQG	LPQEVLNENL	LRFFVAPFFE	VFGKEKVNEL	SKDIGSESTE	DQAMMDIKQM
β -Kasein	209	RELEELNVFG	EIVESLSLSE	ESITRINKKI	EKFQSEEQQQ	TEDELQDKIH	PPAQTSLSVY
	61			91			
α_{s1} -Kasein		MANSISSSEH	IVFNSVQKH	IQKEDVPSER	YLGYLEQLLR	LKKYKVFQLE	IVFNSAEERL
β -Kasein		FFDGLIPSL	PQNIFFLTQT	FVVVPFFLQP	EVMGVSKVKE	AMAFKKKEMP	FFKYFVEPFT
	121			151			
α_{s1} -Kasein		HSMKEGIHAQ	QKEPMIGVNQ	ELAYFPELFF	RQFVQLDAYP	SGAWYVFLG	TQYTDAPSFS
β -Kasein		ESQSLTLTDV	ENLHLPLPLL	QSWMHQPHQP	LPPTVMFFPQ	SVLSLSQSKV	LFVFPKATVY
	181						
α_{s1} -Kasein		DIPNPIGSEN	SEKSNHSLG				
β -Kasein		FQRDMPIQAF	LLVQEPVLGP	VRGPPFPIIV			

ACE, casomorphin, phosopeptide, immuno-stimulating

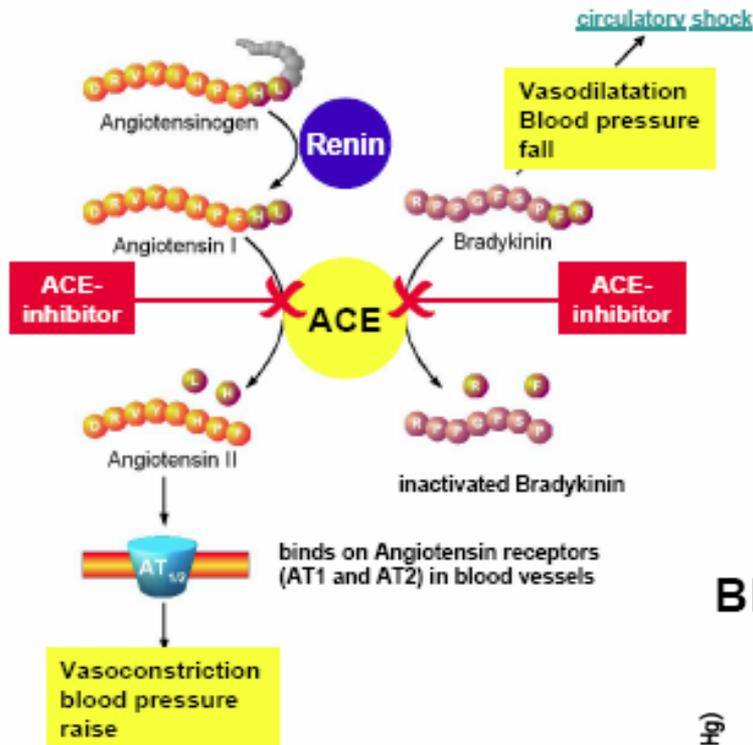


Sequenze rilasciate in seguito ad idrolisi (peptidi criptici)

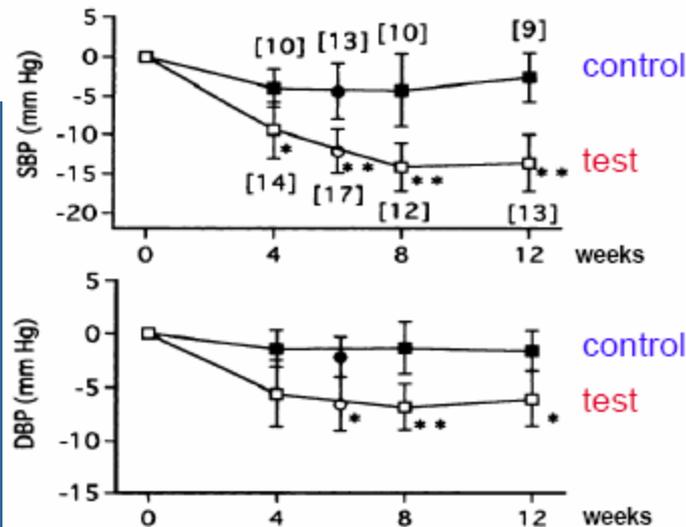
- **Fosfopeptidi (CPP)**
- Caseinomacropptide
- Caseinomorfine
- Peptidi Immunomodulatori
- Peptidi antitrombotici
- **Inibitori dell'ACE (Angiotensin I-converting enzyme)**
- Peptidi antibatterici

BP and effect of ACE-inhibiting peptides

(angiotensin I-converting enzyme)



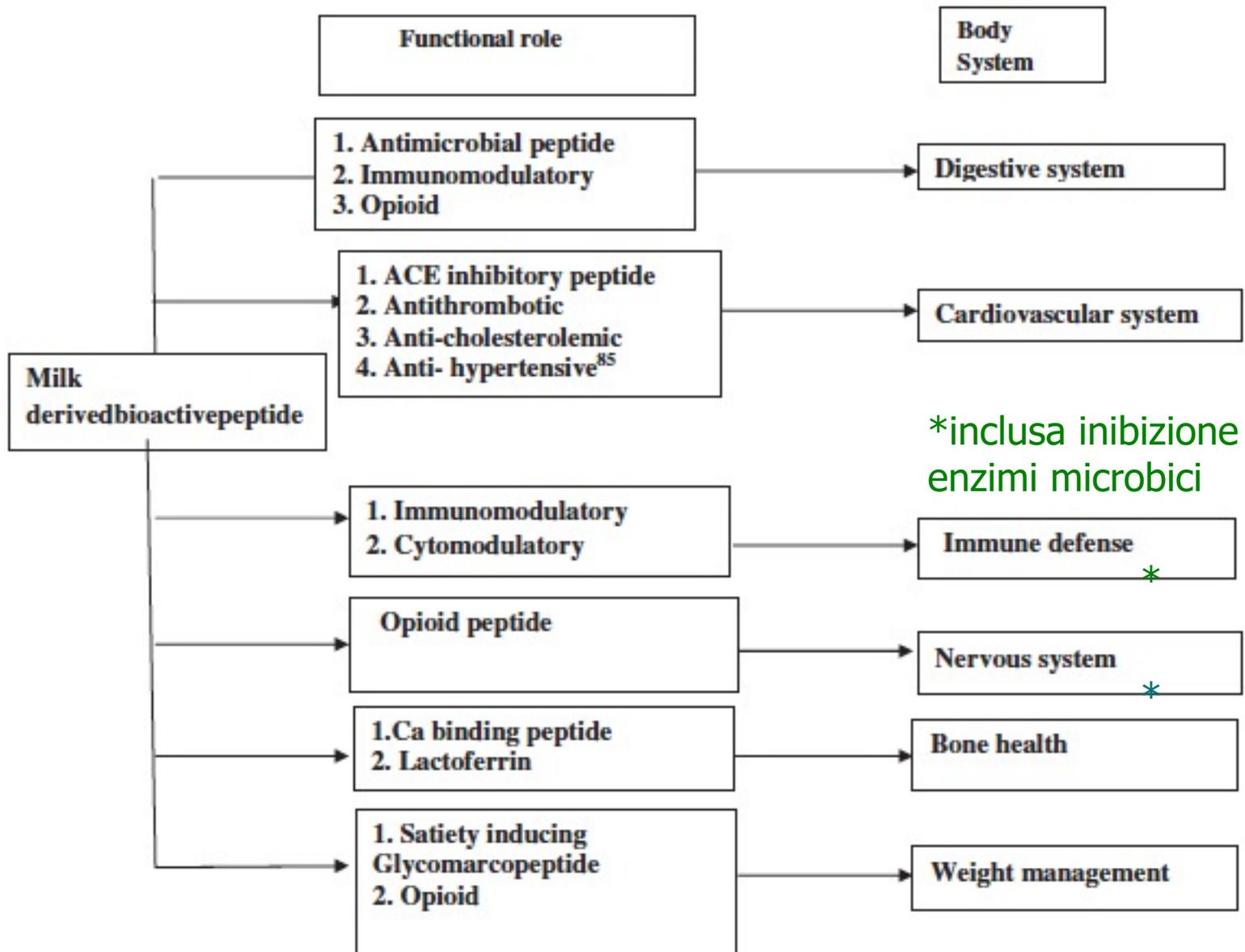
Blood pressure: Results human study



VPP 1.5 mg
and
IPP 1.1 mg



RUOLO DEI PEPTIDI BIOATTIVI NELL'ORGANISMO UMANO



*inclusa inibizione di enzimi microbici

* sindrome post-partum!

LATTI FERMENTATI

Una bevanda giapponese (Calpis) prodotta da latte scremato fermentato con *Lb. helveticus* e *S. cerevisiae* contiene peptidi ACE-inibitori (Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro).

Gli stessi peptidi antipertensivi sono stati trovati in latte inoculato con *Lb. helveticus* e in idrolizzati di caseina prodotti con la proteinasi extracellulare di *Lb. helveticus* CP790.

Alimenti funzionali



Contengono molecole con proprietà benefiche, oltre a possedere le tradizionali caratteristiche nutrizionali (National Research Council 1994)

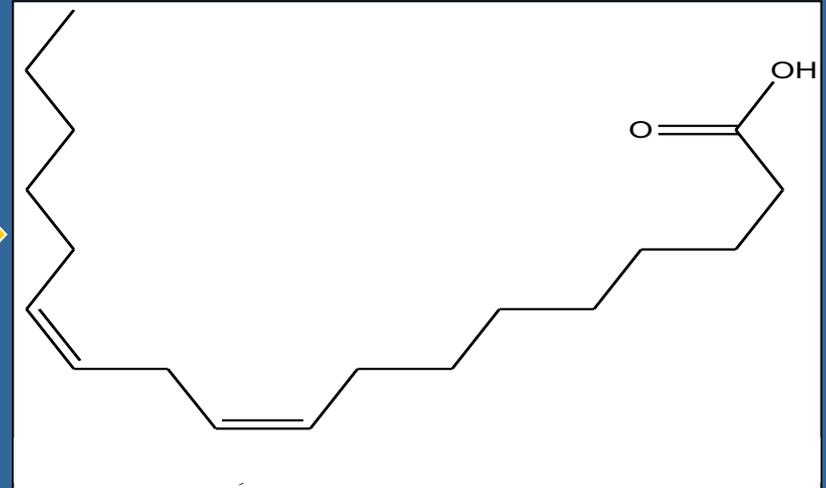


Acidi Linoleici Coniugati (CLA)

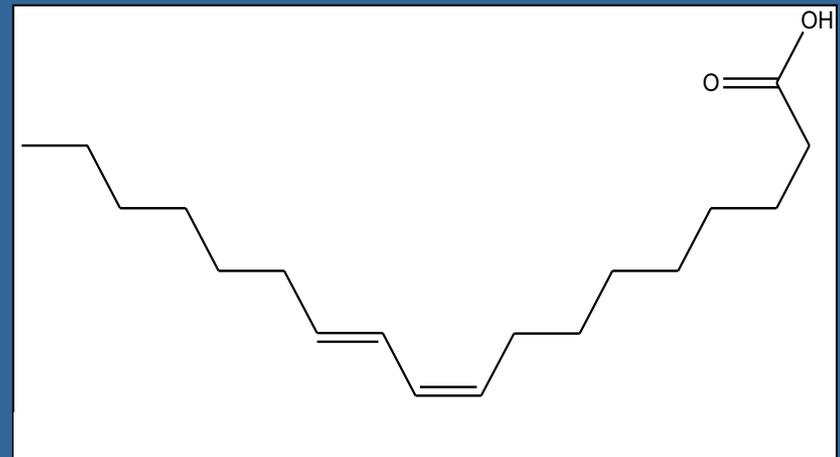
Componenti alimentari funzionali presenti in prodotti lattiero-caseari

CLA

Gruppo di isomeri
geometrici e di posizione
dell'acido linoleico
(*cis*-9, *cis*-12
octadecadienoic acid)



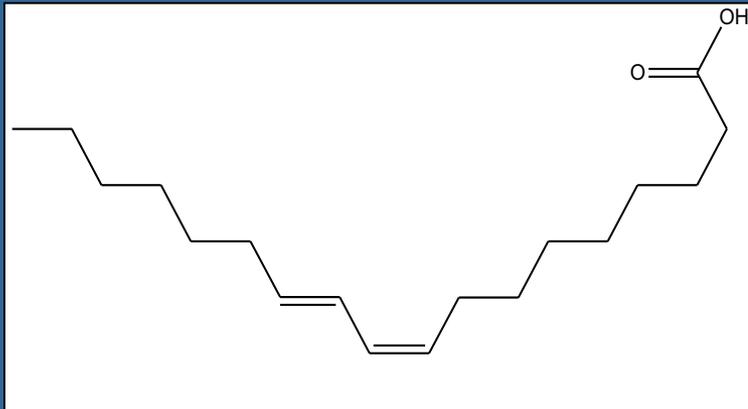
con doppi legami
coniugati



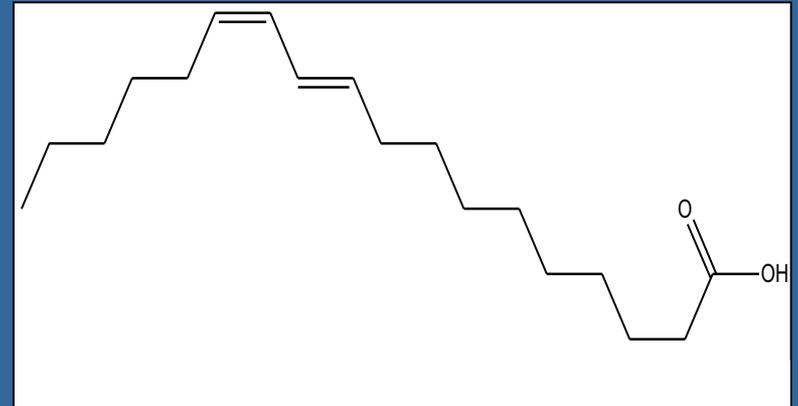
Esistono 56 possibili isomeri dell'acido linoleico

Proprietà dei CLA

cis-9, trans-11 CLA



trans-10, cis-12 CLA



Proprietà salutistiche promosse

- Potenti inibitori della crescita tumorale (*Scimeca et al. 1999*)
- Azione anti-aterogena (*Lee et al. 1994*)
- Miglioramento delle funzioni immunologiche (*Hayek et al. 1999*)
- Riduzione del grasso corporeo (*Park et al. 1997*)

Biosintesi dei CLA

Fonti alimentari a maggior contenuto di CLA



Alimenti contenenti grasso dei ruminanti: latte, prodotti lattiero caseari e carne

Sintesi dei CLA



Ghiandola mammaria di vacche in lattazione

Acido Vaccenico

Δ^9 -desaturasi nel tessuto mammario



cis-9, trans-11 CLA

Rumine

Acido linoleico

Acido linoleico isomerasi di *Butyrivibrio fibrisolvens*

cis-9, trans-11 CLA (prodotto intermedio)

Acidi oleico e stearico



Table 1- Increase of CLA (mg/L) by lactic acid cultures in MRS broth additioned with free linoleic acid (300 ppm).



Strain	c9, t11 (mg/L)	t10, c12 (mg/L)	Total CLA (mg/L)	pH
<i>Lactobacillus paracasei</i> 37-B8.7	+13,4	+13,6	+27,0	4,71
<i>Lactobacillus paracasei</i> 37-B8.7.2	+3,3	+3,9	+7,2	4,69
<i>Lactobacillus plantarum</i> 110-C9.10	+2,4	+4,5	+7,0	4,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 110-C9.10.2	+6,3	+6,5	+12,8	3,87

Dal Bello et al., 2008

Produzione di CLA: caratteristica di ceppo più che di specie!