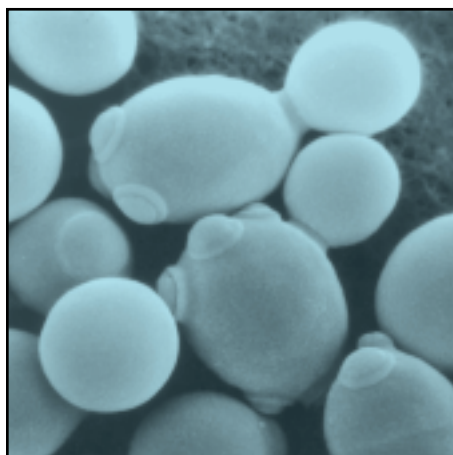
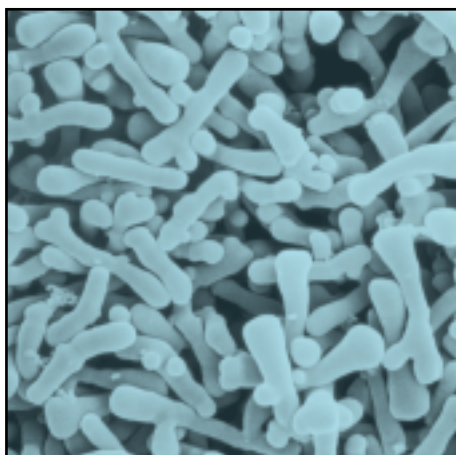
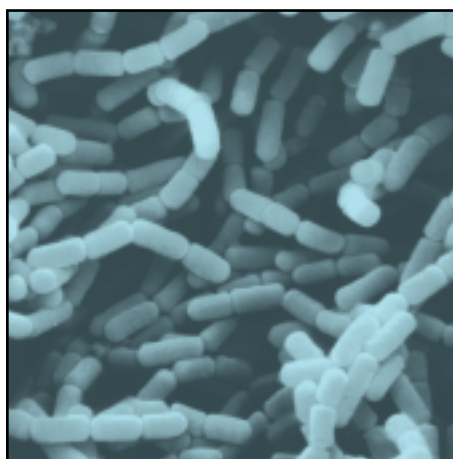
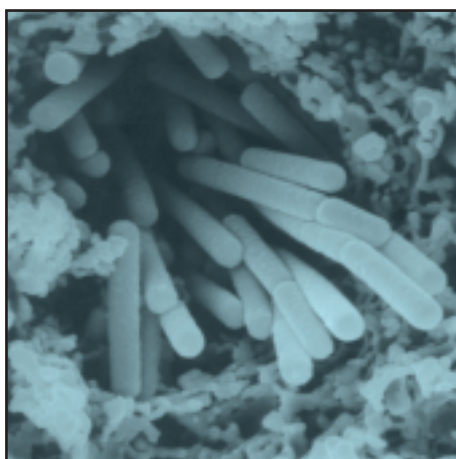


# LATTE-FERMENTATI FUNZIONALI PROBIOTICI

## NUOVE OPPORTUNITA' PER IL BENESSERE DELL'UOMO

**PROF. VITTORIO BOTTAZZI**

già Direttore Istituto di Microbiologia e Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica, Piacenza e Cremona



# LATTE-FERMENTATI FUNZIONALI PROBIOTICI

## NUOVE OPPORTUNITA' PER IL BENESSERE DELL'UOMO

**PROF. VITTORIO BOTTAZZI**

già Direttore Istituto di Microbiologia e Centro Ricerche Biotecnologiche  
Università Cattolica, Piacenza e Cremona

*Editore:* Èlite Communication Srl - Viale Teodorico, 3 - 20149 Milano

Tutti i diritti riservati

Nessuna parte può essere riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore

Finito di stampare nel mese di Dicembre 2004

Stampa Printitalia - Solaro

Finito di stampare nel mese di Dicembre 2004

Pubblicazione fuori commercio di cui è vietata la vendita

# INDICE

## **5 Introduzione**

## **7 Microrganismi per la preparazione di alimenti**

- 7 Abbinamento alimenti-microrganismi
- 9 Associazioni di microrganismi ed effetti nella preparazione di alimenti
- 16 Distribuzione di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* secondo la loro funzione tecnologica o probiotica
- 21 Caratteri generali per *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

### 24 Riferimenti Bibliografici

## **25 Latte-fermentati: alimenti funzionali**

- 26 Definizione di alimento funzionale
- 27 Latte-fermentati funzionali
- 28 Proprietà funzionali di base dello yogurt
- 30 Proprietà funzionali di base del latte-fermentato kefir
- 34 Proprietà funzionali di base del latte-fermentato tibetano (yogurt tibetano), del latte fermentato con *Lactobacillus acidophilus* o con *Lactococcus lactis*
- 35 Proprietà funzionali di base del latte-fermentato biogenico
- 38 Proprietà funzionali di base del latte-fermentato Yakult
- 40 Quadro generale delle caratteristiche funzionali di base di latte-fermentati
- 41 Riferimenti Bibliografici

## **47 Proprietà funzionali aggiuntive per i latte-fermentati**

### **47 Latte-fermentati probiotici**

- 47 La microflora intestinale
- 49 Distribuzione dei microrganismi nel tratto gastro-intestinale
- 50 Colonizzazione batterica nei primi mesi di vita
- 52 Definizione di probiotici
- 54 Batteri lattici e bifidobatteri enterici
- 56 Basi per la selezione di ceppi di microrganismi probiotici
- 59 Modulazione della microflora intestinale ed effetti probiotici sulle patologie infettive
- 60 Quantità di microrganismi probiotici necessari per ottenere una temporanea colonizzazione intestinale

### **60 Latte-fermentati prebiotici**

- 60 Composti prebiotici
- 62 Inulina e oligofruztosio: origine e composizione chimica

63	Proprietà bifidogene di inulina e oligofruztosio
68	Proprietà bifidogene di galattooligosaccaride (GOS) e di lattulosio
72	<b>Latte-fermentati simbiotici</b>
72	Combinazione di probiotici e prebiotici
74	Azioni complementari dovute all'associazione di differenti prebiotici
75	Attese dall'ingegneria genetica dei batteri lattici
79	Riferimenti Bibliografici
<b>89</b>	<b>Latte-fermentati funzionali speciali</b>
89	Latte-fermentato con aggiunta di mirtilli
90	Latte-fermentato con aggiunta di licopene
91	Latte-fermentato con aggiunta di fitosteroli e fitostanoli
93	Riferimenti Bibliografici
<b>97</b>	<b>Aree di ricaduta degli effetti salutistici con latte-fermentati funzionali</b>
<b>101</b>	<b>Nuovi latte-fermentati di Danone con funzioni speciali</b>
101	Actimel® e <i>Lactobacillus casei</i> IMUNITASS DN-114 001
106	Riferimenti Bibliografici
107	Activia® e <i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010
109	Riferimenti Bibliografici

# INTRODUZIONE

*L'argomento sul quale abbiamo voluto fermare la nostra attenzione e che forma l'oggetto del presente opuscolo, è molto vasto, complesso e certamente impegnativo.*

*Dobbiamo però subito precisare che sin dall'inizio ci siamo imposti di contenere le nostre considerazioni in un numero limitato di pagine e di fare in modo che il quadro complessivo risultasse formato da diversi tasselli disposti secondo una sequenza ritenuta logica e con contenuto sufficiente per richiamare conoscenze acquisite, tematiche applicative o future strategie.*

*Da questa impostazione ne è derivato che l'opuscolo è articolato su un numero limitato di capitoli e, per ognuno di essi, di paragrafi con i quali si configura la tematica che viene poi accompagnata da una ricca bibliografia riferita agli ultimi decenni della ricerca scientifica e tecnica.*

*Proprio alle indicazioni bibliografiche si è voluto dare spazio per consentire al lettore di disporre di uno strumento utile per approfondire gli argomenti di interesse.*

*Così dopo una panoramica di carattere generale sulla partecipazione dei microrganismi nella preparazione degli alimenti, viene concentrata l'attenzione, per gli aspetti di alimenti funzionali, sui latte-fermentati.*

*L'esame viene fatto indipendentemente dal loro valore nutrizionale di base ma tenendo conto dei composti metabolici accumulati con la fermentazione.*

*A titolo di esempio vengono riportate le proprietà di yogurt, kefir, yakult, latte-fermentato tibetano e latte-fermentato biogenico.*

*Con il terzo capitolo si introduce la tematica che riguarda le proprietà funzionali aggiuntive per i latte-fermentati e quindi i latte-fermentati probiotici, quelli prebiotici e quelli simbiotici, che nell'insieme condensano vari aspetti delle scienze e traducono in pratica, per il benessere salutistico dell'uomo, i risultati delle molte ricerche condotte nel corso dell'ultimo secolo e in particolare degli ultimi decenni.*

*Il concetto che sostiene la strategia probiotica, parte da Elia Metchnikoff, vale a dire circa cento anni fa, e si è sviluppato con gli studi di microbiologia intestinale; da una popolazione autoctona residente valutata in  $10^{14}$  cellule batteriche per grammo e composta da più di 500 specie di microrganismi diversi, si sono fatti emergere i bacilli e i bifidobatteri probiotici, in quanto in grado di conferire benefici salutistici per l'uomo.*

*È stato dimostrato che, come probiotici esogeni, questi microrganismi pur non sempre colonizzando il tratto digestivo, almeno non nello stesso modo della microflora autoctona, durante il loro transito riescono effettivamente a manifestare effetti positivi per la salute umana.*

*Su questo aspetto vengono fatti diversi richiami, inquadrando poi il tutto sulla possibilità di realizzare associazioni di probiotici con prebiotici finalizzate all'ottenimento di un buon sviluppo della popolazione probiotica, in funzione di una*

*corretta modulazione del microbiota intestinale.*

*Infine il presente opuscolo si chiude con un breve capitolo riservato ai latte-fermentati funzionali speciali, che vengono intesi come alimenti preparati, sulla base di una larga documentazione scientifica, per aumentare ulteriormente le proprietà salutistiche in modo da avere in un alimento larga funzionalità.*

*A questo proposito viene fatto l'esempio di latte-fermentati probiotici o simbiotici aggiunti di mirtilli o di licopeni o di fitostanoli.*

*Da tutto l'insieme risulta un opuscolo destinato a chi già possiede conoscenze sui latte-fermentati e per essi, con i molti richiami bibliografici effettuati, vuol essere anche un mezzo per un aggiornamento tecnico-scientifico.*

*Nello stesso tempo però è rivolto al consumatore, che in verità può risultare l'utente più immediato, in quanto, per la trattazione di una materia così complessa, si è cercato di introdurre, nel modo più ampio possibile, la caratteristica della forma divulgativa e schematica.*

*È per noi, infine, atto doveroso ringraziare con sentimenti di viva riconoscenza per la preziosa collaborazione prestata nel corso della stesura del presente elaborato, la Sig.ra Passerini Ivana dell'Istituto di Microbiologia e del Centro Ricerche Biotecnologiche dell'Università Cattolica di Piacenza e Cremona.*

**Prof. Vittorio Bottazzi**

Dicembre 2004



## MICROORGANISMI PER LA PREPARAZIONE DI ALIMENTI

**D**a tempi lontanissimi l'uomo consuma alimenti preparati con l'intervento di vari microrganismi.

Un'ampia documentazione tecnico-scientifica mette in evidenza, con indubbia chiarezza, che differenti microrganismi sono, ad esempio, indispensabili per la preparazione di latte-fermentati, formaggi, creme acide e burro, carni fermentate, pane, vino, birra e vegetali fermentati.

Per ottenere detti alimenti, i microrganismi vi partecipano con molte differenti specie distribuite in vari generi. Una loro dettagliata e ordinata distribuzione diventa difficile e risulterebbe comunque incompleta, perché ben più di trecento sono gli alimenti fermentati conosciuti nel mondo, frutto dell'intervento di diverse associazioni batteriche e di simbiosi, sulle quali i fattori ambientali locali, i processi tecnologici, nonché le abitudini e le tradizioni delle varie comunità etniche, possono esercitare azioni selettive sino ad indurre diversità organolettica.

In questa pubblicazione verrà inizialmente fornita una breve panoramica sull'abbinamento alimenti-microrganismi, per passare poi a considerare le associazioni di microrganismi nella preparazione di alimenti e la distribuzione di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* secondo la loro funzione tecnologica e probiotica.

### Abbinamento alimenti-microrganismi

Un'indicazione di abbinamento tra alimenti e microrganismi viene fornita, con riferimento ai derivati del latte, con la **tabella 1**, mentre con la **tabella 2** il richiamo è per il settore delle carni e del pane.

**TABELLA 1.** Alimenti e microrganismi del settore lattiero-caseario

Indicazione di alimento	Microrganismo
Latte-fermentati e probiotici	<i>Acetobacter</i> <i>Lactococcus</i> e <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Candida</i> , <i>Hansenula</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Geotricum</i> , <i>Willopsis</i>
Crema acida e burro	<i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i>
Formaggi	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Streptococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Penicillium</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Geotricum</i> <i>Kluyveromyces</i>

**TABELLA 2.** Alimenti e microrganismi per il settore delle carni e per il pane

Indicazione di alimento	Microrganismo
Carni lavorate	<i>Halomonas</i> <i>Kocuria</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Hafnia</i>
Pane	<i>Enterobacter</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Saccharomyces</i>

## Associazioni di microrganismi ed effetti nella preparazione di alimenti

Nell'ambito del settore lattiero-caseario, la combinazione associativa di microrganismi nella preparazione di alimenti varia notevolmente. A titolo di esempio si può richiamare la semplice combinazione a due per la produzione dello yogurt, quella più ampia che interessa la produzione del formaggio gorgonzola o, infine, quella alquanto complessa per la produzione del formaggio grana.

Per quanto riguarda la produzione di yogurt, che rappresenta il latte-fermentato di più larga diffusione nel mondo, l'associazione è costituita da *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e da *Streptococcus thermophilus*, che sono microrganismi biosicuri indicati a DNA alimentare e utilizzati dall'uomo da tempi lontanissimi.

Formano un'accoppiata che si caratterizza per una grande specializzazione tecnologica e, nello stesso tempo, perché sono in grado di esercitare diverse attività biochimiche che caratterizzano il prodotto finale. Alcune di queste attività biochimiche si traducono nell'accumulo di composti in quantità considerevole che si possono esprimere in percento del prodotto, altri invece in quantità anche molto piccole, vale a dire in parti per milione (ppm), ma non per questo meno importanti dei primi.

Nel complesso, lo sviluppo in associazione, con un'eccellente manifestazione di sinergismo microbico, porta, nel caso dello yogurt, alla liberazione di:

- acido lattico L(+) e D(-), acido formico, acido benzoico, acido folico, acido 3-idrossi-3-metilglutarico, acidi nucleici;
- $\beta$ -galattosidasi (lattasi), proteasi, peptidasi;
- galattosio;
- aldeide acetica, acetone, etanolo, diacetile;
- anidride carbonica, ammoniaca;
- polisaccaridi;
- peptidi, corti peptidi (compreso peptidi bioattivi), aminoacidi.

Per le principali attività biochimiche sopra richiamate possono essere fatte alcune brevi considerazioni.

## Produzione di acido lattico

Lo schema metabolico per l'utilizzazione da parte dell'associazione *Lactobacillus-Streptococcus* del lattosio è quello EMP, con la primaria caratterizzazione descritta in **tabella 3**.

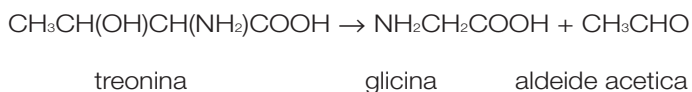
**TABELLA 3.** Caratterizzazione primaria del metabolismo del lattosio

Specie di microrganismo	Sistema di trasporto del lattosio	Enzima per l'idrolisi del lattosio	Prodotto della fermentazione del lattosio*	Isomeri di acido lattico	Esoso liberato
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>  <i>Streptococcus thermophilus</i>	Permeasi	β-galattosidasi (lattasi)	2 di acido lattico	L (+) e D (-)	Galattosio

\*: mole per mole utilizzata

## Produzione di aldeide acetica

La produzione di aldeide acetica è proprietà di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; l'aldeide acetica deriva principalmente dall'aminoacido treonina per intervento di treonina aldolasi secondo la seguente reazione:



## Liberazione di aminoacidi

La liberazione di aminoacidi a carico delle proteine del latte è il risultato dell'attività proteolitica dei batteri lattici dello yogurt e dall'esame della **tabella 4** si ricava un'idea dell'intensità idrolitica che viene raggiunta.

**TABELLA 4.** Liberazione di aminoacidi nello yogurt in seguito all'attività proteolitica in confronto con il latte.

Aminoacidi	mg per 100 ml			
	Latte		Yogurt	
Lisina	0,25	0,22	0,80	0,88
Istidina	0,11	0,11	0,80	1,09
Arginina	0,16	0,96	0,70	1,39
Acido aspartico	0,52	0,23	0,70	1,20
Treonina	0,26	0,09	0,70	0,60
Serina	1,35	0,08	2,90	2,21
Acido glutammico	1,48	3,90	3,90	7,06
Prolina	0,12	0,12	5,40	6,33
Glicina	0,30	0,53	0,45	0,38
Alanina	0,64	0,16	3,80	1,43
Valina	0,10	0,10	0,90	1,41
Metionina	0,05	0,05	0,20	0,05
Isoleucina	0,06	0,07	0,40	0,52
Leucina	0,26	0,06	0,70	0,92
Tirosina	0,14	0,06	0,25	0,18
Fenilalanina	0,13	0,05	0,45	0,17

Le due colonne di dati per il latte e per lo yogurt si riferiscono ai risultati ottenuti da due differenti gruppi di ricercatori. (Tamime, Deeth - 17)

### Produzione di acido 3-idrossi-3-metilglutarico

L'acido 3-idrossi-3-metilglutarico è considerato un composto ad azione ipocolesterolemica e si accumula nello yogurt con la fermentazione lattica. La quantità media che si raggiunge è indicata in **tabella 5**.

**TABELLA 5.** Concentrazione di acido 3-idrossi-3-metilglutarico e di altri composti ad effetto ipocolesterolemico nel latte e nello yogurt

Composto	Concentrazione in ppm	
	Latte	Yogurt
Acido orotico	70	25
Acido urico	16	15
Acido 3-idrossi-3-metilglutarico	0	145

## Accumulo di acido benzoico

Si ritiene che l'acido benzoico derivi dall'acido ippurico, che è un normale costituente del latte, ma piccole quantità potrebbero trarre origine anche dal catabolismo della tirosina. La quantità accumulata nello yogurt è significativa come si vede in **tabella 6**.

**TABELLA 6.** Contenuto in acido benzoico nello yogurt.

Indicazione di prodotto	Quantità in ppm di acido benzoico
Latte crudo	Tracce
Burro	Tracce
Formaggio camembert	7
Yogurt	20 - 50

## Accumulo di polisaccaridi, acido formico e CO<sub>2</sub>

Con la **tabella 7** si riportano, infine, le quantità accumulate in yogurt di polisaccaridi, acido formico e CO<sub>2</sub>.

**TABELLA 7.** Contenuto in polisaccaridi, acido formico e CO<sub>2</sub> in yogurt (mg/kg)

Polisaccaridi	Acido formico	CO <sub>2</sub>
55 - 100	40	150 - 300

Dall'associazione microbica semplice per la produzione dello yogurt, si passa a quella complessa che interviene nella produzione del formaggio grana. In questa combinazione, la specie *Lactobacillus helveticus* è quella più rappresentata e ad essa si associano le seguenti altre specie di batteri lattici quali *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* e subsp. *pseudoplanarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Pediococcus acidilactici* e *Propionibacterium freudenreichii*.

Nel corso della maturazione del formaggio grana padano, prodotto con aggiunta al latte di lisozima, le specie di microrganismi indicate assumono la distribuzione schematizzata con la **tabella 8**.

**TABELLA 8.** Distribuzione nel corso del periodo di maturazione della microflora utile per la produzione del formaggio grana padano.

Fase della maturazione	Microrganismi	
	Dominanti	Associati
I fase sino a 72 ore	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , subsp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
II fase sino a 3-4 mesi	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> , subsp. <i>rhamnosus</i> , subsp. <i>pseudopantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>
III fase sino a 14-16 mesi	<i>Pediococcus acidilactici</i>	

L'insieme della microflora della **tabella 8** è responsabile dei processi biochimici che sono alla base della qualità del formaggio grana e che riguardano principalmente:

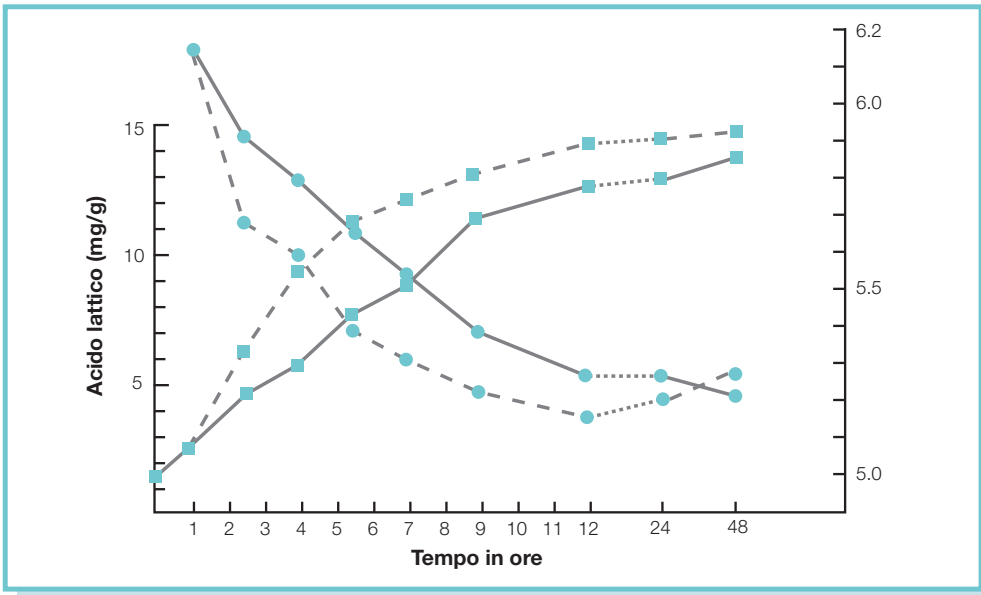
- la glicolisi per acidificare e formare biomassa microbica;
- la proteolisi delle caseine, dalla liberazione di peptidi sino ad aminoacidi;
- il catabolismo degli aminoacidi con la formazione di composti dell'aroma.

Scendere ora in particolari sui tre punti indicati ci porterebbe lontano e certamente fuori dalle finalità della presente pubblicazione, per cui ci limitiamo a condensare i tre aspetti indicati con brevi considerazioni di base.

## Glicolisi

La glicolisi porta all'acidificazione della pasta fresca del formaggio grana, abbassando il valore di pH sino a 5,10 in seguito alla trasformazione del lattosio in acido lattico, secondo l'andamento della **figura 1**.

**FIGURA 1.** Andamento della curva del pH (●) e della concentrazione dell'acido lattico (■) nella parte interna (—) ed esterna (-----) di Parmigiano Reggiano. (Mora e coll. - 18)



Quest'attività biochimica è indispensabile per realizzare la condizione idonea all'avvio del processo di maturazione e al configurarsi delle caratteristiche organolettiche del prodotto.

Con il realizzarsi del processo di glicolisi, si arriva alla formazione di una massa microbica composta dalle cellule di bacilli lattici termofili (*Lactobacillus helveticus*) che, per il corredo enzimatico che posseggono, risulta di fondamentale importanza per i successivi processi idrolitici della maturazione.

## Proteolisi delle caseine

Il processo biochimico della proteolisi delle caseine, con la liberazione di peptidi ed aminoacidi che si realizza durante la maturazione, è fortemente dipendente dalla gran varietà di enzimi proteasici e peptidasici forniti dai batteri lattici.

L'intensità del processo di maturazione, si misura con la determinazione del valore percentuale di azoto solubile a pH 4,4 sull'azoto totale; per avere un'idea del variare nel tempo del coefficiente di maturazione, sono sufficienti i valori medi riportati in **tabella 9**.

**TABELLA 9.** Variazione del coefficiente di maturazione durante la stagionatura di Parmigiano Reggiano

	Mesi di stagionatura				
	1	4	8	12	20
% azoto solubile a pH 4,4 su azoto totale	5,10	12,50	25,80	27,50	32,10

Nel corso del primo anno di maturazione, la  $\beta$ -caseina e la  $\alpha_s$ -caseina vengono idrolizzate con liberazione di polipeptidi.

Nei primi mesi è molto intensa la liberazione di polipeptidi. Con l'avanzare del periodo di maturazione, risulta intensa anche l'idrolisi di peptidi, con conseguente liberazione di aminoacidi; a 20 mesi di stagionatura di Parmigiano Reggiano, la quantità totale di aminoacidi liberi valutata, rappresenta mediamente il 23% delle proteine totali e il 7,5% con riferimento al formaggio tal quale.

### Catabolismo degli aminoacidi

Il catabolismo degli aminoacidi è dovuto a processi di decarbossilazione, di transaminazione, di deaminazione e di degradazione; dal suo manifestarsi derivano molti composti dell'aroma. I microrganismi che hanno un ruolo attivo nel formaggio grana, hanno la capacità d'intervenire sugli aminoacidi. Dal catabolismo di aminoacidi aromatici, ad esempio, è possibile schematizzare le conversioni enzimatiche riportate in **figura 2**.

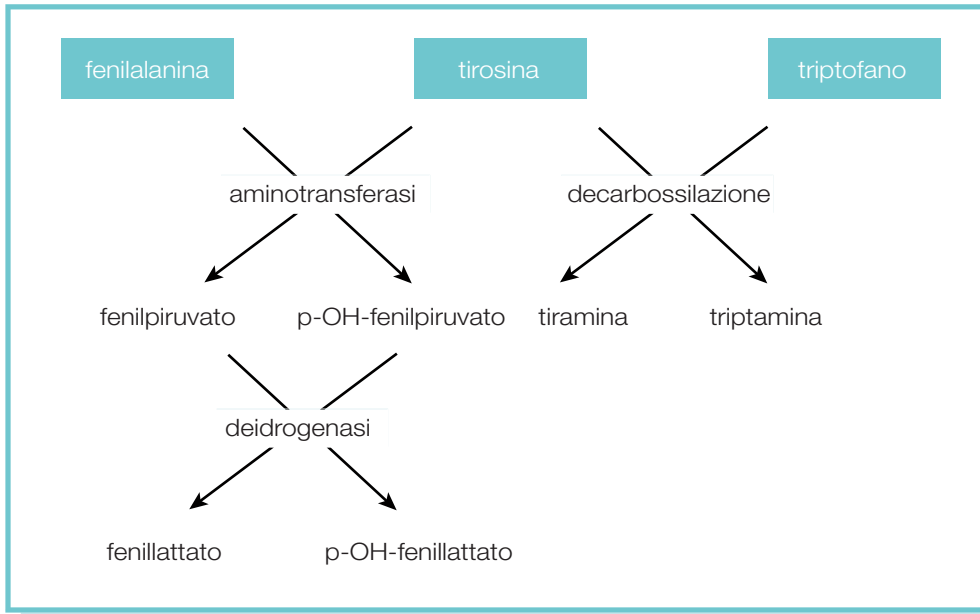
I composti aromatici derivati dal catabolismo degli aminoacidi sono molti e si presentano con differente potere aromatico; la loro mescolanza, in specifici rapporti quantitativi, configura quell'aroma del formaggio grana di fruttato con chiara indicazione di nocciola, lipolizzato-floreale delicatamente pungente, armonico e persistente. Così gli esteri sono responsabili del caratteristico aroma di fruttato, i composti pirazinici si pongono alla base dell'aroma di nocciola-pane, gli acidi grassi a corta catena assieme ad aldeidi e composti solforati partecipano alla formazione dell'aroma di lipolizzato-floreale.

Con riferimento all'accumulo di composti volatili che caratterizzano il processo di maturazione del formaggio Grana Padano, si richiama l'attenzione sui dati riportati in **tabella 10**.

**TABELLA 10.** Concentrazione di composti volatili in Grana Padano.

Composto	μg/kg	
	Latte	Grana Padano
Esteri	399	1671
Chetoni	36	1541
Alcoli	12	1333
Aldeidi	96	21

**FIGURA 2.** Schematizzazione di conversioni enzimatiche a carico di alcuni aminoacidi.



### Distribuzione di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* secondo la loro funzione tecnologica o probiotica

I microrganismi a DNA alimentare utilizzati nella preparazione di alimenti per l'uomo sono, come in parte già visto, numerosi, ma con la **tabella 11** si vuole raggruppare, con l'indicazione tassonomica e secondo l'utilizzazione tecnologica e probiotica di specie, quelli appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

**TABELLA 11.** Distribuzione di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* secondo la loro funzione tecnologica o probiotica

Microrganismo	utilizzo			probiotica
	tecnologica			
	F/LF*	C**	P***	
<b><i>Lactobacillus</i></b>				
<i>acidophilus</i>				+
<i>alimentarius</i>		+		
<i>amylovorus</i>	+		+	
<i>bavaricus</i>		+		
<i>brevis</i>			+	
<i>casei</i>	+			+
<i>crispatus</i>				+
<i>curvatus</i>	+			
subsp. <i>delbrueckii</i>	+			
subsp. <i>bulgaricus</i>	+			
subsp. <i>lactis</i>	+			
<i>fermentum</i>	+			
<i>gasseri</i>				+
<i>helveticus</i>	+			
<i>heterohiochi</i>			+	
<i>jenseni</i>			+	
<i>johnsonii</i>				+
<i>kefirgranum</i>	+			
<i>kefiri</i>	+			
<i>paracasei</i>				+
<i>pentosus</i>		+		
<i>reuteri</i>				+
<i>rhamnosus</i>				+
<i>sakei</i>		+		
<i>salivarius</i>	+			+
<i>sanfrancisco</i>			+	
<i>zeae</i> (subsp. <i>casei</i> )	+			
<b><i>Bifidobacterium</i></b>				
<i>adolescentis</i>				+
<i>animalis</i>				+
<i>bifidum</i>				+
<i>breve</i>				+
<i>infantis</i>				+
<i>lactis</i> ( <i>Bifidobacterium animalis</i> )				+
<i>longum</i>				+
<i>pseudolongum</i>				+

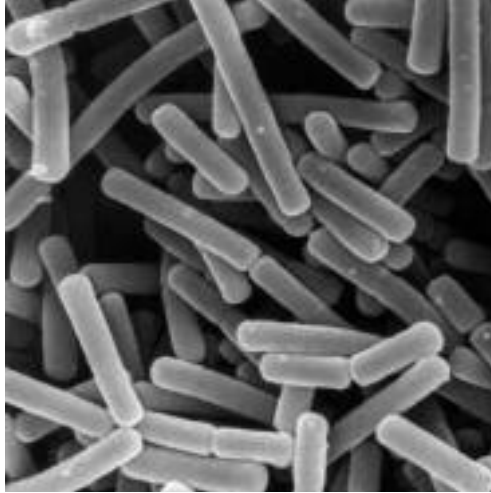
\*F/LF = formaggi e lattici fermentati;

\*\*C = carne;

\*\*\*P = pane.

Le figure 3, 4, 5, 6, 7 e 8 di microrganismi ripresi con le tecniche di microscopia elettronica a scansione, vengono riportate con un richiamo al loro impiego e a dimostrazione della loro morfologia.

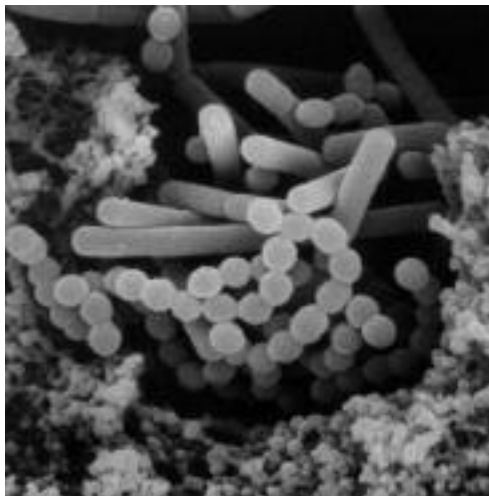
**FIGURA 3.** Morfologia al microscopio elettronico a scansione di *Lactobacillus helveticus* dominante nella fermentazione lattica del formaggio Grana.



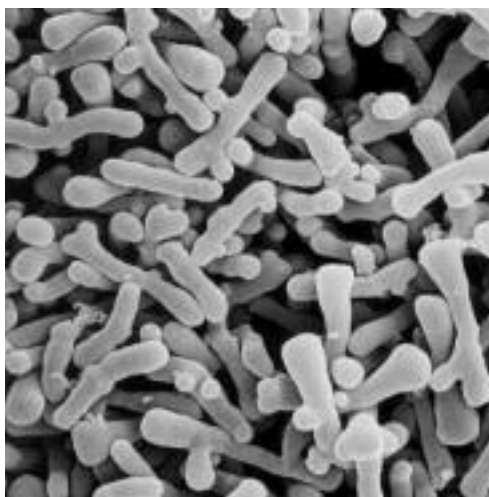
**FIGURA 4.** Morfologia di *Lactobacillus casei* utilizzato nelle produzioni casearie e nella preparazione di alimenti probiotici con base latte-fermentati



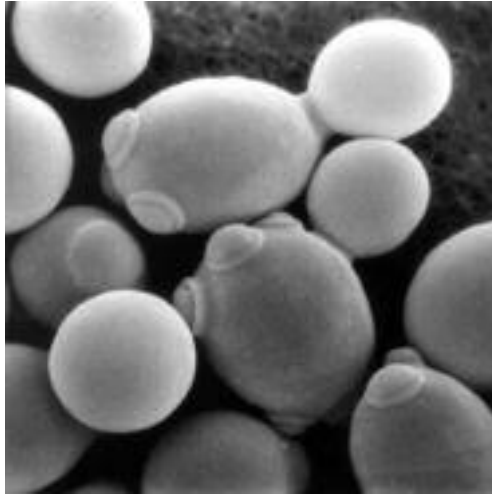
**FIGURA 5.** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* utilizzati nella produzione di yogurt e altri latte-fermentati sviluppati in associazione con formazione di microcolonie localizzate in una cavità del prodotto dopo coagulazione acida.



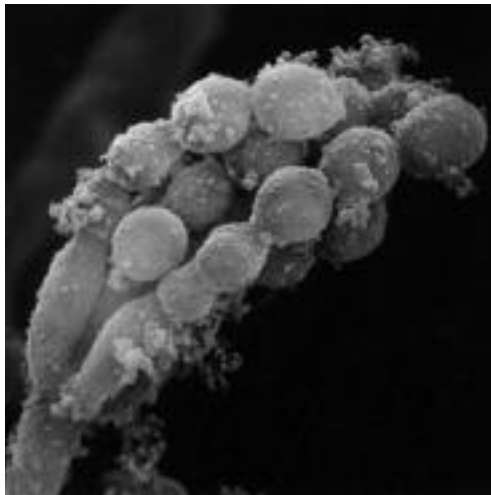
**FIGURA 6.** Morfologia di *Bifidobacterium longum* tipico rappresentante dei bifidobatteri utilizzati nella preparazione di alimenti probiotici con base latte-fermentati.



**FIGURA 7.** Lieviti in attiva fase di crescita presenti in formaggi di produzione artigianale.



**FIGURA 8.** Corpi fruttiferi di muffe del genere *Penicillium* sviluppati nella pasta di formaggio gorgonzola ove esercitano proteolisi e lipolisi.

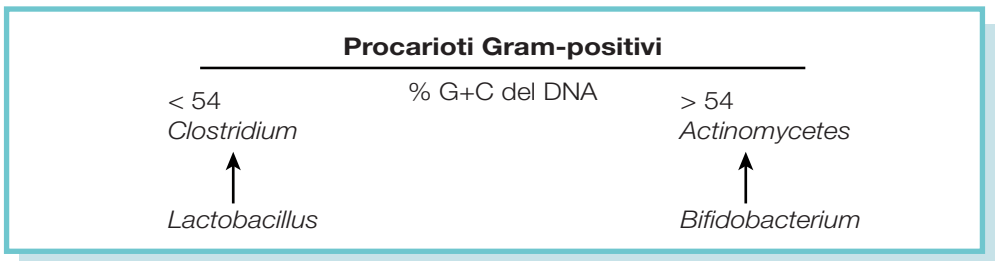


## Caratteri generali per *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

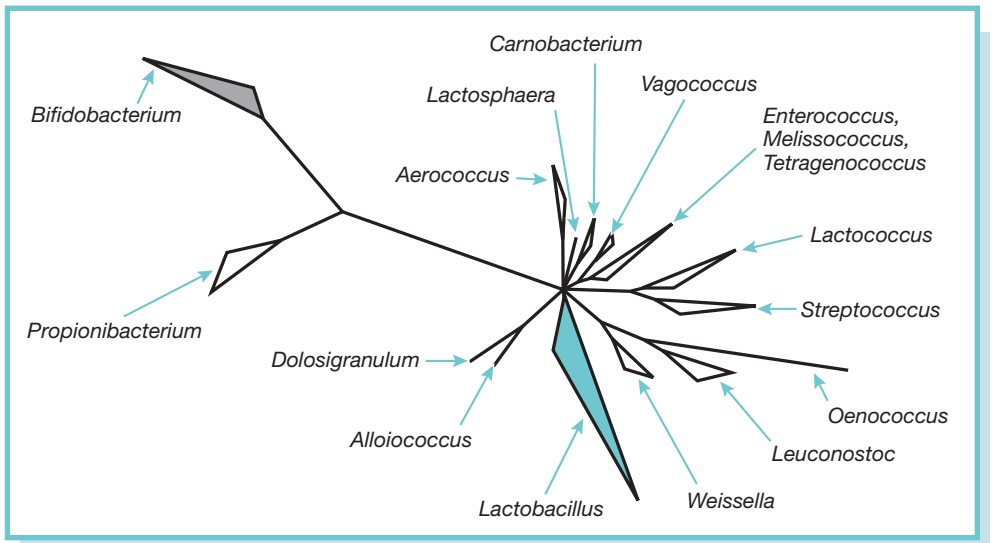
### Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* appartiene al gruppo dei batteri lattici, che sono dei procarioti Gram-positivi e, sulla base della composizione percentuale in guanina e citosina del DNA, si colloca nel ramo *Clostridium*, in quanto il valore guanina più citosina (G+C) è inferiore al 54%. Il genere *Bifidobacterium*, poiché ha un valore G+C del DNA superiore al 54% entra nel ramo *Actinomyces*, per cui i due gruppi sono nettamente distinguibili fra di loro (figura 9).

**FIGURA 9.** Separazione sulla base del % G+C del DNA di *Lactobacillus* da *Bifidobacterium*.



**FIGURA 10.** Relazione filogenetica tra gruppi di batteri lattici a bassa percentuale di G+C del DNA ed altri gruppi di batteri (*Bifidobacterium*, *Propionibacterium*) ad elevata percentuale di G+C del DNA. (Schleifer e Ludwig - 8)



L'applicazione delle tecniche molecolari recentemente messe a punto per l'esame del 16s RNA, che consentono il confronto delle sequenze nucleotidiche, ha permesso di stabilire, come evidenziato in **figura 10**, la relazione filogenetica tra *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Il genere *Lactobacillus* riunisce molte specie, individuate con metodi tradizionali fisiologici-fenotipici e di genetica molecolare, e si caratterizza per le seguenti proprietà generali: sono bacilli Gram-positivi, catalasi negativa, immobili, non formano spore, risultano negativi al test citocromo-ossidasi e a quello della riduzione dei nitrati, inoltre non idrolizzano la gelatina e non producono indolo. Tutte le specie tassonomicamente differenziate presentano un metabolismo strettamente saccarolitico con produzione principale finale di acido lattico e sono, nei riguardi dell'ossigeno, microaerofili.

Manifestano complesse esigenze nutrizionali e richiedono substrati con carboidrati solubili, aminoacidi e corti peptidi liberi, nonché acidi grassi o esteri di acidi grassi, sali, derivati di acidi nucleici e vitamine in opportune quantità.

Sono molto diffusi in natura, in quanto trovano modo di adattarsi a differenti condizioni ambientali. Risultano acidurici o acidofili.

I membri del genere *Lactobacillus* vengono divisi, sulla base del tipo di fermentazione, in tre gruppi:

- lattobacilli omofermentanti obbligati, che fermentano gli esosi via glicolisi con produzione principale di acido lattico;
- lattobacilli eterofermentanti obbligati, che fermentano gli esosi via 6-fosfogluconato/fosfochetolasi (6 PG/PK), con produzione di etanolo (acido acetico), anidride carbonica e acido lattico;
- lattobacilli eterofermentanti facoltativi, che fermentano gli esosi via glicolisi ed i pentosi con produzione di etanolo (acido acetico), anidride carbonica ed acido lattico via 6PG/PK.

Le recenti ricerche di filogenesi batterica, sviluppate sulla base del fatto che il grado di similarità di sequenze rRNA esistente tra due organismi è indice della loro distanza evolutiva, hanno però dimostrato che la suddivisione nei tre gruppi basata sul tipo di fermentazione non è in accordo con la loro relazione filogenetica evidenziata dall'analisi 16S rDNA. L'insieme delle specie del genere *Lactobacillus* non formano una coerente unità filogenetica e la tassonomia del genere *Lactobacillus* risulta a tutt'oggi ancora insoddisfacente.

## Genere *Bifidobacterium*

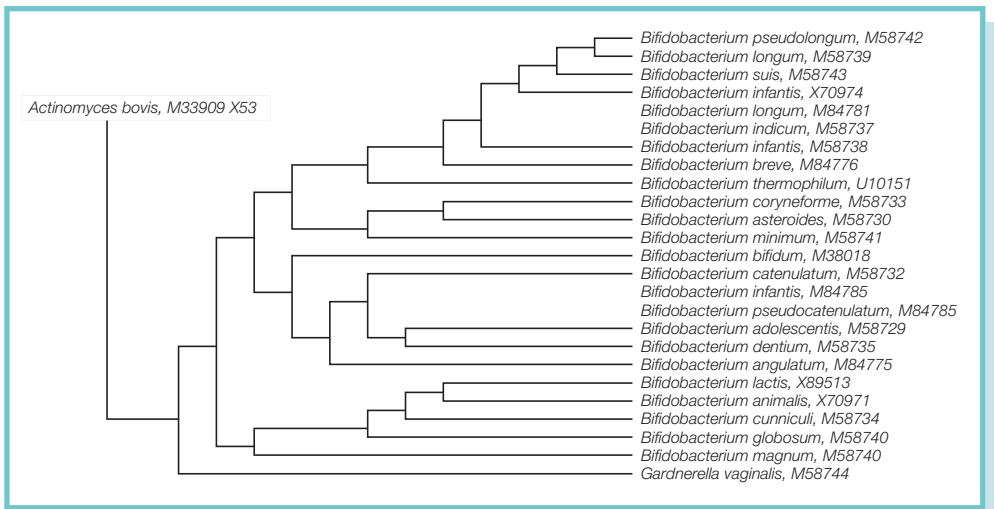
Il genere *Bifidobacterium* raggruppa ventotto specie e presenta i seguenti caratteri generali: sono bacilli Gram-positivi, non mobili, non sporigeni, a catalasi negativa, non acidurici, pleomorfi con una morfologia cellulare molto variabile da bacillo regolare a forme variamente ramificate, come riportato in **figura 6**, fermentano gli esosi via fruttosio-6-fosfato fosfochetolasi (F6PPK), con liberazione di acido lattico ed acido acetico nel rapporto molare di 3 a 2.

La maggior parte delle specie di bifidobatteri sono in grado di utilizzare sali di ammonio quale unica fonte di azoto e, in substrato privo di azoto organico, accumulano considerevoli quantità di vari aminoacidi, in particolare alanina, valina e acido aspartico. Numerosi ceppi di origine enterica sono in grado di sintetizzare vitamine quali tiamina, acido folico, acido nicotinico, piridossina e vitamina B12. I bifidobatteri sono molto influenzati nel loro sviluppo dai cosiddetti fattori bifidogeni, che comprendono oligosaccaridi ed idrolizzati di proteine.

Le specie del genere *Bifidobacterium* sono strettamente anaerobiche e la loro diffusione in natura è alquanto specifica; l'habitat più frequente è rappresentato dal contenuto intestinale di neonati e adulti, dal muco vaginale e dalle acque con materiali fecali; alcune specie di *Bifidobacterium* trovano abituale habitat anche nel rumine.

Le specie appartenenti al genere *Bifidobacterium*, a differenza di quelle del genere *Lactobacillus*, formano una coerente unità filogenetica e generalmente mostrano più del 93% di similarità di sequenze 16S rRNA (**figura 11**).

**FIGURA 11.** Albero filogenetico basato sulla sequenza completa di 16S rDNA di bifidobatteri. (Satokari - 9)



## Riferimenti bibliografici

1. Bottazzi V. (1993)  
Microbiologia e biotecnologia lattiero-casearia.  
Edagricole (Bologna)
2. Bottazzi V. (1997)  
Batteri lattici per l'industria lattiero-casearia.  
Ediz. Marino, Santa Maria a Vico (CE)
3. Bottazzi V. (2003)  
Yogurt funzionale: alimento per la promozione  
della salute.  
Il Latte, 28, 44-55.
4. Bottazzi V. (2003)  
Latte, enzimi, microrganismi: formaggi grana.  
Ediz. Mofin-Alce (Novara)
5. Bottazzi V. (2002)  
..... siamo piccoli e molto bravi in biochimica:  
produciamo lo yogurt.  
Ind. Latte, 38, 5-64.
6. Bottazzi V., Capurso L. (2002)  
Probiotici: microrganismi ed alimenti "a favore  
della vita".  
Alimentazione e Benessere, 3, 2-6. (Ediz.  
Parmalat).
7. Mogensen G., Salminen S., O'Brien O.,  
Ouwehand A., Holzapfel W., Shortt C., Fonden  
R., Miller G.D., Donohue D., Playne M.,  
Crittenden R., Bianchi Salvadori B., Zink R.  
(2002)  
Inventory of microorganisms with a  
documentated history of use in food.  
IDF Bulletin 377, 9-18.
8. Schleifer K.H., Ludwig W. (1995)  
Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and  
related genera.  
System. Appl. Microbiol., 18, 461-467.
9. Satokari R. (2001)  
Molecular identification and characterization of  
*bifidobacteria* and *lactobacilli* in the human  
gastrointestinal tract.  
VTT Publication 454, Technical Research  
Centre of Finland, Espo 2001.
10. Biavati B., Bottazzi V., Morelli L., Schiavi C.  
(2001)  
Probiotici and *bifidobacteria*.  
Ediz. Mofin Alce, Novara.
11. Sharpe E.M. (1981)  
The Genus *Lactobacillus*.  
The Prokariotes (Chapter 131)  
Ediz. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,  
New York.
12. Scardovi (1981)  
The Genus *Bifidobacterium* (Chapter 149)  
Ediz. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,  
New York.
13. Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin  
I., Decaris B. (1996)  
16r RNA and 16S to 23S internal transcribed  
spacer sequence analyses reveal inter and  
intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny.  
Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 102-111.
14. Miyake T.K., Watanabe K., Watanabe T.,  
Oyaizu H. (1998)  
Phylogenetic analysis of the genus  
*Bifidobacterium* and related genera based on  
16r RNA sequence.  
Microbiol. Immunol., 42, 661-667.
15. Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R.,  
Fukuda M., Oyaizu H. (1999)  
Distribution of bifidobacterial species in human  
intestinal microflora examined with 16S rRNA-  
gene-targeted species-specific primers.  
Appl. Environ. Microbiol., 65, 4506-4512.
16. Woese C.R. (1987)  
Bacterial evolution.  
Microbiol. Rev., 51, 221-271.
17. Tamime A.J., Deeth H.C. (1980)  
Yogurt: technology and biochemistry.  
J. Food Protect., 43, 939-977.
18. Mora R., Nanni M., Panari G. (1984)  
Variazioni chimiche, fisiche e microbiologiche  
del formaggio Parmigiano Reggiano durante le  
prime 48 ore.  
Sci. Tecn. Latt. Cas., 35, 30-32.



## LATTE FERMENTATI: ALIMENTI FUNZIONALI

Lo scopo dell'industria alimentare è quello di offrire in continuità nuovi prodotti in grado di soddisfare sempre meglio i bisogni dei consumatori.

I cambiamenti in atto nella società umana, particolarmente evidenti in quella occidentale progressista, sono sempre più marcati e riescono progressivamente a indurre e configurare nuove esigenze alimentari. Fra le cause che più premono per significativi cambiamenti, possono essere ricordate:

- **la crescita dei costi per la salute** - è stato calcolato che nel 1995 in Europa i costi per la salute assorbivano l'8% del reddito familiare e questo valore era già dell'1% in più rispetto al precedente decennio;
- **il continuo incremento del prolungamento dell'età media della vita** - sempre in Europa si calcola che la percentuale di persone oltre i 65 anni ricada tra il 14 e il 17% a seconda dei paesi, ma si prevede che nel corso dei prossimi trent'anni raggiungerà il 20-24%;
- **il crescente aumento delle aspettative che può offrire la vita** - il desiderio di successo per emergere, la competizione arrivistica, l'esaltazione della forma egoistica e la rincorsa della ricchezza, pongono l'uomo nell'affanno della continua ricerca del benessere;
- **il desiderio di migliorare la qualità della vita** - meno lavoro materiale, più agi, maggior tempo libero e più possibilità di conoscere il mondo, caratterizzano sempre più la società consumistica di oggi.

Tutto ciò porta di conseguenza allo sviluppo di nuove strategie nello stile di vita e determina cambiamenti significativi in fatto di alimenti, nutrizione e salute.

È sempre più marcata la spinta progressista che ci allontana dal concetto di "alimento adeguato" e ci avvicina sempre più a quello di "alimento ottimale", configurando così il rafforzamento della combinazione "alimento e salute" con l'alimento funzionale.

## Definizione di alimento funzionale

L'alimento funzionale non si può tradurre in un concetto univoco e, di conseguenza, non esiste un ben definito gruppo di prodotti alimentari cui fare esplicito riferimento. Non esiste una definizione universale per quanto riguarda l'alimento funzionale: un alimento può essere considerato come funzionale se, oltre agli effetti nutrizionali, esercita anche effetti benefici su una o più funzioni del corpo, migliorando lo stato di salute del consumatore e/o riducendo i rischi di malattie.

I meccanismi attraverso i quali un alimento funzionale può modellare definite funzioni per contribuire a mantenere lo stato di salute, devono essere scientificamente dimostrati e supportati da dati epidemiologici finalizzati alla messa in evidenza della validità statistica dell'effetto positivo.

Da un punto di vista pratico, si può affermare che un alimento funzionale è costituito da:

- un alimento naturale;
- un alimento cui sia stato aggiunto un componente;
- un alimento cui sia stato rimosso un componente;
- un alimento cui la biodisponibilità di uno o più componenti è stata modificata;
- un alimento con le varie combinazioni sopra riportate.

Caratteristica fondamentale degli alimenti funzionali è quella che essi sono e devono rimanere alimenti e non devono quindi mai assumere la qualifica di medicinali, in quanto non hanno effetti terapeutici. Di conseguenza il regolare consumo di un alimento funzionale deve far parte della normale dieta.

Un alimento funzionale può dimostrare effetti positivi per tutti i componenti di una popolazione, ma può risultare anche specifico per determinati gruppi di consumatori che presentano particolari esigenze.

Un gruppo di alimenti funzionali molto importante è rappresentato dagli alimenti fermentati funzionali e fra questi emergono i latte-fermentati come lo yogurt, il kefir, il latte-fermentato tibetano, il latte-fermentato biogenico e il latte-fermentato yakult.

## Latte-fermentati funzionali

I latte-fermentati formano, nel loro complesso, un gruppo di alimenti per l'uomo di antichissima origine.

La fermentazione del latte, tramite la trasformazione del lattosio per intervento di microflora spontanee, ha rappresentato uno dei primi processi fermentativi conosciuti dall'uomo.

I latte-fermentati prodotti oggi nel mondo sono diversi, in parte arrivati a noi attraverso tradizioni di differenti culture e in parte frutto del progresso delle conoscenze scientifiche e dello sviluppo tecnologico dei processi di produzione.

I più noti e maggiormente diffusi come prodotti artigianali o industriali sono riportati nella **tabella 12**.

**TABELLA 12. Principali tipi di latte-fermentati.**

Denominazione e tipologia del prodotto	Area di origine o di produzione	Tipo di latte utilizzato
<b>Artigianali</b>		
Yogurt	Armenia	bovino, ovino
Mayzum	Iran	bovino, ovino, bufalino
Kast	Egitto	bovino
Dahi	India	bovino, bufalino
Labneh	Libano	bovino
Gioddu	Sardegna	ovino
Kefir con granuli	Caucaso	bovino, caprino
Lagermilk	Germania	bovino, caprino
Kumys	Russia	bovino
Kellemilch	Germania	bovino
<b>Industriali</b>		
Yogurt	Tutto il mondo	bovino
Acidophilus milk	USA	bovino
Yakult	Giappone	bovino
Cultured milk	USA	bovino
Cultured cream	USA	bovino
Buttermilk	Germania	bovino
Kefir senza grani	Russia	bovino
Latte-fermentati probiotici	Tutto il mondo	bovino
Latte-fermentati pre-probiotici	Tutto il mondo	bovino

Lo yogurt può essere preso come il rappresentante più conosciuto, in quanto il più consumato nel mondo, e la **tabella 13** riporta la distribuzione dei consumi pro-capite per anno.

**TABELLA 13.** Consumo, con riferimento all'ultimo decennio, di latte-fermentati (yogurt compreso) in kg per abitante e per anno.

Paese	kg	Paese	kg
Cina	0,2	Nuova Zelanda	6,0
Venezuela	1,0	Argentina	6,9
Messico	1,6	Stati Uniti	7,2
Brasile	2,0	Cile	8,0
Tailandia	2,0	Tunisia	9,0
Zimbabwe	2,0	Turchia	13,0
Sud Africa	3,2	Corea	13,0
Ucraina	4,0	Croazia	13,0
Canada	4,9	Giappone	14,2
Russia	5,0	Unione Europea	14,6
Taiwan	5,0	Norvegia	16,6
Australia	5,7		

### Proprietà funzionali di base dello yogurt

L'interazione tra yogurt, nutrizione e salute trova una buona possibilità per potersi manifestare e le attività biochimiche che si realizzano, con lo sviluppo in latte dell'associazione *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, a carico dei componenti del latte (lattosio, proteine, acidi organici, aminoacidi), danno luogo, come già ricordato, a una serie di eventi di particolare importanza nutrizionale, funzionale e organolettica.

Le proprietà funzionali che lo yogurt presenta al momento del consumo, possono essere brevemente sottolineate con i punti che riguardano l'accumulo di acido-3-idrossi-3-metilglutarico, di  $\beta$ -galattosidasi, di peptidi bioattivi e di polisaccaridi.

### Accumulo di acido 3-idrossi-3-metilglutarico (effetto ipocolesterolemico)

I risultati di diverse ricerche hanno attirato l'attenzione sul fatto che il consumo di latte-fermentato (yogurt) da parte di persone ipercolesterolemiche ha un effetto positivo nell'abbassare il tenore di colesterolo del plasma.

Il meccanismo con il quale un latte-fermentato esercita un effetto ipocolesterolemico non è a tutt'oggi conosciuto nel dettaglio, ma si ritiene che alcuni componenti costitutivi del latte e alcuni prodotti del metabolismo batterico svolgano un ruolo importante. La combinazione di acido orotico, acido urico ed acido-3-idrossi-3-metilglutarico, con le proporzioni in ppm di 25, 15, 145 rispettivamente (i primi due quali composti costitutivi del latte e il terzo quale prodotto di fermentazione), può esercitare un'azione sinergica ipocolesterolemica.

### Accumulo di $\beta$ -galattosidasi (lattasi) per contribuire alla digestione del lattosio.

Un'alta percentuale della popolazione adulta vivente sulla terra ha un'insufficiente capacità a digerire il lattosio e quindi a utilizzare il latte come alimento, mentre lo yogurt, che pur contiene ancora un'alta percentuale di lattosio, viene digerito dalle persone lattosio-intolleranti.

A rendere possibile questo fatto, intervengono gli artefici microbici dello yogurt, vale a dire *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* che, nell'accumulare acido lattico, producono  $\beta$ -galattosidasi (lattasi), enzima specifico dell'idrolisi dello zucchero del latte da cui derivano glucosio e galattosio.

L'enzima lattasi è contenuto all'interno della cellula batterica dei fermenti lattici dello yogurt, che funziona da contenitore sino al momento della lisi cellulare che in parte già avviene nello yogurt durante la conservazione alla temperatura di +4°C e si completa nell'intestino.

### Accumulo di peptidi bioattivi ad azione ipotensiva

La liberazione di peptidi bioattivi rappresenta un aspetto importante dell'attività proteolitica della microflora lattica dello yogurt; fra i vari peptidi liberati vi sono quelli ad attività biogenica, di cui considerazioni specifiche verranno fatte a proposito del latte-fermentato biogenico.

Si sottolinea tuttavia sin d'ora che i peptidi ad azione ipotensiva sono quelli che al momento attuale vengono maggiormente considerati, in quanto la loro presenza allo stato libero in un latte fermentato rende possibile la realizzazione di una nuova serie di alimenti funzionali più attivi.

### Accumulo di polisaccaridi ad azione anticancerogena

La letteratura internazionale segnala che la produzione di polisaccaridi da parte di batteri lattici è stata messa in relazione con effetti anticancerogeni a livello del colon. Quando nella produzione dello yogurt si impiegano ceppi filanti, si può arrivare all'accumulo di 200-300 mg di polisaccaridi per chilogrammo di yogurt.

Circa la loro funzione, a titolo di esempio si può citare che gli abitanti di Kupio (Finlandia) corrono pochi rischi nei riguardi dell'insorgenza di forme tumorali con localizzazione al colon, perché sono dei forti consumatori di latte fermentato filante, ricco pertanto di polisaccaridi.

Questa relazione supporta un'area di studio di grande interesse e pone, anche per questo aspetto, lo yogurt in primo piano tra gli alimenti con proprietà funzionali.

L'attività biochimica che si realizza con la fermentazione lattica durante la preparazione dello yogurt somma anche altri effetti favorevoli, con riferimento ai quali però attualmente non esiste ancora un sufficiente numero di risultati sperimentali per poter dimostrare che sono certi. Si prevede che il quadro potrà arricchirsi con altri elementi per indicare, in forma ancora più netta, l'importante posizione che lo yogurt ha come alimento per la nutrizione e il mantenimento della salute dell'uomo.

### Proprietà funzionali di base del latte fermentato kefir

Il kefir è un latte-fermentato acido-alcoolico, effervescente, frutto di una complessa fermentazione operata da microrganismi diversi a partire da latte bovino, ovino o caprino.

Il kefir, originario del Caucaso del Sud, appartiene ai latte-fermentati tradizionali la cui diffusione è stata spesso affidata alla sola tradizione domestica.

Il nome kefir è di origine turca e il prodotto è stato introdotto in Europa nel 1860 con l'utilizzazione dei granuli di kefir quali "starters" per la fermentazione. I granuli sono costituiti da proteine e polisaccaridi che immobilizzano differenti specie di microrganismi in sinergismo tra di loro, ma ancor oggi non è conosciuto come si forma il granulo. Infatti non è mai stato possibile ricostruire in laboratorio il granulo di kefir a partire dalla microflora che lo compone.

Si è ancora legati alla leggenda che viene tramandata dai pastori che vivono sulle montagne del Medio Oriente e che indica che i granuli sono stati dati al popolo ortodosso da Maometto (granuli di Maometto o miglio del Profeta), il quale spiegò come utilizzarli, ma non come prepararli la prima volta, perché ciò avrebbe determinato la perdita del loro "magico potere".

Dal punto di vista microbiologico, il granulo di kefir si presenta complesso: si è in presenza di un'associazione tra più gruppi batterici e precisamente lattococchi, lattobacilli mesofili, *Leuconostoc*, enterococchi, batteri acetici e lieviti.

La composizione microbiologica del granulo si ripercuote a sua volta sulla composizione microbiologica della bevanda acido-alcoolica indicata come kefir.

Dalla letteratura scientifica esistente, basata sui risultati di diverse ricerche, può essere ricostruito quadro microbiologico d'insieme di genere e di specie riportato in **tabella 14**.

**TABELLA 14.** Quadro microbiologico del kefir.

<p><b>Batteri lattici</b></p> <p><i>Lactococcus lactis</i></p> <p><i>Lactobacillus brevis</i></p> <p><i>Lactobacillus acidophilus</i></p> <p><i>Lactobacillus caucasicum</i></p> <p><i>Lactobacillus casei</i></p> <p><i>Leuconostoc mesenteroides</i></p> <p><i>Lecuonostoc kefir</i></p>	<p><b>Lieviti</b></p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p><i>Saccharomyces delbrueckii</i></p> <p><i>Saccharomyces lactis</i></p> <p><i>Saccharomyces carlsbergensis</i></p> <p><i>Saccharomyces kefir</i></p> <p><i>Kluyveromyces lactis</i></p> <p><i>Candida tenuis</i></p> <p><i>Candida pseudotropicalis</i></p>
<p><b>Acetobatteri</b></p> <p><i>Acetobacter aceti</i></p> <p><i>Acetobacter rancens</i></p>	<p><b>Atri gruppi</b></p> <p><i>Enterococcus durans</i></p> <p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Geotricum candidum</i></p>

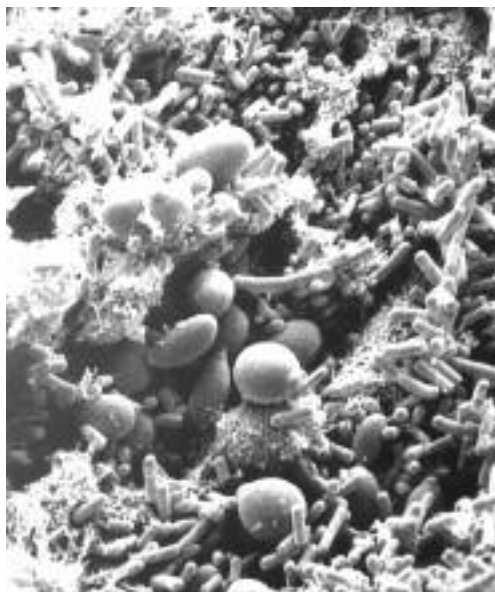
Variazioni della composizione della microflora sono in funzione dell'origine del granulo e in generale le variazioni più marcate riguardano l'associazione di lieviti.

Durante la fermentazione del latte la sequenza che caratterizza lo sviluppo batterico è la seguente:

lattococchi → lattobacilli → *Leuconostoc* → lieviti → acetobatteri

L'interno di un granulo di kefir visto al microscopio elettronico a scansione, si presenta come in **figura 12**.

**FIGURA 12.** Associazione schizomiceti-eumiceti all'interno di un granulo di kefir osservato al microscopio elettronico a scansione.



La tradizione e lo sviluppo delle ricerche scientifiche attribuiscono al kefir proprietà nutrizionali e funzionali generalmente riconosciute di notevole importanza. Così, ad esempio, anche il kefir può essere consumato senza problemi dalle persone intolleranti il lattosio, perché apporta  $\beta$ -galattosidasi che trae origine dal realizzarsi del ciclo glicolitico.

L'acido lattico che si accumula è quasi esclusivamente sotto la forma isomerica L(+) e ciò a differenza dello yogurt che è L(+) D(-) ove si accumulano in parti circa uguali. È da sottolineare che l'isomero D(-), assunto in certe quantità, può provocare disturbi al consumatore. Una significativa differenza del kefir rispetto allo yogurt è che non contiene galattosio.

In genere l'attività proteolitica in kefir risulta più debole rispetto ad altri latte-fermentati; l'azoto non proteico del kefir passa con la fermentazione da 29 mg/100 g del latte a 46 mg/100 g del kefir dei primi giorni e arriva a 52 mg/100 g dopo 11 giorni di conservazione.

È importante sottolineare che tra gli aminoacidi di liberazione preferenziale durante la proteolisi, si pongono treonina, prolina e lisina e, inoltre, è significativa la liberazione di D-aminoacidi, come evidente in **tabella 15**.

Il contenuto in vitamine subisce variazioni che sono legate al processo fermentativo e al tipo di latte utilizzato. In generale diminuiscono le vitamine B6, B12 e biotina e aumenta l'acido folico, anche sino al valore del 115%.

**TABELLA 15.** Valori in percento di aminoacidi D-isomeri rispetto a L-isomeri in latte pastorizzato e in kefir.

Aminoacido	Latte pastorizzato	Kefir
D-alanina	1,8	37,4
D-acido glutammico	5,1	4,9
D-acido aspartico	7,3	17,6
D-valina	-	5,6
D-leucina	-	22,6
D-lisina	-	4,7
D-serina	-	3,4
Aminoacidi liberi mg/100 g	3,29-10,3	26,2
D-aminoacidi liberi mg/100 g	0,09-0,24	1,48

Per tradizione secolare, il kefir è considerato un latte fermentato con buone proprietà probiotiche salutistiche. Si attribuiscono ad esso effetti favorevoli nel prevenire, come anche nel risolvere, gastriti, diarrea, malattie intestinali nei bambini e problemi di digestione nelle persone anziane, sino a determinare effetti favorevoli sull'apparato circolatorio e sul sistema nervoso.

La letteratura riporta che, sulla base di studi su piccoli animali, il polisaccaride del granulo di kefir ha una forte capacità di inibire la proliferazione delle cellule tumorali della linea ascitica d'Erlich.

Un vasto campo di interessi è stato recentemente aperto con la dimostrazione, in pulcini, dell'effetto anti-*Salmonella*, quale conseguenza della somministrazione di kefir prodotto con granuli. L'effetto positivo si riscontra solamente quando si opera con microflora viva. L'effetto è nettamente superiore a quello che si ottiene con la somministrazione di yogurt.

Si può ancora aggiungere che la presenza di anidride carbonica e sali di calcio facilita la diuresi e che l'acidità e la caratteristica microflora stimolano la salivazione, la secrezione di enzimi nello stomaco e migliora la peristalsi intestinale.

Nei paesi orientali, in particolare in Russia, il kefir è tenuto in grande considerazione negli ospedali e viene incluso nelle diete dei pazienti affetti da dismetabolismi intestinali e generali, ipertonicità, aterosclerosi e allergie. Infine, al pari del kumys (latte fermentato acido-alcoolico ottenuto con latte di cavalla), il kefir viene considerato un buon rimedio supplementare nel trattamento della tubercolosi.

## Proprietà funzionali di base del latte-fermentato tibetano (yogurt tibetano), del latte-fermentato con *Lactobacillus acidophilus* o con *Lactococcus lactis*

Il latte fermentato tibetano è, per tradizione, consumato presso le popolazioni locali e ha trovato un preciso collocamento nella medicina pastorale tibetana, in quanto in grado di promuovere la salute gastrointestinale e ciò con particolare riferimento alle forme di ulcera gastrica presieduta da microrganismi infettivi.

Le infezioni sostenute da *Helicobacter pylori* rappresentano un'importante causa di gastriti croniche e di ulcera; inoltre è stato recentemente evidenziato che il 60-80% di tumori gastrici sono attribuibili a infezioni da *Helicobacter pylori*.

La prevenzione e l'eradicazione di *Helicobacter pylori* risulta alquanto critica, sia perché non sempre positivi sono gli effetti dei trattamenti con antibiotici e chemioterapici, sia anche perché questi trattamenti talvolta provocano effetti indesiderati.

Queste limitazioni hanno spostato l'attenzione verso soluzioni alternative e i latte-fermentati del tipo "yogurt tibetano" stanno assumendo una particolare importanza.

Studi recentemente sviluppati negli Stati Uniti d'America, hanno messo in evidenza che il latte-fermentato tibetano è prodotto dallo sviluppo in associazione di *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus kefir* (indicato anche *Lactobacillus ferentoshensis*) con *Kluyveromyces lactis* e *Issatchenkia orientalis* (simile a *Candida cruzi*).

Il latte fermentato ottenuto dallo sviluppo dell'associazione sopra indicata ha una forte azione battericida verso *Helicobacter pylori*. I lieviti e i lattobacilli formano coltura simbiotica in grado di secernere fattori solubili antibatterici quali, ad esempio, le batteriocine.

La letteratura scientifica riferisce che anche *Lactobacillus acidophilus* (ceppo LB) ha una forte azione battericida verso *Helicobacter pylori*, dimostrabile "in vivo" nell'uomo.

Il supernatante (siero) di una coltura in latte di *Lactobacillus acidophilus* ceppo A1 (*Lactobacillus johnsonii*), somministrato a pazienti infetti da *Helicobacter pylori*, ha determinato effettivamente la soppressione dello sviluppo del microrganismo responsabile di ulcera gastrica.

Dopo due settimane di somministrazione del supernatante, l'ureasi gastrica attribuita a *Helicobacter pylori* diminuisce fortemente, a dimostrazione della sua attività antibatterica.

Il meccanismo biologico che porta all'attività anti-*Helicobacter* è presieduta da batteriocine; recentemente un gruppo di ricercatori della Corea del Sud ha nuovamente indagato su questo aspetto e, tra le varie batteriocine prodotte da

batteri lattici, ha riscontrato che un'attività molto intensa viene espressa da lacticin A164 e da lacticin BH5, prodotte da ceppi di *Lactococcus lactis*.

## Proprietà funzionali di base del latte-fermentato biogenico

Le attività proteolitiche che si concretizzano durante la preparazione di un latte-fermentato o di un formaggio, sono di particolare importanza per la caratterizzazione dei prodotti finali.

L'idrolisi delle caseine porta, in primo luogo, alla liberazione di peptidi e questo processo determina la qualità fisica, l'aroma e il sapore, nonché il maggior valore nutrizionale e, come oggi è stato ben chiarito, anche salutistico, perché è stato accertato che numerosi peptidi risultano biologicamente attivi.

Da un punto di vista generale, i benefici alla salute legati al consumo dei latte-fermentati, sono diversi e si possono ricondurre a varie attività, come ad esempio:

- inibizione dei processi infettivi;
- attività antitumorale;
- regolazione delle funzioni immunologiche;
- riduzione del colesterolo del siero.

A questi benefici va aggiunta anche la riduzione dell'ipertensione.

La presenza di peptidi con attività antiipertensiva è stata descritta, nel dettaglio, a partire dal 1985 in vari alimenti fermentati, compresi quelli a base di latte.

I tripeptidi isoleucyl-prolyl-proline (IPP oppure Ile-Pro-Pro) e valyl-prolyl-proline (VPP oppure Val-Pro-Pro) hanno un chiaro effetto antiipertensivo, cioè abbassano la pressione arteriosa attraverso l'inibizione dell'attività ACE, cioè di "angiotensin-I-converting enzyme".

ACE converte "angiotensin I" in "angiotensin II", che è una potente molecola vasocostrittore; gli ACE inibitori esogeni aventi un effetto ipotensivo sono stati segnalati per la prima volta nel 1997.

Le proteine del latte sono precursori importanti per peptidi ACE inibitori: se provengono dalle caseine ( $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) sono conosciuti come caseochinine, mentre se derivano da proteine del siero ( $\alpha$ -lattoalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina) vengono indicate come lattochinine.

In senso generale, i componenti di alimenti derivati da attività microbiche in grado di esercitare effetti benefici sulla salute del consumatore senza che vi sia il coinvolgimento diretto della microflora intestinale, vengono definiti "biogenici".

I peptidi bioattivi presenti nei latte-fermentati come componenti biogenici ad azione ipotensiva derivati per idrolisi enzimatica da caseine e da proteine solubili sono diversi; ne sono stati descritti otto derivati da  $\alpha_{s1}$ -caseina, altri otto da  $\beta$ -caseina, due da  $\kappa$ -caseina, due da  $\alpha$ -lattoalbumina ed ancora quattro da  $\beta$ -lattoglobulina, con le dimensioni e la localizzazione dei frammenti peptidici nelle molecole proteiche riportate in **tabella 16**.

**TABELLA 16.** Peptidi ad azione ipotensiva derivati per idrolisi enzimatica di caseine e di proteine del siero

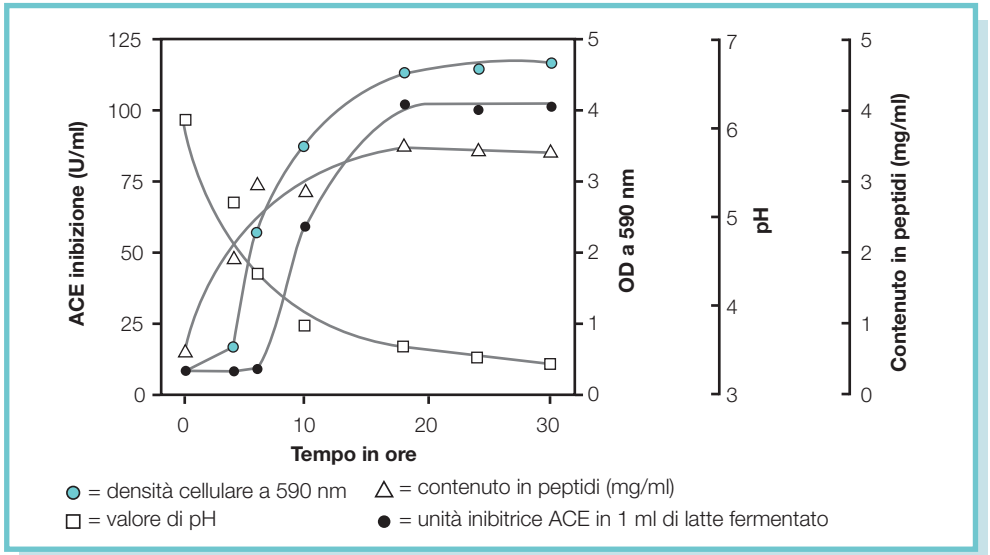
Proteine	Frammenti proteici	
$\alpha_{s1}$ - caseina	(23-34) (23-37) (28-34)	(104-109) (142-147) (143-148) (157-164) (194-199)
$\beta$ -caseina	(57-64) (74-76)* (84-86)** (108-113)	(169-175) (177-183) (181-183) (193-198)
$\kappa$ -caseina	(58-59) (108-110)	
$\alpha$ -lattoalbumina	(50-53) (105-110)	
$\beta$ -lattoglobulina	(9-14) (15-20)	(102-105) (142-148)

\*= Ile-Pro-Pro

\*\*= Val-Pro-Pro

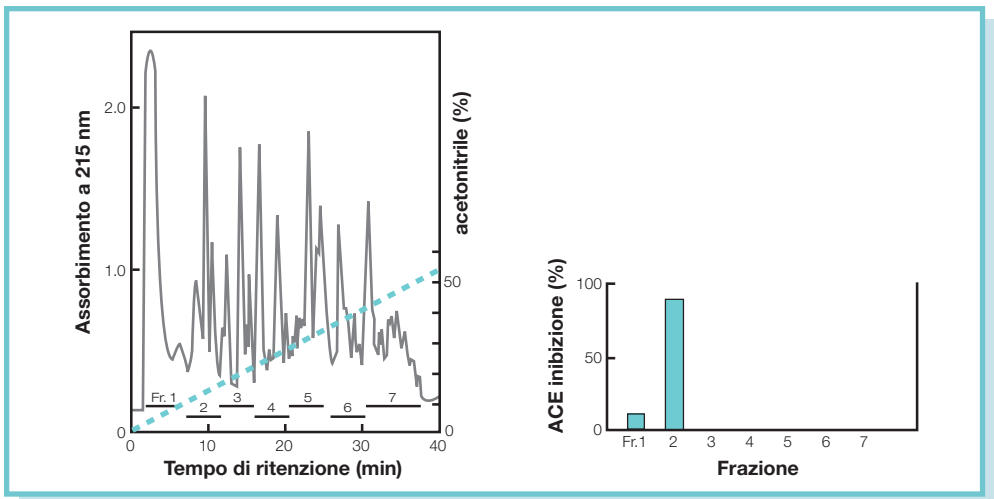
Come prima accennato, due risultano i peptidi inibitori dell'ACE ritenuti più importanti e che sono stati isolati e caratterizzati da latte fermentato con *Lactobacillus helveticus*, e precisamente (Val-Pro-Pro) e (Ile-Pro-Pro), rispettivamente f(84-86) e f(74-76) da  $\beta$ -caseina (**tabella 16**). Durante la fermentazione condotta con *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae* per ottenere il Calpis Sour Milk consumato in Giappone, cambiamenti significativi avvengono nella liberazione di peptidi nelle prime 4-10 ore di incubazione mentre l'attività ACE inibitoria aumenta con molta evidenza con la parte finale logaritmica di sviluppo e raggiunge il massimo di attività a 18 ore dall'inoculo, per poi rimanere costante.

**FIGURA 13.** Cambiamenti dell'attività inibitrice di angiotensin I-converting enzyme (ACE) durante la fermentazione del latte per ottenere il latte acido Calpis. (Nakamura e coll. - 67)



L'identificazione dei composti attivi è stata effettuata dopo eluizione HPLC, come mostrato in **figura 14** e il valore  $IC_{50}$ , che indica la concentrazione di un composto ACE inibitore necessaria per inibire il 50% dell'attività ACE, è risultato di 9  $\mu$ M per il peptide biogenico Val-Pro-Pro e di 5  $\mu$ M per Ile-Pro-Pro.

**FIGURA 14.** Individuazione di inibitori di angiotensin I-converting enzyme (ACE) presenti nel latte fermentato Calpis. (Nakamura e coll.- 67)



Un peptide con tre aminoacidi, con attività simile ai precedenti tripeptidi, è stato individuato con l'idrolisi della k-caseina e precisamente in posizione f(108-110). Recentemente in Finlandia è stato condotto uno studio pilota sull'effetto ipotensivo sull'uomo conseguente al consumo di latte-fermentato preparato con solo *Lactobacillus helveticus* LBK-16H ed è stato dimostrato che la somministrazione giornaliera di 150 ml di tale fermentato con una concentrazione di IPP di 15 mg/l e di VPP di 20-25 mg/l protratta per quattro settimane, è risultata sufficiente per indurre un significativo abbassamento della pressione del sangue. Questa dimostrazione è emersa dalla somministrazione ad un numero limitato di soggetti e richiede perciò nuove e più ampie indagini di conferma, ma vi è anche da tener presente che l'aggiunta al latte di IPP e VPP di sintesi, ha lo stesso effetto antiipertensivo del latte fermentato con *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae* della Calpis Food Industry.

La buona capacità a liberare tripeptidi ad attività antiipertensiva è stata dimostrata con ceppi della specie *Lactobacillus helveticus*, mentre ceppi di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* mostrano attività molto più debole.

Peptidi bioattivi ad attività antiipertensiva sono stati riscontrati anche in diversi formaggi. Nel Parmigiano Reggiano a sei mesi di stagionatura, sono stati identificati peptidi derivati da  $\alpha_{s1}$ -caseina che contengono la sequenza f(23-24) che sono riconosciuti con attività positiva. In Grana Padano e in formaggio prodotto con latte di pecora, il peptide f(102-108) da  $\alpha_{s1}$ -caseina è stato pure segnalato come peptide attivo. Nel formaggio spagnolo Manghego, peptidi attivi di basso peso molecolare sono stati recentemente riscontrati nell'estratto in acqua e di particolare interesse risulta il peptide f(102-109) da  $\alpha_{s1}$ -caseina.

### Proprietà funzionali di base del latte-fermentato Yakult

Nel 1907 Elia Metchnikoff, microbiologo russo esiliato a Parigi, sostenne che la dieta ricca di latte fermentato può correlarsi con il prolungamento della vita.

A questa conclusione giunse dopo aver indagato sullo stile di vita dei pastori delle montagne della Bulgaria che presentavano un buon stato di salute e lunga vita. Le popolazioni bulgare risultavano forti consumatori di yogurt e di latte di capra fermentato.

Da allora lo yogurt cominciò ad avere una diffusione sempre maggiore come alimento ad effetto salutistico.

Nel 1930 Minoru Shirota, professore presso la Japan's Imperial Kyoto University, giunse a mettere a punto il prodotto latte fermentato Yakult dopo aver studiato sia i batteri responsabili di malattie dissenteriche nei bambini, sia quelli utili per la salute dell'intestino.

Realizzò la preparazione industriale di un latte fermentato da bere con lo scopo di prevenire le malattie intestinali; come agente di fermentazione in grado di mantenere una favorevole condizione bilanciata della microflora intestinale, ricorse ad un ceppo di *Lactobacillus casei* oggi definito *Lactobacillus casei* Shirota.

Il *Lactobacillus casei* Shirota evidenzia diverse caratteristiche positive, in particolare la resistenza all'acidità dello stomaco e ai sali biliari, potendo così raggiungere, in numero elevato di cellule vive, il colon. Il latte-fermentato Yakult ha avuto grande diffusione nei paesi orientali, ma oggi è abbastanza conosciuto anche in Europa.

Dopo più di 70 anni di consumo diffuso e sulla base dei risultati di specifiche ricerche, le sue proprietà funzionali sono state valutate con attenzione e possono essere richiamate con i punti che seguono:

- aiuta e stimola il processo digestivo;
- riduce la crescita di alcuni tumori;
- neutralizza i prodotti tossici che si formano durante la digestione;
- modula il sistema immunitario;
- produce sostanze nutrienti;
- accumula acido lattico L(+);
- contrasta lo sviluppo di germi patogeni;
- controlla l'insorgenza di diarree da rotavirus e quella del viaggiatore.

Molta attenzione è stata riservata all'effetto di modulazione del sistema immunitario esercitato da *Lactobacillus casei* ceppo Shirota e recentemente ricercatori giapponesi hanno ulteriormente approfondito questo aspetto. Alle cellule indicate con NK (natural killer) viene attribuito un ruolo nel controllare lo sviluppo di tumori e delle infezioni virali e *Lactobacillus casei* del latte-fermentato Yakult può modulare, come microrganismo intestinale, l'attività delle cellule NK. Il consumo continuato di latte-fermentato Yakult risulta, a questo proposito, in grado di aumentare effettivamente l'attività NK in persone con malattie autoimmuni o con cancro, oppure persone anziane che normalmente presentano un basso livello di attività delle cellule NK.

## Quadro generale delle caratteristiche funzionali di base di latte-fermentati

Il quadro d'insieme delle caratteristiche funzionali di base dei latte-fermentati trova schematizzazione nella **tabella 17**. Dall'esame di essa si possono ricavare elementi utili per la preparazione di latte-fermentati, con proprietà funzionali aggiuntive, finalizzati al raggiungimento di specifici obiettivi.

**TABELLA 17.** Quadro d'insieme delle caratteristiche di base di alcuni latte-fermentati

Latte-fermentati di base	Microflora responsabile della fermentazione	Composti attivi presenti a fine fermentazione	Principali proprietà funzionali di base
Yogurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	$\beta$ -Galattosidasi, acido-3-idrossi-3-metilglutarico Peptidi bioattivi Polisaccaridi	Ipocolesterolemica Antitumorale Digestione del lattosio Immunomodulante
Kefir	batteri lattici acetobatteri lieviti	Acido lattico L(+) D-aminoacidi $\beta$ -galattosidasi Acido folico	Antidiarroica Antitumorale Digestione del lattosio Antibatteri patogeni
"Yogurt" tibetano	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus ferentoshensis</i> <i>Candida cruzeri</i>	Batteriocine	Antiulcera da <i>Helicobacter pylori</i>
Fermentato biogenico	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Tripeptidi	Ipotensiva
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Acido lattico L (+)	Antidiarrea da rotavirus Antitumorale Immunomodulante

## Riferimenti bibliografici

### Definizione di alimento funzionale

1. Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Brit. J. Nutr.*, 81, Suppl. 1, S1-S28.
2. Roberfroid M.B. (2002) Functional foods: concepts and application in inulin and oligofructose. *Brit. J. Nutr.*, 87, Suppl. 2, S1 39-S1 43.
3. Milner J. (2000) Functional food and nutraceuticals: the US perspective. 17th Ross Conference on Medical Issues. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 71, Suppl., 16545-16595.
4. Van Loo J., Franck A., Cummings J.H., MacFarlane G.T., Englyst H.N., Quigley M.E. et al. (1998) Consensus document on the functional food properties of non digestible oligosaccharides. (DGXII Endo Project) *Brit. J. Nutr.*, 81, 121-132.
5. Bellisle F., Diplock A.T., Hornastra G., Koletzko B., Roberfroid M., Salmines S., Saris W.H.M. (1998) Functional food science in Europe. *Brit. J. Nutr.*, 80, Suppl. I, S1-S193.

### Proprietà funzionali di base dello yogurt

6. Grunewald K.K. (1982) Serum cholesterol levels in rats fed skim fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.*, 47, 2078-2079.
7. Lipid Research Clinic Program (1984) The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease.

*J. Am. Med. Assoc.*, 251, 351.

- 8 Pekkanen J., Linn S., Heiss G., Suchindran C.M., Leon A., Rifkind B.M., Tyroler H.A. (1990) Ten year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 322, 1700.
9. Mann G.V., Spoerry A. (1974) Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Massay. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 464.
10. Mann G.V. (1974) A factor in yoghurt which lowers cholesterolemia in man. *Atherosclerosis*, 26, 335.
11. Bernstein B.A., Richardson T., Amudson C.H. (1976) Inhibition of cholesterol biosynthesis by bovine milk, cultured butter milk and orotic acid. *J. Dairy Sci.*, 59, 539-543.
12. Hallanger L.E., Laasko J.W., Schultze M.O. (1953) Orotic acid in milk. *J. Biol. Chem.*, 202, 83.
13. Mital B.K., Garg S.K. (1995) Anticarcinogenic, hypocholesterolemic and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Critical Rev. Microbiol.*, 21, 175.
14. Bottazzi V. (2002) ..... siamo piccoli e molto bravi in biochimica: produciamo lo yoghurt. *Ind. Latte*, 38, 5-64.
15. Bottazzi V. (1998) I latt fermentati. Ediz. Istituto Danone, Milano.
16. Martini M.C., Bollweg G.L., Fuller R., Hewitt D. (1987) Lactose digestion by yoghurt  $\beta$ -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 432.

17. Schaafsma G., Deikx P., Dekker P.R., De Waaral H. (1988)  
Nutritional aspects of yoghurt. 1: Microbial lactase activity and digestion of lactose. *Neth. Milk Dairy J.*, 42, 121.
18. Marteau P., Flourie B., Pochart P., Castang C. (1990)  
Effect of the microbial lactase activity in yogurt on the intestinal absorption of lactose, an in vivo study in lactase deficient humans. *Brith. J. Nutri.*, 64, 71.
18. Savaiano D.A. (1989)  
Lactose intolerance: Dietary management with yogurt. In: *Yogurt: Nutritional and Health Properties*. Ediz. Chadan R.C., National yogurt association Mc Lean, Virginia, USA, 215-223.
19. Saloff-Coste C.J. (1993)  
Lactose maldigestion. *Danone World Newsletter*.
20. Bottazzi V. (2002)  
Attività ipercolesterolemiche con batteri lattici e bifidobatteri. In: *Alterazioni metaboliche lipidiche*. A cura di Notarbartolo A. Ediz. Istituto Danone, pp. 179-193.
21. Bottazzi V. (2003)  
Yoghurt funzionale: alimento per la promozione della salute. *Il Latte*, 28, 44-55.
22. Zourari A., Anifantakis E.M. (1988)  
Le kefir. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Trechnologie de production, Une revue*. *Le Lait*, 68 (4), 373-392.
23. Kemp N. (1984)  
Kefir, the champagne of cultured dairy products. *Cult. Dairy Prod. J.*, 19, 29-30.
24. Bottazzi V., Zacconi C., Sarra P.G., Dallavalle P., Parisi M.G. (1994)  
Kefir: microbiologia, chimica e tecnologia. *Ind. Latte*, 30, 41-62.
25. Rosi J., Rossi J. (1978)  
I microrganismi del kefir: i fermenti lattici. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 29, 291-305.
26. Rosi J. (1978)  
I microrganismi del kefir: gli aceto-batteri. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 29, 221-227.
27. Rosi J. (1978)  
I microrganismi del kefir: i lieviti. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 29, 59-67.
28. Kosikowski F.V. (1977)  
Cheese and fermented milk foods. 2nd Edit. Edwards Brothers, Inc. Ann. Arbor., Michigan, 40-42.
29. Ottogalli G., Galli A., Resmini P., Volonterio G. (1973)  
Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Ann. Microbiol.*, 23, 109-121.
30. Bottazzi V., Bianchi F. (1980)  
A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *J. Appl. Bacteriol.*, 48, 265-268.
31. Bruckner H., Hausch H. (1990)  
D-aminoacid in dairy products: detection, origin and nutritional aspects. *Milchw.*, 45, 357-360.
32. Kneifel W., Mayer H.K. (1991)  
Vitamine profiles of kefir made from milks of different species. *Int. J. Food Sci.*, 26, 423-428.
33. Drewek Z., Czarnocka-Roczniakowa B. (1986)  
Microbiological processes in folacin synthesis in kefir. *Acta Alimentaria Polonica*, 12, 39-45.

### Proprietà funzionali di base del latte fermentato kefir

34. Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M., Aibara K. (1982)  
Antitumor activity in mice orally administered polysaccharide from kefir grain.  
Jap. J. Med. Sci. Biol., 35, 75-80.
35. Murofushi M., Shiomi M., Aibara K. (1983)  
Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice.  
Jap. J. Med. Sci. Biol., 36, 49-53.
36. Zacconi C., Parisi M.G., Sarra P.G., Dallavalle P., Bottazzi V. (1994)  
Competitive exclusion of Salmonella in chicks kefir feed  
Microbiol. Alim. Nutrit., 12, 387-390.
37. Samsonov M., Budagovskaya V. (1982)  
The role of fermented dairy drinks as dietary products.  
XXII Int. Dairy Congr., 2, 140-145.
38. La Riviere J.W. (1969)  
Ecology of yeasts in the kefir grain.  
Antonie Van Leeuwenhoek, 35 (Suppl.), D15-D16.
39. Toba T., Arihara K., Adachi S. (1990)  
Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains.  
Int. J. Food Microbiol., 10, 219-224.
40. Murofushi M., Mizuguchi J., Aibara K., Matuhasi T. (1986)  
Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice.  
Immunopharmacology, 12, 29-35.
41. Peek R.M. Jr. (2001)  
The biological impact of *Helicobacter pylori* colonization.  
Seminars in gastrointestinal disease, 12, 151-166.
42. Nomura A., Stemmerman G.N., Chyou P.H., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. (1994)  
*Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration.  
Ann. Internal. Med., 120, 977-981.
43. Asghar R.J., Parsonnet J. (2001)  
*Helicobacter pylori* and risk of gastric adenocarcinoma.  
Seminars in gastrointestinal disease, 12, 203-208.
44. Hopkins R.J., Girardi L.S., Turney A. (1996)  
Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review.  
Gastroenterology, 110, 1244-1252.
45. John H.W., Walter L.P. (1995)  
The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease.  
N. Engl. J. Med., 333, 984-991.
46. Dore M.P., Piana A., Carta M., Atzei A., Are B.M., Mura I. (1998)  
Amoxicillin resistance is one reason for failure of amoxicillinomeprazole treatment to *Helicobacter pylori* infection.  
Aliment. Pharmacol. Ther., 11, 711-718.
47. Midolo P.D., Korman M.G., Turnidge J.D., Lambert J.R. (1996)  
*Helicobacter pylori* resistance to tetracycline.  
Lancet, 347, 1194-1195.
48. Simsek H., Kadayifci A., Tatar G. (1996)  
Low eradication rates of *Helicobacter pylori* with omeprazole plus amoxicillin combination in Turkish population.  
Am. J. Gastroenterol., 91, 1062.

49. Aiba Y., Suzuki N., Kabir A.M.A., Takagi A., Koga Y. (1998)

Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model.  
Am. J. Gastroenterol., 93, 2097-2101.

50. Bhatia S.J., Kochar N., Abraham P., Nair N.G., Mehta A.P. (1989)

*Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro.  
J. Clin. Microbiol., 27, 2328-2330.

51. Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E., Servin A. (1998)

Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB.  
Appl. Environ. Microbiol., 64, 4573-4580.

52. Lorca G.L., Wadstrom T., de Valdez G.F., Ljungh A. (2001)

*Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro.  
Curr. Microbiol., 42, 39-44.

53. Michetti P., Dorta G., Wiesel P.H., Brassart D., Verdu E., Herranz M., Felley C., Porta N., Rouvet M., Blum A.L., Corthesy-Theulaz I. (1999)

Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (Johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans.  
Digestion 60, 203-209.

54. Oh Y., Osato M.S., Han X., Bennet G., Hong W.K. (2002)

Folk yogurt kills *Helicobacter pylori*.  
J. Appl. Microbiol., 93, 1083-1088.

55. Kim T.S., Hur J.W., Yu M.A., Cheigh C.I., Kim K.N., Hwang J.K., Pyun Y.R. (2003)

Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria.  
J. Food Protect., 66 (1), 3-12.

## Proprietà funzionali di base del latte-fermentato biogenico

56. Bottazzi V. (2003)

Latte, enzimi, microrganismi: formaggi grana.  
Ediz. Mofin-Alce (Novara).

57. Bottazzi V. (2003)

Yoghurt funzionale: alimento per la promozione della salute.  
Il Latte, 28, 44-55.

58. Okamoto A., Honagata H., Matsumoto E., Kawamura Y., Koizumi Y., Yanagida F. (1995)

Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods.  
Biosc. Biotech. Biochem., 59, 1147-1149.

59. Meisel H., Goepfert A., Gunther S. (1997)

ACE-inhibitory activities in milk products.  
Milchw., 52, 307-311.

60. Laffineur E., Genetet N., Leonil J. (1996)

Immunomodulatory activity of  $\beta$ -casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria.  
J. Dairy Sci., 79, 2112-2120.

61. Nurminen M.L. (2000)

Milk-derived peptides and blood pressure.  
IDF Bull. 353, 11-15.

62. Sipola M., Finckenberg P., Korpela R., Vapaatalo H., Nurminen M.L. (2002)

Effect long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats.  
J. Dairy Res., 69, 103-111.

63. Scolari G., Bottazzi V., Battistotti B. (2002)

Effetto antiipertensivo di peptidi prodotti da *Lactobacillus helveticus* in latte-fermentato.  
Convegno "Il formaggio: tecnologia, maturazione e caratterizzazione", Parma 29.10.02.

64. Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W. (1977)  
Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.  
*Science*, 196, 441-444.
65. Meisel H. (1993)  
Casokinins as inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme.  
In: *New Perspectives in Infant Nutrition*, pp. 153-159 (G. Sawatski, B. Renner, editori, Stuttgart, New York, Thieme).
66. FitzGerald R.J., Meisel H. (1999)  
Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides.  
*Mahrung*, 43, 165-167.
67. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. (1995)  
Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk.  
*J. Dairy Sci.*, 78, 777-783.
68. Seppo L., Kerojoki O., Soumalainen T., Korpela R. (2002)  
The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension—a pilot study in humans.  
*Milchw.*, 57, 124, 127.
69. Takano T. (2002)  
Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides.  
*Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 333-340.
70. Addeo F., Chianese L., Solzano A., Sacchi R., Capuccio V., Ferranti P., Malorni A. (1992)  
Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese.  
*J. Dairy Res.*, 59, 401-411.
71. Ferranti P., Itolli E., Barone F., Malorni A., Garro G., Laezza P., Chianese L., Migliaccio F., Stingo V., Addeo F. (1997)  
Combined high-resolution chromatographic techniques (FPLC and HPLC) and mass spectrometry-based identification of peptides and proteins in Grana Padano cheese.  
*Le Lait*, 77, 683-697.
72. Gomez-Ruiz J.A., Ramos M., Recio I. (2002)  
Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manghego cheese manufactured with different starter cultures.  
*Int. Dairy J.*, 12, 697-706.
73. Yamamoto N., Takano T. (1999)  
Antihypertensive peptides derived from milk proteins.  
*Nahrung*, 43, 159-164.
74. Ashar M.N., Chand R. (2003)  
ACE-Inhibitory activity of lactic acid bacteria in fermented milk.  
*Milchw.*, 58, 59-61.

### Proprietà funzionali di base del latte-fermentato Yakult

75. Takagi T., Matzuzaki T., Sato M., Nomoto K., Morotomi M., Yokokura T. (1999)  
Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice.  
*Med. Microbial. Immunol.*, 188, 111-116.

76. Matsuzaki T. (1998)  
Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota.  
*Int. J. Food Microbiol.*, 41, 133-140 (1998)

77. Aso Y., Akaza H., Kotake T., Tsukamoto T., Imai K., Naito S. and the BLP Study Group. (1995)  
Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial.  
*Eur. Urol.*, 27, 104-109.

78. Spanhaak S., Havenaar R., Schaafsma G. (1998)

The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in human.

Eur. J. Clin. Nutr., 52, 899-907.

79. Nagao F., Nakayama M., Muto T., Okumura K. (2000)

Effect of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2706-2708.



## PROPRIETÀ FUNZIONALI AGGIUNTE PER I LATTE-FERMENTATI

Partendo dalla base yogurt, e in senso più generale dai latte-fermentati, è possibile aprire un ampio capitolo nell'ambito del quale operare per preparare alimenti fermentati con la qualifica di "funzionale" maggiormente allargata e meglio definita. Le nuove opportunità finalizzate alla promozione della salute del consumatore attraverso l'alimento, si configurano sempre più e si articolano su canali produttivi che oramai si caratterizzano con differenti dotazioni di funzionalità alimentare. La tipologia dei latte-fermentati funzionali maggiormente dotati rispetto alla base risulta essere così composta:

- probiotico;
- prebiotico;
- simbiotico;
- funzionali speciali.

Le quattro linee indicate verranno di seguito trattate con considerazioni basate sulla più recente letteratura scientifica e tecnica

### Latte-fermentati probiotici

#### La microflora intestinale

La voce "latte-fermentati probiotici" stimola, sulla base di un ampio consenso di conoscenze già acquisite, una vasta serie di considerazioni che, se fatte nel dettaglio, richiederebbe molto spazio e ci porterebbe fuori dai limiti di pagine fissate per la presente pubblicazione.

Tuttavia un'esplorazione sintetica degli aspetti più significativi non può essere trascurata per aiutare alla delimitazione di un quadro che riguarda, con nuove prospettive, la preparazione dei latte-fermentati probiotici.

La microflora intestinale dell'uomo è particolarmente complessa e molto abbondante; si ritiene che sia composta da almeno 400 differenti specie di microrganismi in grado di formare un'associazione sinergica, che si traduce in un ecosistema di fondamentale importanza per la vita dell'uomo.

I microrganismi membri della flora intestinale residente e quelli contaminanti di origine ambientale che normalmente vengono isolati, possono essere distribuiti in diversi gruppi, come riportato in **tabella 18**.

È probabile che la gran parte dei microrganismi elencati siano quelli che esercitano un ruolo di controllo dell'ecologia intestinale dell'uomo, ma la lista delle specie batteriche non può essere che provvisoria, in quanto il loro isolamento e riconoscimento dipende dal tipo di metodiche analitiche utilizzate.

**TABELLA 18.** Principali gruppi di batteri isolati dal contenuto intestinale.

Bacilli	Cocchi
<i>Bacteroides</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Proteus</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Coprococcus</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Citrobacter</i>	
<i>Eubacterium</i>	
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Bifidobacterium</i>	
<i>Clostridium</i>	
<i>Propionibacterium</i>	

Il gruppo numericamente più importante è rappresentato dal genere *Bacteroides* con una decina di specie classificate. Si tratta di germi Gram-negativi, strettamente anaerobi, non sporigeni, a forma bacillare e, per alcune specie, con manifesto polimorfismo. Un altro gruppo di larga diffusione è rappresentato da *Fusobacterium*, batteri Gram-negativi, anaerobi, non mobili e non sporigeni. Tra i batteri Gram-positivi, non sporigeni di forma bacillare, diversi generi risultano numericamente importanti, in particolare *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e il genere *Eubacterium*. Tra i microaerofili e anaerobi facoltativi, sono da richiamare all'attenzione i membri del genere *Lactobacillus*, tra i cocchi anaerobi quelli rappresentanti del genere *Enterococcus* e *Streptococcus*.

## Distribuzione dei microrganismi nel tratto gastro-intestinale

Nelle persone adulte, la microflora intestinale forma un ecosistema complesso composto da comunità batteriche che variano in relazione alle differenti parti del tratto gastrointestinale. Il numero di microrganismi presenti è praticamente insignificante nello stomaco, mentre è estremamente abbondante nel colon. La composizione del microbiota nelle quattro porzioni del tratto gastrointestinale è quella riportata in **tabella 19**.

Il basso valore di pH nello stomaco è motivo di prevenzione dello sviluppo microbico, mentre nella parte alta del piccolo intestino, e precisamente nel duodeno, le secrezioni biliari e pancreatiche hanno un effetto battericida. Con la parte bassa del piccolo intestino, vale a dire digiuno ed ileo, il valore di pH si sposta verso il neutro, diminuisce la tensione di ossigeno, i secreti digestivi vengono diluiti e la microflora cambia di numero e di composizione. Nel largo intestino, il pH è prossimo al neutro e le condizioni che si realizzano sono favorevoli per la formazione di un ricco ecosistema microbico anaerobico.

**TABELLA 19.** Composizione del microbiota dei tratti del sistema gastrointestinale.

Tratto gastrointestinale	Conta microbica totale (UFC)	Principali gruppi microbici
Stomaco	$< 10^3/\text{ml}$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Candida</i>
Duodeno e digiuno	$< 10^3/\text{ml}$	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Candida</i>
Ileo	$10^3\text{-}10^8/\text{ml}$	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterobacterium</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
Colon	$10^{10}\text{-}10^{12}/\text{g}$	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Atopobium*</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Actinomyces</i>

\*: *Atopobium* include: *Atopobium*, *Coriobacterium*, *Eggerthella* e *Collinsella*. (Satokari - 14)

Le indicazioni relative ai principali gruppi microbici fornite con la **tabella 19**, e in particolare quelle che riguardano la porzione intestinale del colon, sono tuttavia da ritenersi incomplete, perché ottenute sulla base di indagini tassonomiche prevalentemente basate su tecniche analitiche microbiologiche tradizionali. Già l'applicazione recentemente introdotta delle tecniche di biologia molecolare ha consentito l'accertamento della presenza di componenti microbici che non è possibile, con le normali metodologie, far sviluppare in laboratorio e che potrebbero rappresentare anche un'alta percentuale della microflora totale.

Nel 1999, un gruppo di ricercatori di scuola americana ha condotto un vasto studio sulle sequenze di 16S rDNA dei componenti del microbiota fecale di singoli individui ed è stato trovato che il 76% delle rDNA sequenze individuate erano di specie microbiche sconosciute.

I batteri di caratterizzazione fenotipica che vengono con una certa facilità riprodotti in laboratorio, e dei quali si conosce un insieme di proprietà, sono *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus* e sono presenti in genere almeno con  $10^{10}$  UFC per grammo di feci, ma si stima che almeno 400 specie abbiano residenza nel colon, per cui le nostre attuali conoscenze sono ancora molto limitate. A maggior comprensione si può anche ricordare che con tecniche molecolari è stato accertato che *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale* e *Clostridium leptum*, costituiscono assieme dal 44 al 68% della comunità batterica delle feci e che *Fusobacterium* può raggiungere il 17% dei batteri totali.

## Colonizzazione batterica nei primi mesi di vita

La prima colonizzazione batterica del tratto gastro-intestinale si configura attraverso due momenti critici molto importanti: il momento della nascita con i primi giorni di vita e il periodo dello svezzamento.

Alla nascita l'intestino è sterile, ma il neonato è esposto alla contaminazione batterica iniziale con il contatto con l'ambiente vaginale della madre e già al momento della nascita inizia il processo di colonizzazione vero e proprio.

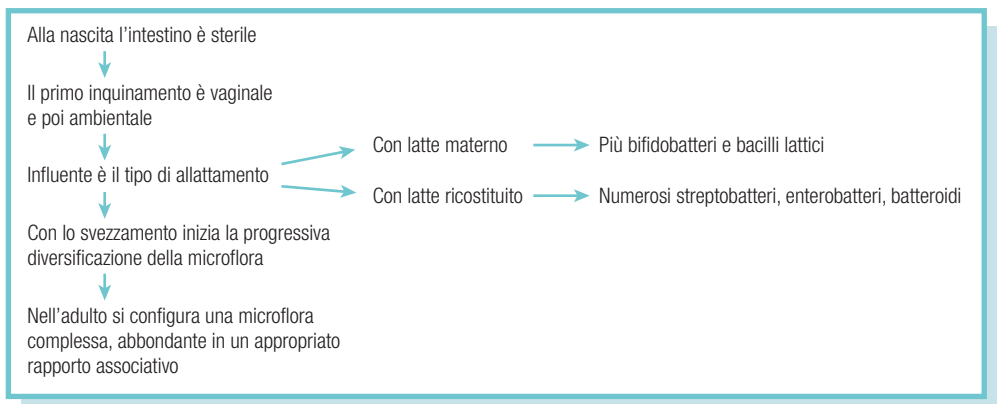
Rimarchevole è poi l'influenza esercitata dal tipo di allattamento nel primo mese di vita. Ricerche condotte con le tecniche microbiologiche convenzionali e con quelle moderne di biologia molecolare, hanno dimostrato che la microflora dei bambini allattati al seno è dominata dall'associazione bifidobatteri-batteri lattici, dal cui sviluppo consegue la produzione in un determinato rapporto quantitativo di acido lattico e di acido acetico, mentre quella dei bambini allattati con latte formulato presenta una maggiore rappresentanza di batteroidi, clostridi ed enterobatteriacee, che determinano un maggior accumulo di acido acetico e di acido propionico.

Le differenze nella composizione della microflora del bambino sono quindi in funzione del tipo di allattamento e ciò è dovuto all'intervento di numerosi fattori. Si può, in primo luogo, richiamare il fatto che il latte materno contiene immunoglobulina A e lisozima, che sono in grado di prevenire lo sviluppo di alcuni batteri. Inoltre il più basso valore di pH delle feci dei bambini allattati al seno, può favorire lo sviluppo di batteri lattici che sono acidurici.

La maggior presenza nel latte materno di lattoferrina, che sequestra il ferro necessario per la crescita di batteroidi ed eubatteri mentre non è richiesto da batteri lattici e bifidobatteri, funziona da modulante. Non può essere infine trascurato il ruolo svolto nel favorire lo sviluppo di bifidobatteri di fattori bifidogeni presenti nel latte materno, quali oligosaccaridi, nucleotidi e gangliosidi.

Il secondo momento critico è rappresentato dallo svezzamento, in cui lo sviluppo della microflora è condizionato dalla somministrazione di alimenti non derivati dal latte e dall'evolversi delle funzioni intestinali. È questo il periodo della graduale diversificazione, con passaggio progressivamente sempre più marcato verso una popolazione batterica che porta a un aumento dell'accumulo di acido propionico, acido butirrico e acido acetico. Queste brevi considerazioni vengono schematizzate nella **figura 15**. Con relazione alla colonizzazione in neonati, è opportuno anche segnalare che, nei neonati sani, i primi microrganismi ad insediarsi a livello della faringe sono una o poche specie di streptococchi  $\alpha$ -emolitici e che l'assenza di queste specie trova correlazione con un significativo aumento del rischio di infezioni. Inoltre, negli adulti, un abbassamento naturale, o indotto da antibiotici, del livello faringeo di streptococchi  $\alpha$ -emolitici, lascia spazio all'aumento di infezioni presiduate da *Streptococcus pyogenes*. Con tutto ciò è evidente che il discorso si amplia notevolmente, ma in questa sede si vuol solamente sottolineare che la prevenzione di faringiti streptococciche può essere potenzialmente effettuata con probiotici per esercitare un'interferenza batterica.

**FIGURA 15.** Schema dello sviluppo della microflora intestinale.



## Definizione di probiotici

Le considerazioni prima fatte hanno consentito di mettere in evidenza che i batteri lattici e i bifidobatteri costituiscono un gruppo di microrganismi fortemente rappresentati tra la microflora intestinale dell'uomo.

Nel 1965, per la prima volta, è stata usata l'espressione "probiotico" per descrivere sostanze secrete da un protozoo in grado di stimolare lo sviluppo di un altro protozoo.

In seguito sono stati descritti come probiotici gli estratti di tessuti in grado di stimolare lo sviluppo microbico e, nel 1974, lo stesso termine è stato introdotto per definire supplementi alimentari, inclusi organismi e sostanze varie, in grado di esercitare un effetto benefico sugli animali, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio della microflora intestinale.

Nell'ultimo ventennio del secolo scorso e sino a tutt'oggi, il termine probiotico è stato sempre più riservato ai microrganismi in grado di promuovere salute e benessere sia nell'uomo sia negli animali.

Il concetto di probiotico in effetti nasce quando Metchnikoff, all'inizio del ventesimo secolo, giunge ad affermare che i batteri interessati alla produzione di latte-fermentati sono in grado di contrastare nell'intestino lo sviluppo di fermentazioni putrefattive, da cui consegue che il consumo di yogurt gioca un ruolo positivo nel mantenimento della salute.

In più, sempre all'inizio del secolo scorso, Tissier scopre i bifidobatteri presenti in bambini allattati al seno e sottolinea che essi sono in grado di modulare la microflora di bambini con infezioni intestinali.

La diffusione delle notizie sugli effetti connessi con il consumo di yogurt del tipo caucasico e dei risultati delle ricerche microbiologiche condotte presso l'Istituto Pasteur, spingono, nel 1912, Isaac Carasso a fondare in Barcellona il gruppo Danone e a sensibilizzare la classe medica sui benefici del consumo di yogurt. Con la **figura 16** viene riprodotto un manifesto Danone risalente al 1919 che invita al consumo di yogurt e kefir presentati in un elegante contenitore.

Poco dopo si ha il primo documento sull'effetto salutistico legato a *Lactobacillus acidophilus* e, nel 1930 in Giappone, a *Lactobacillus casei* (poi definito *Lactobacillus casei Shirota*), che ha costituito la base per la fondazione dell'industria Yakult. In America è messo a disposizione del consumatore il prodotto "Acidophilus milk", fermentato con *Lactobacillus acidophilus* che è già un prodotto salutistico, vale a dire un probiotico.

Nel corso della seconda metà del secolo scorso, molta attenzione è stata riservata alla ricerca finalizzata alla selezione dei ceppi di bacilli lattici e di bifidobatteri più rispondenti a scopi commerciali, sia da un punto di vista probiotico sia per quanto riguarda l'individuazione di proprietà utili per la loro riproduzione.

Tutto l'insieme degli elementi raccolti ha così portato a una progressiva evoluzione della definizione di probiotici e oggi si può ritenere che la miglior definizione sia quella suggerita dal gruppo di esperti della Commissione di studio EC che, con riferimento alla nutrizione umana, precisa che "sono ingredienti alimentari probiotici quei microrganismi vivi che sono benefici per la salute".

**FIGURA 16.** Manifesto per la presentazione in Spagna di yogurt e kefir Danone risalente al 1919.



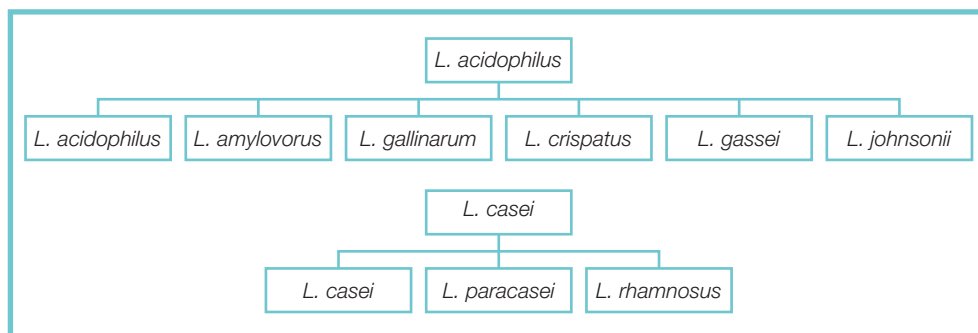
Si possono anche definire probiotici orali quei microrganismi vivi che, dopo ingestione in numero appropriato, esercitano un effetto benefico sulla salute del consumatore. Diversi membri del genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* che hanno, da un punto di vista generale, una lunga storia di biosicurezza nella preparazione di alimenti e, come componenti benefici della microflora intestinale, sono probiotici. Anche altri microrganismi sono probiotici e trovano impiego nella preparazione di prodotti probiotici, come indicato nella tabella 20.

**TABELLA 20.** Microrganismi utilizzati nella preparazione di prodotti probiotici. (Shortt-31)

Lattobacilli	Bifidobatteri	Altri microrganismi
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Cl. butyricum</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. crispatus</i>		

Recenti studi di tassonomia batterica, basati principalmente su esami di biologia molecolare, hanno dimostrato che la specie *Bifidobacterium longum* si articola in tre biotipi, il tipo *infantis*, il tipo *longum* ed il tipo *suis*, per cui la specie *Bifidobacterium infantis* indicata in **tabella 18** non figurerebbe più come specie a parte. Con riferimento alle specie di *Lactobacillus* lo schema tassonomico ottenuto su basi genetiche è quello della **figura 17**.

**FIGURA 17.** Schema tassonomico ottenuto su basi genetiche per *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*. (Morelli – 28)



## Batteri lattici e bifidobatteri enterici

Bacilli lattici e bifidobatteri formano una popolazione ampiamente studiata, e sono, come visto, componenti normali del complesso ecosistema del tratto gastrointestinale dell'uomo. Essi sono batteri autoctoni enterici e svolgono un ruolo importante nel mantenere in equilibrio i vari gruppi batterici che formano la comunità microbica intestinale e nel favorire, quindi, lo stato di salute del consumatore. Un consistente aiuto nello studio filogenetico e nella definizione dei bacilli lattici e dei bifidobatteri ci viene oggi offerto dalle analisi molecolari comparative di sequenze di 16S RNA ribosomale (rRNA).

I batteri Gram-positivi formano due linee filogenetiche; la prima linea, come in precedenza già richiamato, è quella con *Clostridium* che si caratterizza per la composizione in guanina+citosina del DNA inferiore al 54% e la seconda linea con *Actinomyces* con un valore di G+C del DNA superiore al 54%. I batteri lattici, con i generi *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, risultano i tipici rappresentanti con basso valore di G+C e tre sono i raggruppamenti filogenetici individuati: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, ma esistono tuttora difficoltà tassonomiche per la differenziazione di specie.

I bifidobatteri rientrano nella linea *Actinomycetes* e costituiscono un genere distinto dai batteri lattici; le sequenze 16S rRNA formano un'unità filogenetica coerente con il 93% di similarità.

I membri del genere *Lactobacillus* si riscontrano abbondanti nell'intestino, ma anche facilmente all'esterno come, ad esempio, nei formaggi o nei vegetali fermentati, mentre i bifidobatteri hanno prevalentemente un'origine intestinale. Le specie di batteri lattici e di bifidobatteri accertate con tecniche molecolari presenti nel tratto gastrointestinale dell'uomo sono riportate in **tabella 21**.

**TABELLA 21.** Specie di batteri lattici e di bifidobatteri presenti nel tratto gastrointestinale dell'uomo accertate con metodi molecolari. (Vaughan e coll. 41)

Batteri lattici	Bifidobatteri
<p><b>Genere <i>Lactobacillus</i></b>  <i>L. acidophilus</i>  <i>L. crispatus</i>  <i>L. brevis</i>  <i>L. casei</i>  <i>L. delbrueckii</i> (gruppo)  <i>L. fermentum</i>  <i>L. gasseri</i>  <i>L. paracasei</i>  <i>L. plantarum</i> (gruppo)  <i>L. rhamnosus</i>  <i>L. ruminis</i>  <i>L. sakei</i>  <i>L. salivarius</i>  <i>L. vaginalis</i>  <i>L. curvatus</i>  <i>L. fructivorans</i></p> <p><b>Genere <i>Leuconostoc</i></b>  <i>Leuc. argentinum</i>  <i>Leuc. mesenteroides</i></p> <p><b>Genere <i>Pediococcus</i></b>  <i>Ped. pentosaceus</i></p>	<p><b>Genere <i>Bifidobacterium</i></b>  <i>B. adolescentis</i>  <i>B. angulatum</i>  <i>B. bifidus</i>  <i>B. breve</i>  <i>B. catenulatum</i>  <i>B. infantis</i>  <i>B. longum</i>  <i>B. pseudocatenulatum</i></p>

Recentemente è stato sottolineato che *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* sono specie dominanti nelle feci di bambini lattanti, mentre *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus gasseri* sono dominanti nelle feci di adulti; in parallelo è stato accertato che *Lactobacillus ruminis* è un componente regolare. *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium catenulatum* appaiono molto comuni negli adulti, mentre *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium infantis* sono dominanti nelle feci dei bambini.

## Basi per la selezione di ceppi di microrganismi probiotici

La ricerca scientifica a supporto e a dimostrazione del concetto che il mantenimento di un appropriato equilibrio tra i componenti della microflora intestinale torna utile per la difesa verso i disordini gastrointestinali che, a loro volta, si ripercuotono negativamente sullo stato di benessere del consumatore, è in continuo sviluppo.

La preparazione di latte-fermentati arricchiti con microrganismi probiotici è sempre più viva e dinamica e diventa, a questo scopo, fondamentale l'impiego di microrganismi con proprietà definite, vale a dire opportunamente selezionati per risultare rispondenti.

I punti di base emergenti per la selezione di ceppi probiotici vengono indicati, in forma schematica, in **figura 18**.

**FIGURA 18.** Schema di base per la selezione di microrganismi probiotici (Saarela e coll.- 143).



Alcuni ceppi di batteri lattici e i bifidobatteri attualmente impiegati come probiotici sono riportati in **tabella 21**.

**TABELLA 22. Proprietà salutistiche documentate di ceppi di batteri lattici e bifidobatteri impiegati come probiotici**

Genere	Specie	Ceppo	Proprietà salutistiche	Bibliografia	Produttore
<b>Lactobacillus</b>	<i>acidophilus</i>	La5 NCFM	antidiarroico	Black e coll. (49)	Chr. Hansen, Danimarca Rodia, Madison, USA
	<i>casei</i>	Shirota	riduzione diarrea da rotavirus e della attività tumorale, immunomodulazione	Sugita e Togowa (50) Aso e coll. (51) Nagao e coll. (52)	Yakult, Tokyo, Giappone
		DN-114 001	riduzione episodi e durata della diarrea, + immunomodulazione	Pedone e coll (53) Agarwal e coll (54) Pujol e coll (55)	Danone, Parigi, Francia
	<i>fermentum johnsonii</i>	RC-14	adiutori di vaccinazione orale	Link-Amster e coll. (56)	Urex, Biotech, London, Canada Nestlé, Losanna, Svizzera
		La1	riduce colonizzazione da <i>Helicobacter pylori</i>	Felley e coll. (57)	
	<i>plantarum rhamnosus</i>	199v GG	riduzione LDL colesterolo riduzione diarrea da rotavirus immunomodulazione riduzione infiammazioni intestinali prevenzione di allergie	Niedzielin e coll. (58) Guadalini e coll. (59) Kaila e coll. (60) Gupta e coll. (61) Kalliomaki e coll. (62)	Probi, Lund, Svezia Valio, Finlandia
		LB21 GR-1			Essum AB, Umea, Svezia Urex Biotech, London, Canada
<i>reuteri salivarius</i>	SD212 UCC118	riduzione diarrea da rotavirus riduzione infiammazioni intestinali riduce irritazioni intestinali	Shornikova e coll. (63) Mattila-Sandholme coll. (64) Brigidi e coll. (65)		
<b>Bifidobacterium</b>	<i>breve longum lactis</i>	BB536 BB12	prevenzione di allergie riduzione diarrea da rotavirus riduzione diarrea del viaggiatore adiutori di vaccinazione orale	Isolauri e coll. (66) Saavedra e coll. (67)  Black e coll. (68) Link-Amster e coll. (56)	Morinaga Milk Industry, Giappone  Chr. Hansen, Danimarca
		<i>animalis</i>	DN-173 010	regolarizzazione del tempo di svuotamento del colon nella stipsi	Bouvier e coll. (69) Marteau e coll. (70) Meance e coll (71) Antoine e coll (72)

Accanto ai principali criteri di selezione indicati in **figura 18**, è bene che non ne siano trascurati altri, pur da considerarsi addizionali, quali:

- “buone proprietà tecnologiche”, vale a dire stabilità del ceppo, riproducibilità su larga scala, resistenza alla liofilizzazione,
- capacità ad aggregare con patogeni,
- tolleranza verso l'ossigeno,
- buona sopravvivenza delle biomasse liofilizzate al variare delle temperature ambientali.

In altre parole, la base teorica per la selezione dei microrganismi probiotici comprende gli aspetti di biosicurezza, quelli funzionali con riferimento a sopravvivenza, aderenza, colonizzazione e produzione di composti antimicrobici,

**TABELLA 23. Effetti di ceppi probiotici accertati da studi clinici**

Indicazioni	Effetti clinici	Ceppi probiotici e yogurt
Lattosio maldigestione	Miglioramento della digestione	Yogurt, <i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp.
Diarrea da rotavirus	Riduzione della durata della diarrea, miglioramento della risposta immunitaria	<i>L. rhamnosus</i> 66 <i>L. reuteri</i> <i>B. bifidum</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. casei</i> Shirota <i>L. casei</i> DN-114 001
Diarrea del viaggiatore	Riduzione dell'intensità della diarrea	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>B. lactis</i> BB12 <i>L. acidophilus</i> La5
Modulazione immunologica	Più alto livello di Iga, miglioramento della fagocitosi	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. johnsonii</i> La1 <i>B. lactis</i> BB 12
Attività enzimatica fecale	Riduzione dell'attività di ureasi, acido glicolico, idrolasi, $\beta$ -glucuronidasi, nitroriduttasi e azotoriduttasi	Yogurt <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. casei</i> Shirota <i>L. gasseri</i> (ADH)
Tumori vescicolari superficiali	Riduzione della frequenza	<i>L. casei</i> Shirota
Tumori cervicali	Riduzione della crescita	<i>L. casei</i> Shirota
Infezioni vaginali	Riduzione dell'infezione	<i>L. rhamnosus</i> GR-1 <i>L. acidophilus</i>

l'immunostimolazione, l'attività antigenotossica e l'inibizione di patogeni; inoltre quelli tecnologici con lo sviluppo in latte, le proprietà sensoriali, la stabilità, la resistenza fagica. A conclusione di queste brevi considerazioni, torna utile la presentazione della **tabella 23** sugli effetti esercitati sull'uomo da ceppi probiotici.

## Modulazione della microflora intestinale ed effetti probiotici sulle patologie infettive

Dall'esame delle **tabelle 22** e **23**, emerge che l'impiego di probiotici come supplementi della dieta ha un effetto benefico nel controllo delle infezioni gastrointestinali. In particolare, l'effetto è chiaro nei riguardi della diarrea del viaggiatore nonché di quelle associate con le terapie antibiotiche e nel regolare le funzioni immunologiche.

Con riferimento alla diarrea infantile comunemente causata da rotavirus, si è visto che differenti probiotici, ma in special modo ceppi del genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, possono efficacemente ridurre la durata del periodo di diarrea. Infezioni da *Clostridium difficile*, che provoca coliti, sono normalmente associate con terapie antibiotiche che determinano squilibri nella microflora intestinale, ma è stato constatato che la somministrazione con la dieta di *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* riduce l'intensità del processo infettivo.

Lo squilibrio della microflora intestinale residente può indurre lo sviluppo anomalo di microrganismi enteropatogeni, quali *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* e *Shigella* spp. e i probiotici sono attivi anche verso questi microrganismi.

La diarrea del viaggiatore è comunemente sostenuta da ceppi enteropatogenici di *Escherichia coli* ed è una patologia molto diffusa che può essere prevenuta con *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium*. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* esercitano azione inibitrice, attraverso la produzione di uno specifico fattore, verso *Helicobacter pylori* che è causa di ulcera gastrica.

Nell'uomo, è stato accertato che batteri probiotici hanno una proprietà immunostimolante per il controllo delle diarreie virali e modulano la risposta verso antigeni della dieta in adulti latte-ipersensitivi.

Con prove condotte su soggetti che per quattro mesi hanno consumato quotidianamente forti quantità di yogurt è stato alla fine riscontrato un significativo incremento nella produzione di  $\gamma$ -interferone. Va anche sottolineato che un eccessivo sviluppo di *Candida* nell'intestino è frequentemente conseguenza di terapie antibiotiche e che *Sacharomyces boulardii* protegge dalla colonizzazione intestinale sostenuta da *Candida albicans*. In soggetti sottoposti a chemioterapia per leucemia è stato dimostrato che preparazioni di latte contenenti *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. sono in grado di ridurre la presenza di *Candida* nelle feci.

Infine, va accennato che i lattobacilli con le specie *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus johnsoni* formano un gruppo di batteri probiotici attivi per realizzare vaccinazioni per via orale e le possibilità applicative che si prospettano sono di grande interesse.

## Quantità di microrganismi probiotici necessari per ottenere una temporanea colonizzazione intestinale

I fattori che possono influire sulla colonizzazione temporanea con microrganismi probiotici esogeni del tratto alimentare dell'uomo, sono molti e agiscono attraverso azioni complesse e meccanismi biologici di difficile delimitazione.

Da un punto di vista generale si possono ritenere influenti i seguenti fattori:

- la specie o l'associazione di microrganismi probiotici somministrati,
- la gastro-resistenza naturale o la gastro-protezione applicata ai ceppi,
- la combinazione dei prebiotici associata ai probiotici,
- la strategia probiotica seguita,
- il regime alimentare del consumatore,
- la continuità della somministrazione del preparato simbiotico.

È stato dimostrato che la concentrazione di cellule vive di probiotici non gastro-protetti di  $10^9$  per giorno per persona adulta è sufficiente per ottenere una temporanea colonizzazione, mentre con  $10^7$  l'effetto è dubbio e con  $10^5$  è insufficiente.

Nel caso di consumo giornaliero di un vasetto di yogurt probiotico, può essere accettato che, alla scadenza, la concentrazione in microrganismi probiotici vivi sia non meno di  $10^7$  per grammo.

## Latte-fermentati prebiotici

### Composti prebiotici

La composizione della dieta, che per motivi ambientali, etnici, religiosi e sociali è alquanto variabile, svolge una forte influenza sulla fisiologia intestinale e sul metabolismo della microflora residente. Scientificamente è ben documentato che componenti di alimenti, quali proteine, lipidi e carboidrati, influenzano in modo evidente la composizione e i rapporti associativi della microflora intestinale.

Una particolare attenzione viene riservata a quei carboidrati che non sono idrolizzati o assorbiti nella parte alta dell'intestino e che pertanto raggiungono tal quali la parte bassa dell'intestino, ove vengono selettivamente fermentati dai microrganismi e diventano determinanti nel regolare lo sviluppo della microflora probiotica.

Quest'ultimo aspetto ha una sua specifica ricaduta, in considerazione del fatto che proprio i bifidobatteri e i bacilli lattici autoctoni ed esogeni sono quelli che più traggono vantaggio dalla disponibilità di sostanze ad azione bifidogena, che prendono la definizione di "prebiotici".

Con altre parole, un componente prebiotico è un ingrediente alimentare non digeribile che esercita benefici effetti sull'ospite, in seguito all'azione selettiva stimolante lo sviluppo di uno o di un limitato numero di batteri probiotici presenti nel colon, che a loro volta sono in grado di migliorare la salute del consumatore. Possono essere classificati come prebiotici quegli ingredienti alimentari che rispondono ai seguenti criteri:

- non essere idrolizzati e assorbiti nella parte alta del tratto gastrointestinale;
- risultare utilizzabili da parte di pochi gruppi di microrganismi probiotici quali, ad esempio, bifidobatteri e bacilli lattici, che così vengono stimolati nel loro sviluppo e nelle loro attività metaboliche;
- contribuire al mantenimento della composizione del microbiota del colon con una microflora più salutistica come, ad esempio, stimolando l'aumento del numero della microflora saccarolitica a scapito di quella putrefattiva;
- indurre effetti che nel complesso siano benefici per la salute del consumatore.

Vengono considerati a forte vocazione prebiotica i carboidrati non digeribili come gli oligosaccaridi, con i fruttooligosaccaridi FOS che sono  $\beta$ -D-fruttani con diverso grado di polimerizzazione. I GOS, cioè i galattooligosaccaridi, il lattuloso, il lattitolo e l'acido lattobionico, sono pure importanti prebiotici di interesse per la preparazione di alimenti funzionali. Da un punto di vista più generale, la **tabella 24** fornisce le indicazioni di carboidrati ad azione bifidogena.

**TABELLA 24.** Prebiotici ad azione bifidogena

Lattuloso
Raffinosio
Lattitolo
Galattooligosaccaridi
Xilooligosaccaridi
Beta-glucooligosaccaridi
Oligosaccaridi da soia
Inulina
Estratto di germe di frumento

## Inulina e oligofruuttosio: origine e composizione chimica

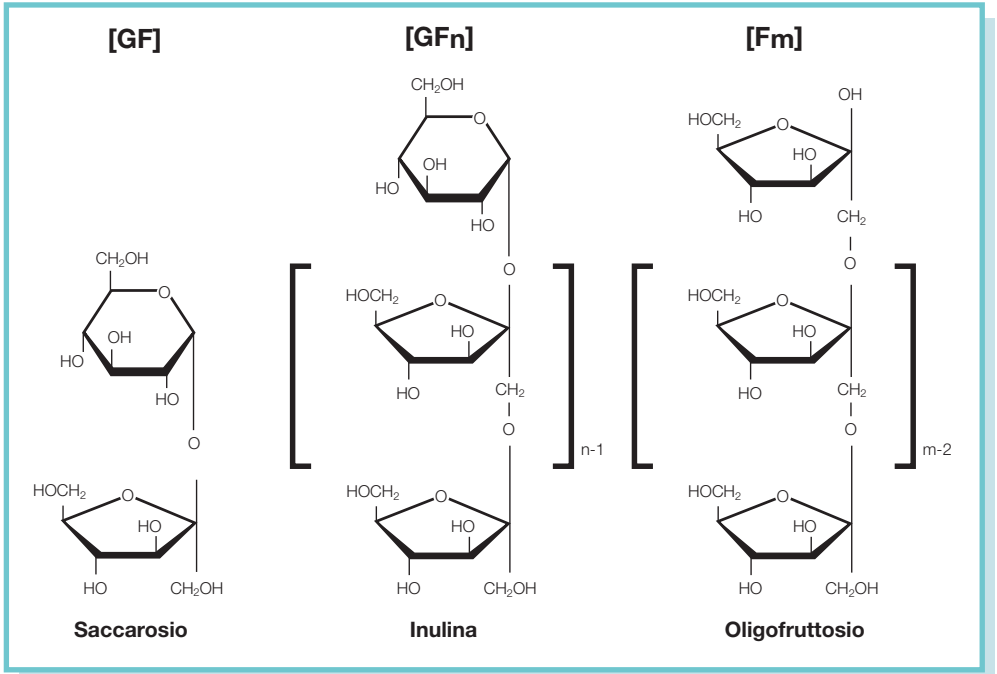
Bacilli lattici e bifidobatteri formano il gruppo dei batteri probiotici della microflora intestinale più studiati, e differenti specie enteriche hanno suscitato interessi pratici applicativi con la loro aggiunta ai latte-fermentati in qualità di ingredienti funzionali. L'utilizzazione dei bifidobatteri risulta più limitata rispetto a quella dei batteri lattici perché, in primo luogo, sono microrganismi molto sensibili all'ossigeno, al valore di pH del latte-fermentato (yogurt), nonché alle condizioni che si raggiungono durante la preparazione industriale delle biomasse. Diventa quindi più opportuno e razionale cercare di farli maggiormente e più rapidamente sviluppare nel sito dove già risiedono, o possono arrivare, con una somministrazione per via orale. È accertato che i bifidobatteri sono normali componenti della microflora del colon e far giungere nel colon prebiotici con attività bifidogena è un'importante via per garantire un loro efficiente sviluppo, traducibile in attività probiotiche utili per promuovere la salute del consumatore. Inulina ed oligofruuttosio sfuggono, come detto, alla digestione nella parte superiore del tratto gastrointestinale e arrivano nel grande intestino virtualmente intatti; questa caratteristica risulta significativa per realizzare più intense fermentazioni presiedute dalla microflora saccarolitica residente. Gli effetti indotti da inulina e oligosaccaridi sono stati estensivamente studiati, in particolare negli ultimi decenni, e di seguito verranno fatti richiami circa la loro origine, composizione chimica, proprietà funzionali, con maggior dettaglio per quanto riguarda la loro attività bifidogena. L'inulina è stata per la prima volta descritta in Germania nel 1804 da Rose, che ebbe modo di studiare l'estratto acquoso di *Inula helenium*, appartenente alla famiglia delle *Compositae*, di crescita nelle regioni temperate dell'Europa, Asia ed Africa. L'inulina è comunque presente in migliaia di differenti piante e oggi per usi commerciali viene estratta dalle radici di cicoria (*Cichorium intybus*). Inulina e oligofruuttosio vengono ufficialmente classificati come ingredienti alimentari naturali. Il contenuto di inulina e oligofruuttosio di alcuni comuni vegetali è indicato in **tabella 25**.

**TABELLA 25.** Contenuto medio di inulina e oligofruuttosio in alcuni comuni vegetali (g/100 g)

Indicazione	Inulina	Oligofruuttosio
Radici di cicoria	41,6	22,9
Asparago	2,5	2,5
Banana	0,5	0,5
Aglio	12,5	5,0
Carciofo Jerusalem	18,0	13,5
Cipolla	4,3	4,3
Frumento	2,5	2,5
Riso	0,7	0,7

In tempi antichi, il consumo di inulina era stato calcolato in 25-32 grammi per persona per giorno, mentre oggi in Europa e negli Stati Uniti d'America è valutato, per inulina e prodotti dell'idrolisi, rispettivamente in 2-12 e 2-8 g/persona/giorno. In **figura 19** è riportata la struttura chimica di inulina ed oligofruztosio: dal punto di vista chimico sono dei fruttani che nelle piante vengono sintetizzati a partire dal saccarosio.

**FIGURA 19.** Struttura chimica di saccarosio, inulina e oligofruztosio



## Proprietà bifidogene di inulina e oligofruztosio

Il colon rappresenta la zona a più alta intensità di colonizzazione batterica; a livello del colon è costante la comparsa di centinaia di differenti specie di microrganismi che possono raggiungere una massa microbica che supera il valore di  $10^{11}$  batteri per grammo di contenuto intestinale. Questa enorme massa microbica (è stato calcolato che in persone adulte possa raggiungere anche il peso di un chilogrammo) è composta da batteri benefici e da altri putrefattivi e potenzialmente patogeni; per poter esercitare funzioni in grado di promuovere lo stato di benessere del consumatore, i primi devono porsi in equilibrio con i secondi. Sono batteri putrefattivi o patogeni ceppi di *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*,

*Veillonella* e *Klebsiella*, mentre sono benefici, in modo particolare, i ceppi di *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e poi *Bacteroides* ed *Eubacterium*. Quando i lattobacilli e bifidobatteri raggiungono il livello ottimale, coprono circa un terzo della popolazione batterica totale del tratto gastrointestinale di una persona adulta. Il numero di bifidobatteri può essere preso per l'uomo come "marker" di stabilità della microflora intestinale. L'effetto prebiotico più conosciuto dovuto all'inulina, è quello di stimolare nel colon lo sviluppo dei bifidobatteri, che si traduce in un accumulo di metaboliti ad azione probiotica. Di fondamentale importanza nel controllare lo sviluppo di batteri potenzialmente patogeni o putrefattivi di sede intestinale, risulta la produzione di acido acetico e di acido lattico. In particolare l'acido acetico esercita un effetto antibatterico superiore a quello dell'acido lattico e, molto probabilmente, ciò è dovuto alla più grande quantità di acido indissociato al pH intestinale (5,8-6,0). Siccome i bifidobatteri producono, rispetto all'acido lattico, un quantitativo doppio di acido acetico indissociato, questo risulta essere undici volte superiore a quello dell'acido lattico e numerosi batteri patogeni o putrefattivi sono molto sensibili alla concentrazione di acido organico non dissociato. La modulazione della microflora del colon attraverso la stimolazione con inulina dei bifidobatteri, finisce per controllare la produzione di metaboliti tossici quali tossine ed enzimi carcinogenici, come riportato in **tabella 26**.

**TABELLA 26. Prodotti metabolici tossici o carcinogenici di attività di microflora intestinale patogena o putrefattiva.** (Boeckner e coll. - 105)

Attività enzimatica	Composti metabolici	Tossicità, attività carcinogene o mutageniche
Ureasi	Ammoniaca	Tossina epatica, carcinogeno
Tirosinasi	P-cresolo	Cancro promotore
Triptofanasi	Indolo	Carcinogeno
Decarbossilasi	Amine	Tossina epatica
Azotoriduttasi	Composti n-nitroso	Carcinogeni
Deaminasi	Idrogeno solforato	Carcinogeno
Nitrato riduttasi	Sostanze ormonali	Cancro promotrici
N-nitroriduttasi	Amine aromatiche	Carcinogene
Nitrificazione	Amine secondarie	Carcinogene, tossine epatiche
N-dealkylation	Steroidi neutri	Carcinogeni
Deconiugazione	Steroidi acidi	Carcinogeni
$\beta$ -glucosidasi	Agliconi	Mutagenici
$\beta$ -glucuronidasi	Agliconi	Mutagenici
Idrolasi acido glicolico	Acidi biliari secondari	Carcinogeni, promotori di cancro al colon

A questo proposito si può ricordare, ad esempio, che *Escherichia coli* e *clostridi* hanno una buona capacità di produrre amine carcinogene e promotori di cancro come nitrosamine, fenoli, cresoli, indolo, scatolo, estrogeni, acidi biliari secondari e agliconi e che *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* vengono associati con diarrea, malattie epatiche, effetti carcinogenici e processi putrefattivi intestinali. *Proteus*, a sua volta, accumula ammoniaca, amine e indolo, *Enterococcus faecalis* nitrosamine e acidi biliari secondari.

Da un punto di vista generale, è possibile ritenere che l'effetto favorevole per la salute promosso da un incremento dello sviluppo di bifidobatteri, sia dovuto all'inibizione di batteri indesiderati, alla stimolazione delle funzioni immunologiche, al miglioramento del rapporto digestione-assorbimento di nutrienti essenziali e alla sintesi di vitamine quali biotina, tiamina, riboflavina, niacina, B12, piridossale ed acido folico. Inoltre i bifidobatteri (**Figura 20**), sono in grado di produrre sostanze batteriocine-simili, che sono attive verso diversi generi di microrganismi patogeni quali *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*.

Nello stesso tempo è stato dimostrato che i bifidobatteri sono incapaci di produrre amine alifatiche, idrogeno solforato o nitriti, mentre sono dei buoni produttori di enzimi digestivi. Nel corso degli ultimi vent'anni diverse ricerche hanno riferito di una possibile fermentazione selettiva esercitata da differenti oligosaccaridi non digeribili. Un'idea di ciò può essere ricavata dall'esame della **tabella 27** che ne riporta l'utilizzazione da parte di differenti microrganismi.

**FIGURA 20.** Morfologia di bifidobatteri ripresa al microscopio elettronico a scansione.



**TABELLA 27.** Utilizzazione di oligosaccaridi non digeribili da parte di microrganismi del microbiota intestinale. (Boeckner e coll. - 105)

Specie batterica	FOS*	INU	LOL	PHGG	LAC	LAT	TOS	RAF	GLL	IMO
<i>Bifidobacterium sppc</i>	+	+	V	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus-group</i>	V**	+	+	-	+	+	+	-	+	V
<i>L. casei</i>	V	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bacteroides fragillis</i>	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
<i>B. thetaiotamicron</i>	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+
<i>B. vulgatus</i>	+	+		+	+	+	+	V	+	+
<i>B. ovatus</i>	+	+		-	+	+	+	V	-	+
<i>B. distasonis</i>	+	+	+		+	+	+	V	+	+
<i>Eubacterium lentum</i>	-	-			+	+	+	-	-	-
<i>E. limosum</i>	-	-		-		-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	-				-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+			+	+		V		
<i>E. faecium</i>	+	+			+	+		V		
<i>Propionibacterium granulosumi</i>	-	V		-						
<i>Escherichia coli</i>	V	-	-		+	V	+	-	-	-
<i>Peptostreptococcus prevotil</i>	+	-		-	-			+		
<i>Clostridium perfringens</i>	V	V	+		+	+	V	V	-	+
<i>C. paraputrificum</i>	-	-		-	+	+		-		
<i>C. clostridiiforme</i>	V	-	+		+	-		V	-	-
<i>C. difficile</i>	-	-		-	-	-		-		
<i>C. romosum</i>	+	+	+	+	+	+		V	-	+
<i>C. butyricum</i>		-	+	-		+	-	+	-	-
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	-	-		-	-	-	-	-	-
<i>Veillomella parvula</i>	-	-	-		-	-	-	-	-	-

\* FOS = fruttooligosaccaride

INU = inulina

LOL = lattitolo

PHGG = gomma guar parzialmente idrolizzata

LAC = lattosio

LAT = lattulosio

TOS = translattosiloligosaccaride

RAF = raffiniosio

GLL = 4'-galattosillattosio

IMO = isomaltooligosaccaride

\*\*V = variabile

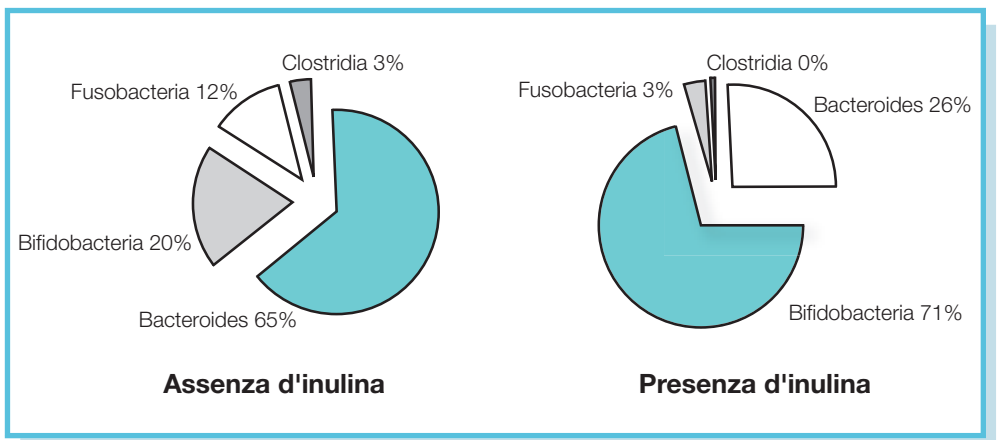
Da sperimentazioni condotte in vitro con diversi ceppi di bifidobatteri è stato dimostrato che, in presenza di inulina da cicoria, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium pseudolongum* e *Bifidobacterium angulatum* hanno uno sviluppo più rapido rispetto alla presenza di glucosio, mentre *Bifidobacterium bifidum* e ceppi di *Bifidobacterium longum* risultano con un comportamento opposto. La velocità di crescita dei bifidobatteri contrasta significativamente lo sviluppo di *Clostridium perfringens* ed *Escherichia coli*.

Inulina e oligofruuttosio vengono nel complesso definiti un buon substrato non solo per lo sviluppo di *Bifidobacterium* ma anche per bacilli lattici. Quest'ultimo aspetto è stato nuovamente dimostrato anche con indagini condotte con colture in continuo, attraverso l'impiego di tecniche analitiche molecolari.

La somministrazione di inulina ed oligofruuttosio con la dieta causa un aumento significativo di bifidobatteri fecali e, con somministrazioni separate dei due composti, bifidogeni si è visto, operando con persone volontarie di sesso maschile, che *Bacteroides*, clostridi e fusobatteri diminuiscono durante il periodo di arricchimento della dieta con oligofruuttosio, mentre le forme cocciche Gram-positivo risultano ridotte con la somministrazione di inulina.

La **figura 21** illustra, in forma di cartogramma, l'effetto sulla composizione della microflora intestinale dovuto all'azione selettiva dell'inulina.

**FIGURA 21.** Effetto sulla composizione della microflora intestinale dell'azione selettiva dell'inulina. (Boeckner e coll. - 105)



I frutto-oligosaccaridi (FOS) a catena corta sono fruttani largamente distribuiti nelle piante commestibili e si caratterizzano per presentarsi come associazione da una a tre molecole di fruttosio con una molecola di saccarosio. Risultano, quindi, con un grado di polimerizzazione inferiore a 5 unità glucidiche e questo, dal nostro punto di vista, è molto importante perché rende il prodotto facilmente utilizzabile dai bifidobatteri, assumendo pertanto un alto potere bifidogeno. Altri FOS a corta catena vengono prodotti dal saccarosio per intervento dell'enzima fruttosil-transferasi prodotto da *Aspergillus* con l'accumulo di tre composti:

- GF2, che è costituito da una molecola di glucosio e due di fruttosio (1-kestosio)
- GF3, che è dato dall'associazione di una molecola di saccarosio con due di fruttosio (Nistosio)
- GF4, che è rappresentato da una associazione di tre molecole di fruttosio ed una di saccarosio (Fruttosil-nistosio)

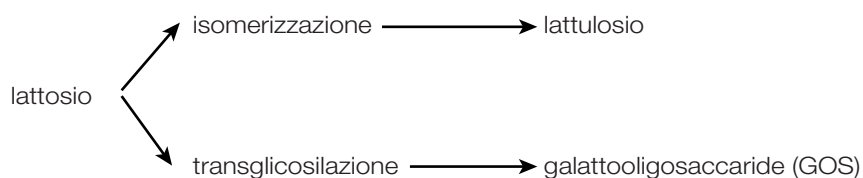
Il prodotto finale contiene il 95% di FOS a corta catena.

Il FOS a catena corta è completamente solubile e presenta un potere dolcificante che è circa il 30% di quello del saccarosio.

## Proprietà bifidogene di galattooligosaccaride (GOS) e di lattulosio

Nel corso degli ultimi anni, un crescente interesse è stato rivolto ad altri carboidrati non digeribili come nuovi integratori funzionali della dieta e una particolare attenzione è stata riservata a galattooligosaccaride (GOS) ed a lattulosio.

Sia GOS che lattulosio derivano dal lattosio secondo le seguenti vie:

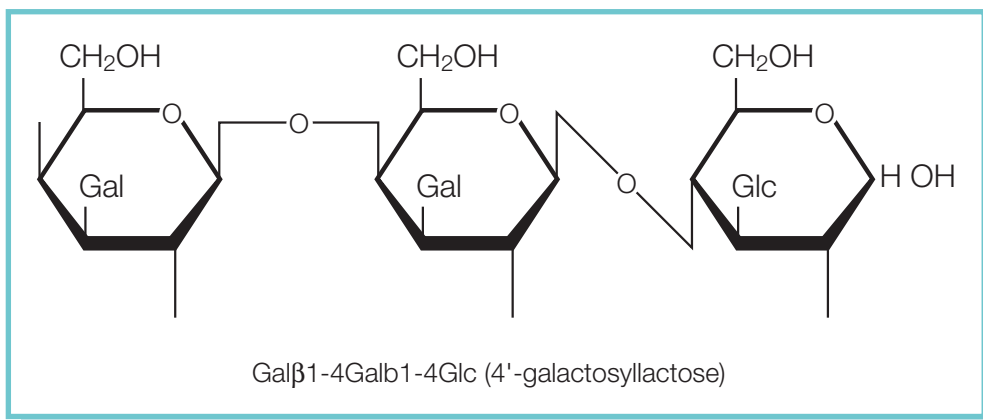


La produzione mondiale di GOS, lattulosio, fruttooligosaccaride FOS (derivato del saccarosio), isomaltooligosaccaridi e maltooligosaccaridi (derivati del malto) espressa in tonnellate per anno è quella riportata in **tabella 28**.

**TABELLA 28.** Produzione di oligosaccaridi con proprietà bifidogene.

Oligosaccaride non digeribile	Produzione in tonnellate per anno
Galattooligosaccaridi (GOS)	15.000
Lattulosio	20.000
Fruttooligosaccaridi	12.000
Isomaltooligosaccaridi	11.000
Maltooligosaccaridi	10.000
Ciclodestrine	4.000

Il processo industriale di produzione di galattooligosaccaridi (GOS), la cui struttura chimica è riportata in **figura 22**, consiste nell'indurre a carico del lattosio una reazione enzimatica con  $\beta$ -galattosidasi prodotta da *Bacillus circulans* o da *Cryptococcus laurentii* od ottenuta anche da *Aspergillus oryzae* o da *Streptococcus thermophilus*.

**FIGURA 22.** Struttura chimica di galattooligosaccaride GOS ottenuta da lattosio con  $\beta$ -galattosidasi da *Bacillus circulans*.


Con  $\beta$ -galattosidasi prodotta da *Bacillus circulans*, più del 55% del lattosio viene convertito in galattooligosaccaride (GOS). I galattooligosaccaridi sono stabili alle alte temperature, alla lunga conservazione a temperatura ambiente, all'ambiente acido sino a pH 4,0 e sono indigeribili. Il valore calorico è quello degli altri oligosaccaridi non digeribili vale a dire 30-50% in meno rispetto al saccarosio (per GOS è stato calcolato 1,73 Kcal g<sup>-1</sup>). L'attività bifidogena di 4'GOS è simile a quella di inulina e oligofruuttosio, e un riferimento specifico di utilizzazione da parte di vari batteri intestinali è ricavabile dalla **tabella 29**.

**TABELLA 29.** Utilizzazione di 4'GOS da parte di microrganismi intestinali.

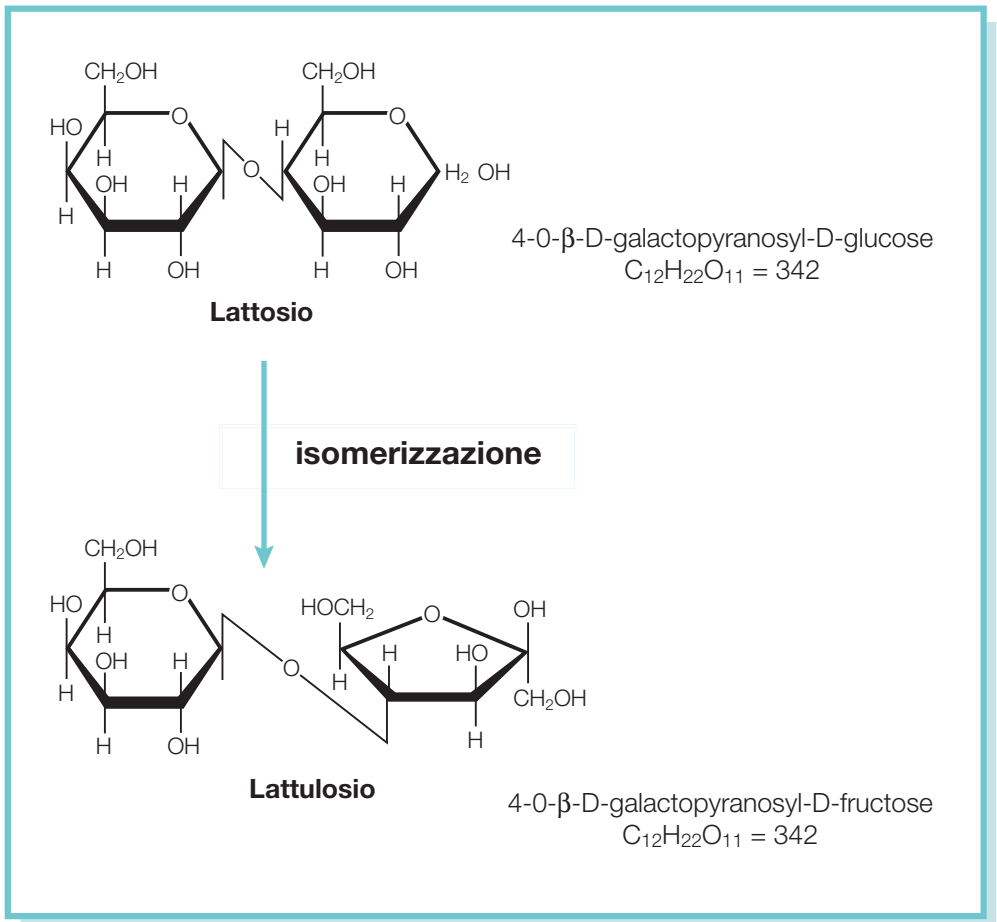
Microrganismo	4'-GOS
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	
<i>adolescentis</i>	++
<i>bifidum</i>	++
<i>breve</i>	++
<i>infantis</i>	++
<i>longum</i>	++
<b><i>Lactobacillus</i></b>	
<i>acidophilus</i>	+
<i>casei</i>	-
<i>gasseri</i>	-
<i>salivarius</i>	-
<b><i>Bacteroides</i></b>	
<i>distasonis</i>	++
<i>fragilis</i>	++
<i>ovatus</i>	-
<i>vulgatus</i>	++
<b><i>Clostridium</i></b>	
<i>butyricum</i>	-
<i>difficile</i>	-
<i>innocuum</i>	-
<i>perfringens</i>	-
<i>ramosum</i>	-
<b><i>Eubacterium</i></b>	
<i>aerofaciens</i>	-
<i>limosum</i>	-
<b><i>Peptostreptococcus</i></b>	
<i>anaerobius</i>	-
<i>prevotii</i>	-
<i>productus</i>	-
<b><i>Enterococcus</i></b>	
<i>faecalis</i>	-
<i>faecium</i>	-
<b><i>Escherichia coli</i></b>	-
<b><i>Veillonella alearescens</i></b>	-
<b><i>Fusobacterium varium</i></b>	-

L'effetto sulla microflora intestinale dell'ingestione di galattooligosaccaridi è chiaramente pro-bifidobatteri e questo in pieno accordo con la constatazione che, nelle feci di neonati allattati con latte materno, i bifidobatteri sono molto più abbondanti rispetto a quelli allattati con latte ricostituito. Questo si collega con il fatto che il 6'-GOS è un componente degli oligosaccaridi del latte umano.

La dose di galattooligosaccaride necessaria per ottenere un effetto bifidogeno è simile a quella degli altri oligosaccaridi non digeribili; si può infatti parlare di 2,5 grammi/giorno sia per 4'-GOS che per 6'-GOS, di 3 grammi di lattulosio, di 1 grammi/giorno di fruttooligosaccaridi (FOS) e di 2 grammi/giorno di xilooligosaccaridi.

Anche il lattulosio che si ottiene per isomerizzazione del lattosio e che ha la struttura chimica della **figura 23** è pure un buon composto prebiotico.

**FIGURA 23.** Struttura chimica del lattulosio ottenuto dal lattosio per isomerizzazione.



Il lattulosio è assente nel latte crudo, mentre nel latte sterilizzato UHT è presente con circa 70 mg/100 ml; il suo effetto è molto mirato e specifica è la sua utilizzazione da parte di alcuni microrganismi intestinali che sono riportati in **tabella 30**.

**TABELLA 30.** Utilizzazione del lattulosio da parte di microrganismi intestinali.

Microrganismo	Lattulosio
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (isolato da adulto)	++
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (isolato da lattante)	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	±
<i>Clostridium perfringens</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	±
<i>Escherichia coli</i>	±
<i>Salmonella spp.</i>	-
<i>Shigella sonnei</i>	-
<i>Proteus</i>	-
<i>Bacteroides</i>	-

Inoltre va sottolineato che recentemente ricercatori giapponesi hanno richiamato ancora l'attenzione sul fatto che la somministrazione giornaliera di 3-5 grammi di lattulosio risulta vantaggiosa, specialmente nelle persone adulte e di una certa età, nel favorire lo sviluppo di bifidobatteri e nel modificare, in senso positivo, la composizione delle feci con un maggior livello di acqua, di acido acetico, di acido lattico e con una diminuzione di acido isobutirrico, acido isovalerico, p-cresolo, scatolo, indolo, ureasi e triptofanasi.

## Latte-fermentati simbiotici

### Combinazione di probiotici e prebiotici

Un'ulteriore opportunità per ottenere latte-fermentati funzionali è rappresentata dalla possibilità di impiegare in combinazione probiotici e prebiotici e avere così un preparato simbiotico.

Microrganismi probiotici vivi possono trovare associazione con uno specifico prebiotico come, ad esempio, *Bifidobacterium lactis* e fruttooligosaccaride (FOS) (prebiotico bifidogeno) od anche *Bifidobacterium lactis* più *Lactobacillus acidophilus* e FOS.

La combinazione simbiotica rappresenta un valido integratore della dieta, suggerito in particolare per le persone con più di 55-60 anni d'età che frequentemente evidenziano un abbassamento della quota di bifidobatteri residenti e una maggiore suscettibilità alle infezioni.

È stato anche dimostrato che l'oligofruztosio, quando viene aggiunto al latte per essere fermentato con *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp, esercita un effetto positivo sulla sopravvivenza dei bifidobatteri durante la conservazione a 4°C. Non si nota invece una significativa influenza su *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*, che hanno una buona resistenza in ambiente acido, mentre l'effetto con 3-5% di oligofruztosio è netto per bifidobatteri, come evidenziato in **tabella 31**.

**TABELLA 31.** Sopravvivenza di *Bifidobacterium* spp. in latte-fermentato addizionato di oligofruztosio e conservato a 4°C. (Varga e coll.-122)

Giorni di conservazione	Controllo		Con aggiunta di oligofruztosio					
			1.0% (w/v)		3.0% (w/v)		5.0% (w/v)	
	Log cfu/ml*	%	Log cfu/ml*	%	Log cfu/ml*	%	Log cfu/ml*	%
0	5,50	100,0	5,58	100,0	5,65	100,0	5,84	100,0
7	5,39	77,6	5,48	79,4	5,57	83,2	5,79	89,1
14	5,24	55,0	5,35	58,9	5,47	66,1	5,73	77,6
21	5,01	32,4	5,16	38,0	5,35	50,1	5,66	66,1
28	4,52	10,5	4,77	15,5	5,20	35,5	5,59	56,2
35	4,28	6,0	4,59	10,2	5,07	26,3	5,50	45,7
42	4,04	3,5	4,39	6,5	4,91	18,2	5,38	34,7

La somministrazione di *Lactobacillus paracasei* in combinazione con maltodestrina diminuisce il numero di *Escherichia coli* in grado di colonizzare, in suini gnotobiotici, la mucosa della porzione del digiuno. La combinazione con FOS aumenta in modo significativo la conta di *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., anaerobi totali, con netta diminuzione però di *Clostridium* ed *Enterobacterium* nelle feci di suini non più a latte.

In suini gnotobiotici, la somministrazione di olio contenente acidi grassi polinsaturi (PUFA) determina un evidente aumento del numero di *Lactobacillus paracasei* aderente alla mucosa dell'ileo. Nel complesso, si può osservare che maltodestrina e acidi grassi polinsaturi possono essere impiegati per aumentare l'effetto di microrganismi probiotici nel piccolo intestino, mentre i fruttooligosaccaridi (FOS) esercitano con più evidenza lo stesso effetto a livello del grande intestino.

In forma riassuntiva il quadro che comprende le tipologie probiotici, prebiotici e simbiotici dei latte-fermentati funzionali maggiormente dotati rispetto alla base è riportato in **tabella 32**.

**TABELLA 32. Quadro riassuntivo di probiotici, prebiotici e simbiotici.**

Indicazioni	Definizione	Componenti
Probiotici	Latte-fermentati arricchiti con microrganismi utili per mantenere in equilibrio o ricostruire il normale microbiota del tratto intestinale	Batteri lattici Bifidobatteri Enterococchi Batteri sporigeni
Prebiotici	Ingredienti della dieta non digeribili che esercitano una azione selettiva stimolante dello sviluppo e/o delle attività di microrganismi utili di residenza intestinale	Fruttooligosaccaridi (FOS) Galattooligosaccaridi (GOS) Inulina Lattulosio
Sinbiotici	Combinazione di probiotici e prebiotici che si traduce in una somma di effetti benefici per il consumatore	Batteri lattici Bifidobatteri FOS, GOS, lattulosio Inulina

### Azioni complementari dovute all'associazione di differenti prebiotici

Dai vari richiami fatti, appare assodato che un'insufficiente fermentazione dovuta a scarso sviluppo di batteri lattici e bifidobatteri, può essere una potenziale causa di patologie intestinali localizzate nelle parti distali dell'intestino.

Il diverso sito anatomico in cui i prebiotici, quali carboidrati non digeribili, vengono fermentati dalla microflora intestinale è di notevole importanza per manifestare le loro potenzialità benefiche sulla salute. FOS (fruttooligosaccaridi) ed amido crudo di patate associati per formare, ad esempio, un ingrediente funzionale da aggiungere ai latte-fermentati, evidenziano una differente cinetica fermentativa, con conseguente effetto sulla composizione e sull'attività metabolica del microbiota residente nei differenti segmenti ceco-colon.

Sperimentazioni condotte con piccoli animali hanno recentemente riconfermato che FOS viene principalmente fermentato nel ceco, mentre l'amido trova per lo più localizzazione fermentativa nel colon. Interessanti sono, a questo riguardo, i dati della **tabella 33**, relativi ai metaboliti, con esclusione del lattato, accumulati, ove si vede che essi crescono sistematicamente in tutti i segmenti dell'intestino considerati dopo l'assunzione di amido, ma in particolare nel ceco con l'assunzione di FOS.

**TABELLA 33.** Metaboliti presenti in mmol in differenti segmenti dell'intestino di ratti con dieta senza e con prebiotici. (Le Blay e coll. - 129)

	Ceco			Proximal colon			Distal colon		
	Db*	Am	FOS	Db	Am	FOS	Db	Am	FOS
Lattato	<i>n.d.</i>	12,8a	345,7b	<i>n.d.</i>	10,5a	53,0b	<i>n.d.</i>	68,6b	29,2ab
Metaboliti totali	72,8a	342,7b	399,5b	36,1a	69,0b	45,2a	24,2a	110,3b	46,9a
Acetato	49,8a	253,1b	271,9b	26,5a	55,3b	29,5a	16,9a	90,3b	25,7a
Propionato	15,5a	42,4b	66,7c	6,5a	7,2a	8,5a	3,5a	10,7b	10,4b
Butirato	6,0a	44,5b	59,0b	2,6a	6,2a	7,0a	3,4a	8,9a	10,6a

\*Db = dieta basale; Am = amido; FOS = fruttooligosaccaride  
 Metaboliti totali = metaboliti totali (meno lattato)  
 n.d. = non determinato

## Attese dall'ingegneria genetica dei batteri lattici

Batteri lattici e bifidobatteri sono, come visto, i microrganismi probiotici per eccellenza e, tenendo come base le conoscenze scientifiche acquisite sul loro metabolismo, oggi si ritiene possibile l'ottenimento di ulteriori benefici dalla loro utilizzazione attraverso l'ingegneria metabolica.

Diversi possono essere i bersagli, e una rapida panoramica ci consente di richiamare l'attenzione sulla produzione di alanina, vitamine, zuccheri a basso contenuto di calorie, antiossidanti, polisaccaridi, nonché alla rimozione di zuccheri e alla inespressione di geni.

Le prime operazioni d'ingegneria metabolica sono state condotte su *Lactococcus lactis*, con l'intento di riscrivere il metabolismo dell'acido piruvico. In un primo tempo è stata dimostrata la deviazione della produzione di acido lattico L(+) da acido piruvico, con la produzione di acetolattato quale precursore di diacetile.

Successivamente si è passati a clonare in *Lactococcus lactis* il gene *alaD* da *Bacillus sphaericus* che codifica per alanina deidrogenasi, che in presenza di ammoniaca converte l'acido piruvico in L-alanina.

Quest'ultima via metabolica non è utilizzata per la preparazione di latte-fermentati con proprietà di base funzionali, mentre utilizzando la stessa tecnologia genetica risulta, ad esempio, interessante poter aumentare il tenore in acido folico, con lo sviluppo nell'intestino.

Nell'ultima edizione dei LARN (1996), si raccomanda che una persona adulta assuma con la dieta, 200 mg di folati (il doppio per le donne incinte) al giorno; un basso livello di acido folico si associa con un'elevata quantità di omocisteina nel sangue con un conseguente aumentato rischio di malattie coronariche.

I latte-fermentati rappresentano una buona fonte di acido folico, superiore al latte di partenza, perché i microrganismi della fermentazione sintetizzano acido folico e secernano nel substrato la quota non direttamente utilizzata. Nello yogurt si arriva sino ad un accumulo di 150 mg/l.

La biosintesi di folati domanda l'intervento di un sistema multi-enzimi, e quelli attivi in *Lactococcus lactis* sono stati recentemente ben studiati, per passare poi alla preparazione di ceppi in grado di esprimere un incremento nella biosintesi di folati con ridotta trattenuta intracellulare e quindi con un aumento della biodisponibilità dell'acido folico. Oggi, con i fermentati derivati dal latte, si copre in genere circa il 20% del fabbisogno giornaliero dell'uomo, mentre, con la messa a punto di nuovi ceppi, si ritiene possibile arrivare a coprirne il 100%. In molte diete, comprese quelle dei paesi industriali, è scarsa la presenza di riboflavina (vitamina B2) e di cobalamina (vitamina B12) e anche in questo caso i batteri lattici possono offrire una soluzione.

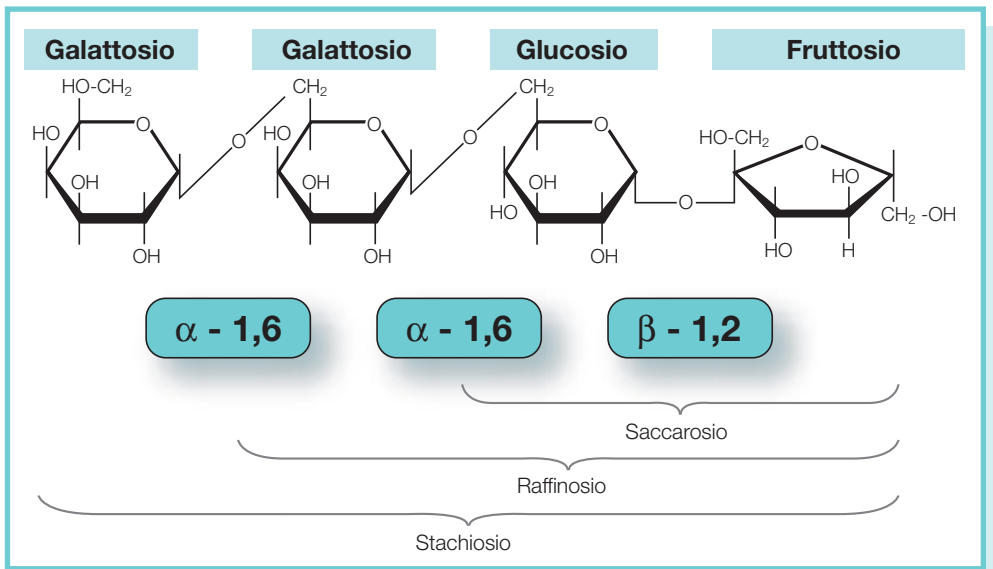
Il trasferimento in *Lactococcus lactis* del gene *ribA* usando il sistema NICE, consente di aumentare di tre volte la produzione di riboflavina.

Per quanto riguarda la produzione di vitamina B12, si può sottolineare che, dopo aver accertato la presenza di cinque geni interessati alla biosintesi di B12 da parte di *Lactobacillus reuteri*, vi sono buone prospettive per fare dell'ingegneria metabolica con *Lactococcus lactis* e con altre specie di batteri lattici.

Un altro importante aspetto è legato alla produzione di polisaccaridi considerati come prebiotici, immunostimolatori, antitumorali e ipocolesterolemizzanti. Approfonditi studi sviluppati negli anni recenti, hanno portato a nuove importanti conoscenze sulla genetica dei polisaccaridi, nonché sulla diversità biologica, sui meccanismi di produzione e sui modelli metabolici. Oggi possono essere formulate strategie di ingegneria metabolica finalizzata alla produzione e alla composizione di polisaccaridi di interesse salutistico.

Vi sono alimenti che contengono quantità elevate di oligosaccaridi come, ad esempio, raffinoso, che però non possono essere degradati perché nell'intestino umano non vi è disponibilità di  $\alpha$ -galattosidasi e, di conseguenza, risultano responsabili di disturbi intestinali. La soia ne è particolarmente ricca e un trattamento enzimatico o una prefermentazione possono essere applicati con successo, anche se i costi di produzione risultano alquanto elevati. L'impiego di batteri lattici come probiotici costruiti con un'elevata attività  $\alpha$ -galattosidasi, può rappresentare la soluzione più appropriata.

**FIGURA 24.** Struttura chimica di oligosaccaridi stachiosio, raffinoso e saccarosio. (Hugenholtz e coll. - 140)



Tra i batteri lattici, l'abilità a idrolizzare  $\alpha$ -galattosidi è stata accertata per *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* e oggi, nel contesto di un'ingegneria metabolica, il gene *melA* di *Lactobacillus plantarum* che codifica per  $\alpha$ -galattosidasi può essere trasferito in un microrganismo probiotico, per esercitare nell'intestino una significativa attività  $\alpha$ -galattosidasi degradativa del raffinoso. Con la produzione dello yogurt per intervento di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e di *Streptococcus thermophilus*, si accumula galattosio che, quando ingerito, viene ridotto a galattitolo che, talvolta, può determinare disordini fisiologici ed essere in relazione con la comparsa di cataratta. È stato accertato che in *Streptococcus thermophilus* Gal<sup>-</sup>, l'insieme di geni che presiedono alla metabolizzazione del galattosio è presente nello stesso modo come nei ceppi Gal<sup>+</sup>, solo che è silente per effetto di mutazioni puntiformi.

Queste possono retrocedere spontaneamente, ma la regressione può anche essere indotta con lo sviluppo prolungato in substrato con galattosio e i ceppi così caratterizzati possono trovare conveniente impiego per produrre yogurt senza galattosio.

Con i batteri lattici possono pure essere accumulati zuccheri a basso valore calorico come mannitolo, sorbitolo e tagatosio, utili per il controllo del peso corporeo e la riduzione dell'obesità.

Tali zuccheri possono sostituire il saccarosio e il fruttosio in quanto hanno un potere dolcificante equivalente e un gusto uguale; attraverso operazioni di ingegneria metabolica, la loro produzione può risultare molto consistente.

Un altro aspetto di forte interesse è legato alla possibilità di produrre in loco citochine con l'intervento di *Lactococcus lactis* ingegnerizzato.

Si conoscono malattie, quali coliti ulcerative, infiammazioni del largo intestino e la malattia di Crohn's, che si manifestano con una complessa immagine clinica, e di cui non è ancora conosciuta la causa, né la via per una prevenzione o una terapia efficace. La teoria oggi più accreditata considera che la causa sia legata ad un'anomala risposta immunitaria in connessione con la microflora intestinale.

Recentemente le ricerche sono state approfondite con animali da laboratorio Il-10-/-129Sv/Ev. L'assenza di produzione di citochine sembra giocare un ruolo di primaria importanza e lo sviluppo di *Lactococcus lactis*, geneticamente ingegnerizzato per ottenere sintesi e produzione "in loco" di citochine (interleuchine), in modo da indurre la formazione di una superficie mucosale ad effetto immunologico, è da ritenere una via concreta per il controllo di malattie infiammatorie intestinali.

Agli esempi indicati può essere aggiunto il fatto che, con una modifica genetica a carico di *Streptococcus mutans*, è possibile prevenire le carie ai denti.

La tecnologia del DNA ricombinante è stata impiegata per rendere silente il gene che codifica per lattato deidrogenasi in ceppi da isolamenti clinici di *Streptococcus mutans*. I ceppi ottenuti sono risultati geneticamente stabili, notevolmente meno cariogenici rispetto a quelli originali, con forte proprietà colonizzante e quindi di facile insediamento; essi possono prevenire (terapia di sostituzione), se utilizzati come probiotici, la fissazione, anche in forma di biofilm, di ceppi di *Streptococcus mutans* responsabile di carie.

Si prevede poi che le ricadute determinate dall'applicazione delle tecnologie della genomica potranno essere notevoli e numerose: con l'ampliamento delle conoscenze in merito al numero delle sequenze complete di genomi batterici, si apriranno nuovi settori di sviluppo.

Già oggi le attese dell'ingegneria genetica, o più specificatamente dell'ingegneria metabolica, si articola su un ventaglio di possibili interessanti

innovazioni applicative e tutto ciò nonostante che, tra i batteri lattici, si conosca solamente la sequenza completa del genoma di *Lactococcus lactis*.

## Riferimenti bibliografici

### La microflora intestinale

1. Moore W.E.C., Cato E.P., Holdeman L.V. (1978)

Some current concepts in intestinal bacteriology.

Amer. J. Clin. Nutr., 31, 533-542.

2. Tannock G.W. (2000)

Molecular assessment of the intestinal microflora.

Amer. J. Clin. Nutr., 73, s401-s414.

3. Drasar B.S., Barrow P.A. (1985)

Intestinal Microbiology.

Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd.

### Distribuzione dei microrganismi nel tratto gastrointestinale

4. Finegold S.M., Sutter V.L., Mathisen G.E. (1983)

Normal indigenous intestinal flora.

In: Hentges D.J. (ed.). Human intestinal microflora in health and diseases, Academic Press Inc, London, pp. 3-31.

5. Kleessen B., Bezirtzoglou E., Mättö J. (2000)

Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora.

Microb. Ecol. Health Dis., Suppl. 2, 53-63.

6. Swift S., Vaughan E.E., de Vos W.M. (2000)

Quorum sensing within the gut ecosystem.

Microb. Ecol. Health Dis., Suppl. 2, 81-92.

7. Justesen T., Haagen Nielsen O., Jacobsen I.E., Lave J., Norby S. (1984).

The normal cultivable microflora in upper jejunal fluid in healthy adults.

Scand. J. Gastroenterol., 19, 279-282.

8. Tannock G.W. (1995)

Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body.

Chpaman & Hall, London.

9. Langendijk P.S., Schut F., Jansen G.J.,

Raangs G.C., Kamphuis G.R., Wilkinson M.H.,

Welling G.W. (1995)

Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples.

Appl. Environ. Microbiol., 61, 3069-3075.

10. Franks A.H., Harmsen H.J.M., Raangs

G.C., Jansen G.I., Schut F., Welling G.W.

(1998)

Variation of bacterial population in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes.

Appl. Environ. Microbiol., 64, 3336-3345.

11. Marteau P., Pochart P., Dore J., Bera-

Maillet C., Bernalier A., Corthier G. (2001)

Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota.

Appl. Environ. Microbiol., 67, 4939-4942.

12. Sghir A., Gramet G., Suau A., Rochet V.,

Pochart P., Dore J. (2000)

Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization.

Appl. Environ. Microbiol., 66, 2263-2266.

13. Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Dore J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4799-4807.

14. Satokari R. (2001) Molecular identification and characterization of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. VTT, Technical Research Centre of Finland, Espoo 2001.

### Colonizzazione batterica nei primi anni di vita

15. Balmer S.E., Wharton B.A. (1989) Diet and faecal flora of the new born: breast milk and infant formula. *Arch. Disease in Child.*, 64, 1672-1677.

16. Harmsen H.J.M., Wibleboer-Veloo A.C.M., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.C., Wellings G.W. (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroent. Nutrit.*, 30, 61-67.

17. Martin F., Savage S.A.N., Parrett .M., Gramet G., Dore J., Edwards C.A. (2000) Investigation of bacterial colonisation of the colon in breast-fed infant using novel techniques. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 64A.

18. Edwards C.A., Parrett A.M. (2002) Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Brit. J. Nutr.*, 88, Suppl. 1, S11-S18.

19. Sprunt K., Leidy G., Redman W. (1980) Abnormal colonization of neonates in an ICU: conversion to normal colonization by pharyngeal implantation of alpha hemolytic streptococcus strain 215. *Ped. Res.*, 14, 308-313.

20. Sprunt K., Leidy G. (1988) The use of bacterial interference to prevent infection. *Can. J. Microbiol.*, 34, 332-338.

### Definizione di probiotici

21. Lilly D., Stillwell F. (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

22. O'Sullivan M., Thornton G., O'Sullivan G., Collins J. (1992) Probiotic bacteria: Myth or reality. *Trends Food Sci. Technol.*, 3, 309-314.

23. Parker R.B. (1974) Probiotics: the other half of the antibodies story. *Animal Nutr. Hith.*, 29, 4-8.

24. Fuller R.J. (1989) Probiotics in man and animals. *Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378.

25. Metchnikoff E. (1907) Prolongation of life. William Heinemann, London.

26. *Microrganismi al servizio della salute* (2000) 2. Metchnikoff E. Edizioni Mofin Alce (Novara)

27. Tissier H. (1906) Le traitement des infections intestinales par la methode de transformation de la flore bactérienne de l'intestine. *C.R. Soc. Biol.*, 60, 359-361.

28. Morelli L. (2002) Da Metchnikoff alla biologia molecolare. *Medic. Osped.*, 6, Suppl. 3, 13-16.

29. Yakult Central Institute for Microbiological Research (1998) *Lactobacillus casei* strain Shirota. Yakult Honsha Company Ltd., Tokyo.

30. Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J., Frank A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M.,

Rowland I. (1998)  
Functional food science and gastrointestinal physiology and function.  
Brit. J. Nutr., 80, 147-171.

31. Shortt C. (1999)  
The probiotic century: historical and current perspectives.  
Trends Food Sci. Techn., 10, 411-417.

32. Sakata S., Kitahara M., Sakamoto M., Hayashi H., Fukuyama M., Benno Y. (2002)  
Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*.  
Int. J. System. Evolut. Microbiol., 52, 1945-1951.

### Batteri lattici e bifidobatteri

33. Collins M.D., Rodrigues U., Aguirre M., Farrow J.A.E., Martinez-Murcia A., Phillips B.A., Williams A.M., Wallbanks S. (1991)  
Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA.  
FEMS Microbiol. Lett., 77, 5-12.

34. Schleifer K.H., Ludwig W. (1995)  
Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria.  
In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (Eds.) The Genera of Lactic Acid Bacteria: The Lactic Acid Bacteria. Vol. 2, Chapman & Hall, Glasgow, pp. 7-17.

35. Miyake T., Watanabe K., Watanabe T., Ayaizu H. (1998)  
Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rRNA sequence.  
Microbiol. Immunol., 42, 661-667.

36. Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. (1998)  
Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human faecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria.  
Appl. Environ. Microbiol., 64, 3854-3859.

37. Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., Akkermans-van-Vliet W.M., de Visser J.A.G.M., de Vos W.M. (2001)  
The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract.  
Microbiol. Ecol. Health Dis., 13, 129-134.

38. Vaughan E.E., Schut F., Heilig G.H.J., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Akkermans A.D.L. (2000)  
A molecular view of the intestinal ecosystem.  
Curr. Issues Intest. Microbiol., 1, 1-12.

39. Favier C., Vaughan E.E., de Vos W.M., Akkermans A.D.L. (2002)  
Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates.  
Appl. Environ. Microbiol., 68, 219-226.

40. Morelli L., Cesena C., de Haen C., Gozzini L. (1998)  
Taxonomic *Lactobacillus* composition of feces from human newborns during the first few days.  
Microb. Ecol., 35, 205-212.

41. Vaughan E.E., de Vries M.C., Zoetendal E.G., Kaouther Ben-Amor, Akkermans A.D.L., de Vos W.M. (2002)  
The intestinal LaBs.  
Antonie van Leeuwenhoek, 82, 341-352.

### Basi per la selezione di ceppi di microrganismi probiotici

42. Haenel H., Bending J. (1975)  
Intestinal flora in health and disease.  
Progr. Food Nutr. Sci., 1, 21-64.

43. Mitsuoka T. (1982)  
Recent trends in research on intestinal flora.  
Bifidobacteria Microflora, 1, 3-24.

44. Salminen S., Ouwehand A.C., Isolauri E. (1998)  
Clinical application of probiotic bacteria.  
Int. Dairy J., 8, 563-572.

45. Saarela M., Magensen G., Fonden R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000)  
Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.  
J. Biotech., 84, 197-215.

46. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. (2002)  
Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek, 82, 279-289.
47. Morelli L. (2000)  
In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Curr. Issues Intest. Microbiol., 2 (1), 59-67.
48. Goldin B. R. (1998)  
Health benefits of probiotic. Brit. J. Nutr., 80, suppl. 2, S203-S207.
49. Black F., Einarsson K., Lidbeck A., Orrhage K., Nord C.E. (1991)  
Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. Scand. J. Infect. Dis., 2, 247-254.
50. Sugita T., Togawa M. (1994)  
Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. Jpn. J. Pediatr., 47, 2755-2762.
51. Aso Y., Akaza H., Kotake T., Tsukamoto T., Imai K., Naito S. & BLP. Study Group (1995)  
Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. Eur. J. Urol., 27, 104-109.
52. Nagao F., Nakayama M., Muto T., Okumura K. (2000)  
Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2706-2708.
53. Pedone CA. et al (2000)  
Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. Int J Clin Practice 54(9), 568-571
54. Agarwal KN et al (2001)  
*Lactobacillus casei* in the control of acute diarrhoea. A pilot study. Indian Pediatrics 38:905-910
55. Pujol P et al (2000)  
The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. Sport Med Training and Rehab 9(3): 209-223
56. 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 Immunol. Med. Microbiol., 10, 55-64.
57. Felley C.P., Corthesy-Theulaz I., Rivero J.L., Sipponen P., Kaufmann M., Bauerfeind P., Wiesel P.H., Brassart D., Pfeifer A., Blum A.L., Michetti P. (2001)  
Favourable effect of an acidified milk (LC1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, 25-29.
58. Niedzielin K., Kordecki H., Birkenfeld B. (2001)  
A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patient with irritable bowel syndrome. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, 1143-1147.
59. Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A., Dias J.A., Casali L.G., Hoekstra H., Kolacek S., Massar K., Micetic-Turk D., Papadopoulou A., de Sousa J.S., Sandhu B., Szajewska H. Weizman Z. (2000)  
*Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. J. Ped. Gastroenterol. Nutr., 30, 54-60.
60. Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S., Arvilommi H. (1992)  
Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus* strain. Ped. Res., 32, 141-144.
61. Gupta P., Andrew H., Kirschner B.S., Guandalini S. (2000)  
Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary open-label study. J. Ped. Gastroenterol. Nutr., 31, 453-457.

62. Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri R. (2001)  
Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357: 1076-1079.
63. Shornikova A.V., Casas I., Mykkänen H., Salo E., Vesikari T. (1997)  
Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Ped. Infect. Dis. J.*, 16, 1103-1107.
64. Mattila-Sandholm T., Blums S., Collins J.K., Crittenden R., de Vos W., Dunne C., Fonden R., Grenov G., Isolauri E., Kiely B., Marteau P., Morelli L., Ouwehand A., Reniero R., Saarela M., Salminen S., Saxelin M., Schiffrin E., Shanahan F., Vaughan E., von Wright A. (1999)  
Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 393-399.
65. Brigidi P., Vitali B., Swennen E., Bazzocchi G., Matteuzzi D. (2001)  
Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome of functional diarrhea. *Res. Microbiol.*, 152, 735-741.
66. Isolauri E., Kaila M., Arvola T., Majamaa H., Rantala I., Virtanen E., Arvilommi H. (1993)  
Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Ped. Res.*, 33, 548-553.
67. Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H. (1994)  
Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344, 1046-1049.
68. Black F.T., Andersen P.L., Orskov J., Orskov F., Gaarslev K., Laulund S. (1989)  
Prophylactic efficacy of lactobacilli on travelers diarrhea. *Travel Med.*, 7, 333-335.
69. Bouvier M, Meance S, Bouley C, Berta JL, Grimaud JC. (2001)  
Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic transit time in healthy humans. *Bioscience Microflora*, 2001. Vol.20(2): 43-48.
70. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, Bouley C, Bommelaer G, Grimaud JC. (2002)  
*Bifidobacterium animalis* (strain DN-173 010) shortens the colonic transit time in healthy women: a double blind randomised controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16: 587-593.
71. Meance S, Cayuela C, Turchet P, Raimondi A, Lucas C, Antoine JM. (2001)  
A fermented milk with a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 13: 217-222.
72. Antoine JM, Meance S, Cayuela C, Turchet P, Raimondi A, Lucas C. (2000)  
Effect of a specific probiotic (*Bifidobacterium* sp. DN-173 010) on gut transit time in elderly. *Faseb J.*, 14(4): 160-171.
73. Michetti P, Dora G., Brassart D., Vouillanoz D. (1995)  
*Lactobacillus acidophilus* supernatant as an adjuvant in the therapy of *Helicobacter pylori* in human. *Gastroent.*, 108: 253-258.
74. Halpern G.M., Vruwink K.G., Van de Water J., Keen C.L., Gershwin M.E. (1991)  
Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *Int. J. Immun.*, 7, 205-210.
75. Kennedy M.J., Volt P.A. (1985)  
Ecology of *Candida albicans* gut colonisation: inhibition of *Candida* adhesion, colonisation and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infec. Immun.*, 49, 654-663.
76. Ducluzeau R., Bensaada M. (1982)  
Effect comparé de l'administration unique ou en continu de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif

de souris garotoxeniques.  
Ann. Microbiol., 133, 149-151.

77. Mattila-Sandholm T., Mattö J., Saarela M. (1999)  
Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora.  
Int. Dairy J., 9, 25-36.

### Modulazione della microflora intestinale ed effetti probiotici sulle patologie infettive

78. Michetti P., Dora G., Brassart D., Vouillanoz D. (1995)  
*Lactobacillus acidophilus* supernatant as an adjuvant in the therapy of Helicobacter pylori in human.  
Gastroenter., 108, 253-258.

79. Halpern G.M., Vruwink K.G., Van de Water J., Keen C.L., Gershwin M.E. (1991)  
Influence of long-term yoghurt consumption in young adults.  
Int. J. Immun., 7, 205-210.

80. Kennedy M.J., Volt P.A. (1985)  
Ecology of Candida albicans gut colonisation: inhibition of Candida adhesion, colonisation and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism.  
Infect. Immun., 49, 654-663.

81. Ducluzeau R., Bensaada M. (1982)  
Effect comparé de l'administration unique ou en continu de Saccharomyces boulardii sur l'établissement de diverses souches de Candida dans le tractus digestif de souris garotoxeniques.  
Ann. Microbiol., 133, 149-151.

82. Tomoda T., Nakano Y., Kageyama T. (1983)  
Variation of intestinal Candida of patients with leukaemia and the effect of *Lactobacillus* administration.  
Jap. J. Med. Mycol., 24, 356-358.

83. Fooks L.J., Gibson G.R. (2002)  
Probiotics as modulators of the gut flora.  
Brit. J. Nutr., 88, Suppl. 1, S39-S49.

84. Seegers J.F.M.L. (2002)  
Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects.  
Trends in Biotechnology, 20, 508-515.

### Composti prebiotici

85. Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995)  
Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.  
Journal of Nutrition, 125, 1401-1412.

86. Fuller R., Gibson G.R. (1997)  
Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics.  
Scand. J. Gastroent., 32 (Suppl), 28-31.

87. Kunz C., Udloff S. (1993)  
Biological functions of oligosaccharides in human milk.  
Acta Paediatr., 82, 903-912.

88. Cummings J.H., MacFarlane G.T., Englyst H.N. (2001)  
Prebiotic digestion and fermentation.  
Am. J. Clin. Nutr., 73, 415 S – 420 S.

### Inulina e oligofruztosio: origine e composizione chimica

89. Belval H. (1927)  
Industrie de l'inuline et du levulose.  
In Chimie et Industrie, pp. 1068-1069, Paris, France.

90. Roberfroid M., Gibson G.R., Delzenne N. (1993)  
The biochemistry of oligofruztose, a nondigestible fiber: an approach to calculate his calorie value.  
Nutr. Rev., 51, 137-146.

91. Boeckner L.S., Schnepf M.I., Tungland B.C. (2001)  
Inulin: a review of nutritional and health implication.  
Adv. Food Nutr. Res., 43, 1-63

### Proprietà bifidogene di Inulina e oligofruuttosio

92. Mutai M., Tanaka R. (1987)  
Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora.  
Bifid. Micro., 6, 33-41.

93. Gibson G.R., Roberfroid M.R. (1995)  
Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.  
J. Nutr., 125 (6), 1401-1412.

94. Scardovi V. (1986)  
*Bifidobacterium*.  
In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., vol. 2.

95. Modler H.W., McKellar R.C., Yaguchi M. (1990)  
Bifidobacteria and bifidogenic factors review.  
Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 23, 29-41.

96. Wang X., Gibson G.R. (1993)  
Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.  
J. Appl. Bact., 75, 373-380.

97. Deguchi Y., Morishita T., Mutai M. (1985)  
Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria.  
Agric. Biol. Chem., 49, 13-19.

98. Hartemink R., Nout M.J.R., Rombouts F.M. (1994)  
Effects of fructooligosaccharides on the human intestinal flora.  
Proc. Fourth Seminar on Inulin, Wageningen, The Netherlands, 79-89.

99. Hughes D.B., Hoover D.G. (1991)  
Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products.  
Food Technol., 45 (4), 74-83.

100. Karppinen S., Liukkonen K., Aura A.M., Forsell P., Poutanen K. (2000)  
In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria.  
J. Sci. Food Agric., 80, 1469-1476.

101. Kaplan H., Hutkins R.W. (2000)  
Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria.  
Appl. Environ. Microbiol., 66, 2682-2684.

102. Hopkins M.J., Cummings J.H., MacFarlane G.T. (1998)  
Interspecies differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources.  
J. Appl. Microbiol., 85, 381-386.

103. Sghir A., Chow J.M., Mackie R.I. (1998)  
Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate.  
J. Appl. Microbiol., 85, 769-777.

104. Roberfroid M.B. (2002)  
Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose.  
Brit. J. Nutr., 87, S139-S143.

105. Boeckner L.S., Schnepf M.I., Tungland B.C. (2001)  
Inulin: a review of nutritional and health implications.  
Adv. Food Nutr. Res., 43, 1-63.

106. Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L., Roberfroid M. (2001)  
Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence.  
Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 41 (5), 353-362.

107. Kolida S., Touhy K., Gibson G.R. (2002)  
Prebiotic effects of inulin and oligofructose.  
Brith. J. Nutr., 87, Suppl. 2, S193-S197.

108. Adamoli R., Rigon D. (2001)  
Inulina e oligofruuttosio nell'alimentazione umana –  
Cibi funzionali per promuovere la salute.  
Il Latte, 26, 72-81.

109. Roberfroid M.B. (1993)  
Dietary fiber inulin and oligofruuctose: a review  
comparing their physiological effects.  
Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 33 (2), 103-148.

110. Gibson G.R., Wang X. (1994)  
Bifidogenic properties of different types of  
fructooligosaccharides.  
Food Microbiol., 11, 491-498.

111. Cherbut C., Lecannu C.M.G. (2003)  
The prebiotic characteristics of  
fructooligosaccharide are necessary for  
reduction of TNBS-induced colitis in rats.  
J. Nutr., 133, 21-27.

### Proprietà bifidogene di galattooligosaccarie (GOS) e di lattulosio

112. Mozaffar Z., Nakanishi K., Matsuno R.,  
Kamikuro T. (1984)  
Purification and properties of  $\beta$ -galactosidases  
from *Bacillus circulans*.  
Agricultural Biological Chemistry, 48, 3053-  
3061.

113. Tanaka R., Takayama H., Morotomi M.,  
Kuroshima T., Ueyama S., Matsumoto K.,  
Kuroda A., Mutai M. (1983)  
Effects of administration of TOS and  
*Bifidobacterium breve* 4006 on the human  
fecal flora.  
Bifidobacteria and Microflora, 2, 17-24.

114. Yamashita K., Kobata A. (1974)  
Oligosaccharides of human milk. V. Isolation  
and characterization of a new trisaccharide,  
6'-galactosyllactose.  
Archives Biochem. Bioph., 161, 164-170.

115. Ito M., Deguchi Y., Miyamori A.,  
Matsumoto K., Kikuchi H., Matsumoto K.,  
Kobayashi Y., Yajima T., Kan T. (1990)  
Effects of administration of  
galactooligosaccharides on the human fecal  
microflora, stool weight and abdominal  
sensation.  
Microbial Ecology Health Disease, 3, 285-292.

116. Terada A., Hara H., Kataoka M., Mitsuoka  
T. (1992)  
Effect of lactulose on the composition and  
metabolic activity on the human fecal flora.  
Microbial Ecology Health Disease, 5, 43-50.

117. Tochikura T., Sakai K., Fujiyoshi T., Tachiki  
T., Kumagai H. (1986)  
p-Nitrophenyl glycoside-hydrolyzing activities in  
bifidobacteria and characterization of  $\beta$ -D-  
galactosidase of *Bifidobacterium longum*.  
Agricul. Biol. Chem., 50, 2279-2286.

118. Sako T., Matsumoto K., Tanaka R. (1999)  
Recent progress on research and application  
of non digestible galactooligosaccharides.  
Int. Dairy J., 9, 69-80.

119. Mizota T., Mori T., Tomoko Yaeshima,  
Yanagida T., Iwatsuki K., Ischibashi N., Tamura  
Y., Fukuwatari Y. (2002)  
Effects of low dosages of lactulose on the  
intestinal function of healthy adults.  
Milchw., 57 (6), 312-315.

### Combinazione di probiotici e prebiotici

120. Mitsuoka T. (1990)  
Bifidobacteria and their role in human health.  
J. Ind. Microbiol., 6, 268-270.

121. Kleesen B., Hartman L., Blaut (2001)  
Oligofruuctose and long chain inulin: influence  
on the gut microbial ecology of rats associated  
with a human fecal flora.  
Brit. J. Nutr., 86, 291-300.

122. Varga L., Szigeti J., Csengeri E. (2003)  
Effect of oligofructose on the microflora of an ABT-type fermented milk during refrigerated storage.  
Milchw., 58, 55-58.

123. Bomba A., Nemeova R., Gancarcikova S., Herich R., Guba P., Mudronova D. (2002)  
Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids.  
Brit. J. Nutr., 88, Suppl. 1, S95-S99.

### Azioni complementari dovute all'associazione di differenti prebiotici

124. Wang X., Gibson G.R. (1993)  
Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.  
J. Appl. Bacteriol., 75, 373-380.

125. Martin L.J.M., Dumon H.J.W., Champ M.M.J. (1998)  
Production of short-chain fatty acids from resistant starch in a pig model.  
J. Sci. Food Agric., 77, 71-80.

126. McBain A.J., MacFarlane G.T. (1997)  
Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system.  
Scand. J. Gastroenter., 32 (suppl. 222), 32-40.

127. Blottière H.M., Champ M., Hoebler C., Michel C., Cherbut C. (1999)  
Les acides gras à chaîne courte: de la production colique aux effets physiologiques gastro-intestinaux.  
Sci. Alim., 1, 269-290.

128. Wolloshi I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. (2001)  
Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer.  
Amer. J. Clin. Nutr., 73, 451S-455S.

129. Le Blay G.M., Blattière H.M., Cherbut C.J. (2003)  
Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved.  
J. Appl. Microbiol., 94, 312-320.

### Attese dall'ingegneria genetica dei batteri lattici

130. Hols P., Kleerebezem M., Schank A.N., Ferain T., Hugenholtz J., Delcour J., de Vos W.M. (1999)  
Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering.  
Nat. Biotechnol., 17, 588-592.

131. Brattstrom L. (1996)  
Vitamins as homocysteine-lowering agents.  
J. Nutr., 126 (4 Suppl.), 1276S-1280S.

132. Boushey C.J., Beresford A.A., Omenn G.S., Moltusky A.G. (1996)  
A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease.  
J. Amer. Med. Assoc., 274, 1049-1057.

133. Ames B.N. (1999)  
Micronutrient deficiencies cause DNA damage and cancer.  
Food Sc. Agric. Chem., 1, 1-15.

134. Smid E.J., Starrenburg M.J.C., Mierau I., Sybesma W., Hugenholtz J. (2001)  
Increase of folate levels in fermented foods.  
Innovations in Food Technology, Feb/Mar, 13-15.

135. Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995)  
Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.  
J. Nutr., 124, 1401-1412.

136. Hosono A., Lee J., Ametani A., Natsume M., Hirayama M., Adachi T., Kaminogawa S. (1997)  
Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from

- Bifidobacterium adolescentis* M101-4.  
Biosci. Biotech. Biochem., 61, 312-316.
137. Kitazawa H., Toba T., Itoh T., Kumano N., Adachi S., Yamaguchi T. (1991)  
Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian røpy sour milk "villi".  
Animal Sci. Technol., 62, 277-283.
138. Nakajima H., Hirota T., Toba T., Itoh T., Adachi S. (1992)  
Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495.  
Carbohydr. Res., 224, 245-253.
139. Ahrne S., Molin G. (1991)  
Spontaneous mutations changing the raffinose metabolism of *Lactobacillus plantarum*.  
Antonie van Leeuwenhoek, 60, 87-93.
140. Hugenholtz J., Sybesma W., Grod M.M., Wisselink W., Ladero V., Burgess K., van Sinderen D., Piard J.C., Eggink G., Smid E.J., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P., Klerebezem M. (2002)  
Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals.  
Antonie van Leeuwenhoek, 82, 217-235.
141. Hillman J.D. (2002)  
Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries.  
Antonie van Leeuwenhoek, 82, 361-366.
142. Hillman J.D., Brooks T., Michaels S.M., Harmon C.C., Snoep J.L. (2000)  
Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries.  
J. Den. Res., 68, 543-549.
143. Steidler L. (2002)  
In situ delivery of cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*.  
Antonie van Leeuwenhoek, 82, 823-831.
144. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A. (2001)  
The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 403.  
Genome Res., 11, 731-753.



## LATTE-FERMENTATI FUNZIONALI SPECIALI

Un ulteriore sviluppo del concetto di alimenti funzionali sono i latte-fermentati con funzioni speciali. Con l'ultima tipologia dei latte-fermentati funzionali si arriva alla preparazione di alimenti funzionali speciali, che vengono intesi come alimenti con nuove proprietà aggiuntive. Sono preparati per raggiungere precisi obiettivi salutistici e ciò sulla base di un'ampia documentazione scientifica a dimostrazione della validità delle scelte effettuate. Uno dei principali obiettivi che può essere perseguito, riguarda il contributo al controllo delle malattie cardiovascolari, e in questo contesto trova spazio il latte-fermentato, che vanta già sue proprietà salutistiche di base, con ulteriori attività dovute all'aggiunta di probiotici e di altre sostanze quali ad esempio mirtilli, licopeni o fitostanoli.

I sistemi che ne risultano sono complessi ma ben finalizzati e impongono un'appropriata presentazione informativa per il consumatore, in modo che possa essere guidato nelle sue scelte.

Un'ulteriore evoluzione dei latte-fermentati può essere l'aggiunta di microrganismi probiotici resi, con un particolare trattamento, gastro-resistenti e con una più elevata capacità di sopravvivenza durante la conservazione.

### Latte-fermentato con aggiunta di mirtilli

Un latte-fermentato funzionale acquista proprietà funzionali aggiuntive quando viene addizionato di mirtilli (*Vaccinium maerocarpon*) o di estratto di mirtilli; in esso alle proprietà funzionali di base dei probiotici si sommano quelle dei mirtilli, in una combinazione organolettica armonica che a sua volta si esalta in un'elevata funzionalità bioattiva utile.

La promozione dello stato di benessere che si può attribuire allo yogurt probiotico con mirtilli, trova spiegazioni, largamente documentate, sull'azione dei flavonoidi presenti nel mirtillo.

Ricerche cliniche ed epidemiologiche indicano che il consumo di flavonoidi alimentari può diminuire il rischio di sviluppo di malattie cardio e cerebrovascolari. Sperimentazioni *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che diversi sono i meccanismi con i quali i flavonoidi possono proteggere dalle malattie vascolari, ma la complessità strutturale con cui i flavonoidi sono presenti nei vegetali rende molto difficile individuare l'effetto di singoli flavonoidi e, proprio per il mirtillo, si considera positiva la presenza di una complessa miscela di acidi idrossisinnamici, antocianine, flavonoli e proantocianidine. Effetti sinergici dovuti alla miscela dei vari composti aumentano così il valore salutistico del mirtillo che è principalmente legato all'azione antiossidante, inibente l'ossidazione di LDL (low density lipoprotein), all'effetto di vasodilatazione e di contrasto con LDL colesterolo totale. Un'altra proprietà attribuibile al mirtillo è quella antibatterica. La maggior parte delle malattie infettive hanno inizio con l'adesione dei microrganismi patogeni alle cellule e alle superfici mucosali dell'ospite, mediante la produzione di adesine con specificità di attacco sui vari tipi di tessuti. Un caso evidente di adesione è dato dalle placche che si formano sui denti: esse sono biofilm formati da microrganismi in attività fisiologica, che si fissano ai denti attraverso una matrice intercellulare e che sono responsabili di carie e di altre malattie ai denti e alle gengive. La ricerca medica è sempre più attivamente interessata, a scopo terapeutico, allo studio dei fattori che possono determinare interferenza con il meccanismo dell'adesione batterica. Una nuova promettente strategia per il controllo delle infezioni deriva proprio dagli studi condotti con estratti di mirtillo, che hanno portato alla dimostrazione che l'inibizione dell'adesione dei microrganismi patogeni con essi riscontrata era dovuta alla presenza nelle bacche di mirtillo di composti non dializzabili ad alto peso molecolare. Un altro importante aspetto dell'attività del mirtillo, trova sviluppo con l'inibizione dell'adesione alla mucosa gastrica di *Helicobacter pylori*, microrganismo ritenuto il maggior responsabile di una varietà di malattie gastrointestinali compresa l'ulcera gastrica. Anche in questo caso, l'adesione alla mucosa gastrica costituisce un passaggio essenziale del processo infettivo. Recentemente ricercatori israeliani hanno riferito di risultati di studi riguardanti l'effetto inibitore dell'adesione specifica ("sialylactose specific adhesin") di *Helicobacter pylori* dovuto a composti presenti nelle bacche di mirtillo.

### Latte-fermentato con aggiunta di licopene

L'aggiunta di licopene al latte-fermentato viene in questa sede messa in relazione esclusivamente con la sua capacità nel contribuire alla protezione dell'ossidazione delle lipoproteine e delle cellule vascolari e quindi per il suo apporto alla diminuzione dei rischi di malattie cardiovascolari.

Il licopene è un carotenoide aciclico con undici doppi legami coniugati lineari.

L'interesse verso il licopene continua ad aumentare in relazione alla dimostrazione fornita dai risultati di studi epidemiologici e clinici dell'associazione tra elevati livelli di licopeni nel sangue e riduzione dell'incidenza di malattie cardiovascolari. In uno studio comparativo del 1997 tra popolazioni del Nord Europa, è stata evidenziata un'associazione tra bassi valori di licopene nel sangue ed elevata mortalità per malattie cardiovascolari; nello stesso anno, un'indagine condotta in Austria, ha dimostrato che licopene e  $\alpha$ -tocoferolo presenti in basse quantità nel sangue di persone anziane creano rischi elevati per l'insorgenza di malattie cerebrovascolari. Recentemente è stato osservato che ad ogni 10 nmol/l di aumento nel siero di licopene corrisponde un 4% in meno nel rischio di eventi cardiovascolari acuti. Gli alimenti ricchi di carotenoidi e di antiossidanti vengono associati con la diminuzione di questi rischi e il pomodoro, per il suo contenuto in  $\beta$ -carotene e licopene, oltre ad acido folico, vitamina C, vitamina E, flavonoidi e potassio rientra in questa categoria.

Nel mondo occidentale si calcola che l'8% del licopene consumato con la dieta sia apportato dal pomodoro. Il pomodoro rosso contiene 50 mg/kg di licopene contro i 5 mg/kg per il pomodoro giallo.

Con la lavorazione a caldo del pomodoro per la preparazione, ad esempio, della polpa di pomodoro (conserva), il licopene risulta più biodisponibile, il che si traduce in un più rapido accumulo nel plasma del consumatore. La maggior disponibilità è da mettere in relazione con diversi fattori, ma in particolare è da tener presente che il trattamento termico induce isomerizzazione del licopene dalla forma "trans" a quella "cis"; inoltre con l'operazione di omogeneizzazione si favorisce la sua liberazione dalla matrice naturale.

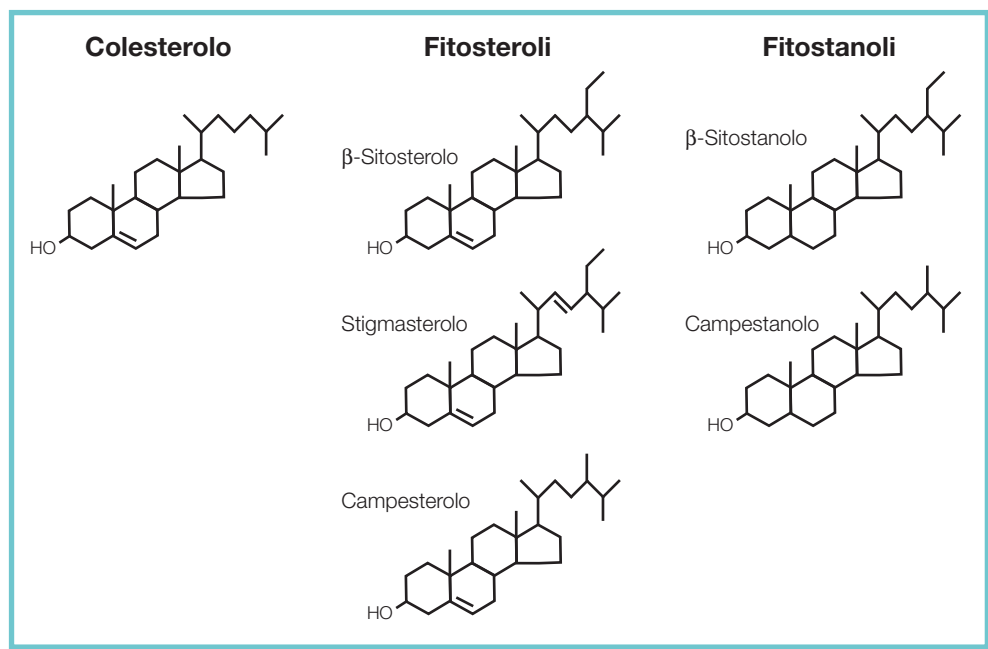
### Latte-fermentato con aggiunta di fitosteroli e fitostanoli

Fitosteroli e fitostanoli quali ingredienti alimentari hanno aumentato l'interesse per la preparazione di yogurt e latte fermentato con proprietà funzionali aggiuntive.

Il consumo di questi fitonutrienti naturali si traduce nella possibilità di contribuire ad abbassare il livello totale di LDL colesterolo in soggetti ipercolesterolemici e di esercitare attività di prevenzione dopo eventi cardiovascolari.

Nel mondo vegetale, la distribuzione di fitosteroli e fitostanoli è molto ampia ed è stato accertato che nelle piante sono presenti più di 40 steroli; in figura 25 viene riportata la struttura chimica di  $\beta$ -sitosterolo, stigmasterolo e campesterolo.

I fitostanoli formano, rispetto ai precedenti, una classe più ristretta e fra i più importanti, perché molto attivi, vengono segnalati  $\beta$ -sitostanolo e campestanolo.

**FIGURA 25.** Struttura chimica di colesterolo e dei più comuni fitosteroli e fitostanoli.

Il consumo di composti vegetali ad azione anticolesterolo non è certamente una nuova idea, in quanto le popolazioni dell'oriente, che seguono una dieta largamente vegetale, ne ingeriscono, a partire da tempi lontani, circa 250 mg/giorno. Recentemente sono stati introdotti alcuni preparati farmaceutici a base di fitosteroli e fitostanoli, proprio con l'intento di abbassare il livello di colesterolo in soggetti ipercolesterolemici.

Molta letteratura scientifica concorda nel sottolineare la capacità di fitosteroli e fitostanoli nell'indurre una riduzione dei rischi di malattie coronariche; proprio recentemente è stato precisato che il consumo di 2 g/die di steroli o stanoli può provocare la riduzione di circa il 25% dei rischi di malattie cardiache. Altri ricercatori suggeriscono di limitare a circa 1,6 g/die l'assunzione di sterolo esteri, in modo da avere ugualmente un buon effetto nella riduzione di LDL senza influenzare in modo significativo la concentrazione in carotenoidi del plasma. Tale dose, somministrata a persone ipercolesterolemiche, ha determinato dopo 30 giorni un abbassamento del 15% del livello LDL.

È stato evidenziato che i fitostanoli esercitano anche un effetto sulla solubilità del colesterolo micellare. Interessanti risultano gli studi condotti nel corso dell'ultimo decennio, con fitostanolo veicolato da margarina o da maionese, quali componenti di diete per soggetti ipercolesterolemici.

Ricerche condotte in Finlandia presso l'Università di Kuopio hanno dimostrato che, con poco più di 2 grammi (2,15-2,30) giorno di fitostanolo somministrato con margarina o maionese, si determina la riduzione del 10,6% del colesterolo totale del siero e del 13,7% di LDL-colesterolo. Contemporaneamente non varia in modo significativo la concentrazione ematica di HDL-colesterolo, sitostanolo, campestanolo,  $\beta$ -carotene e vitamine liposolubili.

La riduzione della concentrazione del colesterolo del plasma indica che i fitostanoli possono inibire non solamente l'assorbimento del colesterolo portato dalla dieta ma anche quello di origine biliare.

In conclusione, sono ormai numerose le dimostrazioni scientifiche che i sitostanoli esteri, incorporati nei grassi della dieta, e quindi addizionati ai latte-fermentati, possono essere suggeriti per il trattamento di ipercolesterolemie primarie e che comunque, da un punto di vista generale, possono essere indicati per ridurre il livello di colesterolo del plasma.

## Riferimenti bibliografici

### Latte-fermentato con aggiunta di mirtilli

- Milner A.J. (2002)  
Foods and health promotion: the case for cranberry.  
C.R. Food Sci. Nutr., 42 (Suppl.), 265-266.
- Sharon N., Ofek I. (2002)  
Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues.  
C.R. Food Sci. Nutr., 42 (Suppl.), 267-272.
- Ofek I., Dayle R.Y. (1994)  
Bacterial adhesion to cells and tissues.  
Chapman & Hall, 578 pp.
- Haffajec A.D., Socransky S.S. (2000)  
Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.  
In Socransky S.S., Haffajec A.D., Eds.  
Microbiology and Immunology of periodontal diseases, 201-223.
- Sharon N., Ofek I. (2001)  
Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti adhesion drugs for microbial diseases.  
Glycoconjugate J., 17, 651-656.
- Weiss E.I., Lev-Dor R., Sharon N., Ofek I. (2002)  
Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria.  
C.R. Food Sci. Nutr., 42 (Suppl.), 285-292.
- Dorell N., Crabtree J.E., Wren B.W. (1998)  
Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection.  
Trends. Microbiol., 6, 379-381.
- Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R. (1992)  
*Helicobacter pylori* virulence and genetic geography.  
Science, 284, 5418; 1328-1333.
- Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J. (1997)  
*Helicobacter pylori*.  
Clin. Microbiol. Rev., 10, 720-741.
- Lingwood C.A., Huesca M., Kuksis A. (1992)  
The glycerolipid receptor for *Helicobacter pylori* (and exoenzyme S) is phosphatidylethanolamine.  
Infect. Immun., 60, 2470-2474.
- Burger O., Ofek I., Tabak M., Weiss E., Sharon N., Neeman I. (2002)  
A high molecular weight constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to

- human gastric mucus.  
FEMS Immunol. Med. Microbiol., 22, 1-7.
12. Burger O., Weiss E., Sharon N., Tabak M., Neeman I., Ofek I. (2002)  
Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus of a high-molecular-weight constituent of cranberry juice.  
C.R., Food Sci. Nutr., 42 (Suppl.), 279-284.
13. Papas P.N., Bruschi C.A., Ceresia G.C. (1996)  
Cranberry juice in the treatment of urinary tract infection.  
Southwest Med., 47 (1), 17-20.
14. Gibson L., Pike L., Kilbourn J.P. (1991)  
Clinical study: Effectiveness of cranberry juice in preventing urinary tract infections in long-term care facility patients.  
J. Naturopathic. Med., 2 (1), 45-47.
15. Bate-Smith E.C. (1973)  
Hemianalysis of tannins: The concept of relative astringency.  
Phytochemistry, 12, 907-912.
16. Rogers J. (1991)  
Clinical: Pass the cranberry juice.  
Nurs. Times, 27 (87), 36-37.
17. Avorn J., Monane M., Gurwitz J.H., Glynn R.J., Chodnovskiy I., Lipsitz L.A. (1994)  
Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice.  
JAMA, 271 (1), 751-754.
18. Haverkorn M.J., Mandigers J. (1994)  
Reduction of bacteriuria and pyuria using cranberry juice.  
JAMA, 272 (8), 590.
19. Walker E.B., Barney D.P., Mickelsen J.N., Walton R.J., Mickelsen R.A. (1997)  
Cranberry concentrate: UTI prophylaxis.  
J. Fam. Pract., 45 (2), 167-168.
20. Dignam R.R., Ahmed M., Kelly K.G., Denman S.J., Zayon M., Kleban M. (1998)  
The effect of cranberry juice on urinary tract infection rates in a long-term care facility.  
Ann. Long-Term Care, 6 (5), 163-167.
21. Kontiokari T., Sundqvist K., Nuutinen M., Pokka T., Koskela M., Uhari M. (2001)  
Randomized trial of cranberry lingonberry juice and *Lactobacillus* GG drink for the prevention of urinary tract infections in women.  
Br. Med. J., 322, 1571-1573.
22. Ofek I., Beachey I. (1978)  
Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*.  
Infect. Immun., 22, 247.
23. Kallenius G., Mollby R., Svenson S.B., Winberg J., Lundblad A., Svensson S., Cedergren B. (1980)  
The pk antigen as receptor for the haemagglutinin of pyelonephritic *Escherichia coli*.  
FEMS Microbiol. Lett., 7, 297-302.
24. Howell A.B., Vorsa N., Der Marderosian A., Foo L.Y. (1998)  
Inhibition of the adherence of P-fimbriate *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberry.  
N. Engl. J. Med., 339 (15), 1085-1086.
25. Foo L.Y., Lu Y., Howell A.B., Vorsa N. (2000)  
The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriate *Escherichia coli* in vitro.  
Phytochemistry, 54, 173-181.
26. Foo L.Y., Lu Y., Howell A.B., Vorsa N. (2000)  
A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriate *Escherichia coli*.  
J. Nat. Prod. Chem., 63 (9), 1225-1228.
27. Howell A.B. (2002)  
Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health.  
C.R., Food Sci. Nutr., 42 (Suppl), 273-278.
28. Howell A.B., Vorsa N., der Marderosian A., Foo L.Y. (1998)  
Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries.  
N. Engl. J. Med., 339, 1085-1086.

29. Sobota A.E. (1984)  
Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infection.  
J. Urol., 131, 1013-1016.
30. Ofek J., Goldhar J., Zafriri D., Lis H., Odar R., Sharon N. (1991)  
Anti *Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices.  
N. Engl. J. Med., 324, 1599.
31. Bors W., Michel C., Stettmaier K. (1997)  
Antioxidant effect of flavonoids.  
BioFactors, 6, 399-402.
32. Wang P., Du C., Francis F. (1978)  
Isolation and characterization of polyphenolic compounds in cranberries.  
J. Food Sci., 43, 1402-1404.
33. Puski G., Francis F. (1967)  
Flavonol glycosides in cranberries.  
J. Food Sci., 32, 527-530.
34. Grenwald P., Milner J.A., Clifford C.K. (2000)  
Creating a new paradigm in nutrition research within the National Cancer Institute.  
J. Nutr., 130, 3103-3105.
35. Reed J. (2002)  
Cranberry, flavonoids, atherosclerosis and cardiovascular health.  
C.R., Food Sci. Nutr., 42, 301-316.
36. Mayne S.T. (1996)  
Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans.  
FASEB J., 10, 690-710.
37. Clinton S.K. (1998)  
Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease.  
Nutr. Rev., 56, 35-51.
38. Kristenson M., Zieden B., Kucinskiene Z., Elinder L.S., Bergdahl B., Elwing B., Abaravicius A., Razinkoviene L., Calkauskas H., Olsson A. (1997)  
Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: concomitant cross sectional study of men aged 50.  
Br. Med. J., 314, 629-633.
39. Schmidt R., Fazekas F., Hayn M., Schmidt H., Kapeller P., Roob G., Offenbacher H., Schumacher M., Eber B., Weinrauch V., Kostner G.M., Esterbauer H. (1997)  
Risk factors for microangiopathy-related cerebral damage in Austrian stroke prevention study.  
J. Neurol. Sci., 152, 15-21.
40. Arab L., Steck S. (2000)  
Lycopene and cardiovascular disease.  
AJCN, 71 (6), 1691S-95S.
41. Rissanen T., Voutilainen S., Nyyssonen K., Lakka T., Sivenius J., Salonen R., Kaplan G., Salonen J. (2001)  
Low serum lycopene concentration in associated with an excess incidence of acute coronary events and stroke: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study.  
Br. J. Nutr., 85, 1-7.
42. Rissanen T., Voutilainen S., Nyyssonen K., Salonen R., Salonen J. (2000)  
Low plasma lycopene concentration is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall.  
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 20 (12), 2677-2681.
43. Agarwal S., Rao A. (2000)  
Tomato lycopene and its role in human health and chronic disease.  
JAMC, 163 (6), 739-744.
44. Lee A., Thurmam D.I., Chopra M. (2000)  
Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases in the antioxidant activity of plasma.  
Free Rad. Biol. Med., 29 (10), 1051-1955.

### Latte-fermentato con aggiunta di licopene

45. Van Let Hof K., deBoer B., Tijburg L., Lucius B., Zijp I., West C., Hautvast J., Weststrate J. (2000)

Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *J. Nutr.*, 130, 1189-1196.

46. Willcox J.K., Catignani G.L., Lazarus S. (2003)

Tomatoes and cardiovascular health. *C.R. Food Sci. Nutr.*, 43, 1-18.

### Latte-fermentato con aggiunta di fitosteroli e fitostanoli

47. Hendriks H.F.J., Weststrate J.A., van Niet T., Meijer G.W. (1999)

Spreads enriched with three different levels of vegetables oil sterols and the degree of cholesterol lowering in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Europ. J. Clin. Nutr.*, 53, 319-327.

48. Jones P., Ntanios F., Racini Sarjaz M., Vanstone C. (1999)

Cholesterol-lowering efficacy of a sitostanol containing phytosterol mixture with a proident diet in hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 1144-1150.

49. Weststrate J., Meijer G. (1998)

Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total-and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52, 334-343.

50. Miettinen T., Vuoristo M., Nissinen M., Jarvinen H., Gylling H. (2000)

Serum, biliary, and fecal cholesterol and plant sterols in colectomized patients before and during consumption of stanol ester margarine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1095-1102.

51. Hicks K., Moreaus R. (2001)

Phytosterols and phytostanol: functional food cholesterol busters. *Food Technol.*, 55, 63-67.

52. Law M. (2000)

Plant sterol and stanol margarines and health. *Brit. Medic. J.*, 320, 861-864.

53. Ramjiganesh T., Roy S., Nicolosi R., Young T., McIntyre J., Fernandez M. (2000)

Corn husk oil lower plasma LDL cholesterol concentrations by decreasing cholesterol adsorption and altering hepatic cholesterol metabolism in guinea pigs. *J. Nutr. Biochem.*, 11, 358-366.

54. Hallikainen M.A., Sarkkinen E.S., Uusitupa I.J. (2000)

Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dose-dependent manner. *J. Nutr.*, 130, 767-776.

55. Vanhanen H.T., Blomqvist S., Ehnholm C., Hyvonen M., Jauhianen N., Torstila I., Miettinen T.A. (1993)

Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols hypercholesterolemic subjects with different apo E phenotype during dietary sitostanol treatment. *J. Lipid Res.*, 34, 1535-1544.

56. Hallikainen M.A., Uusitupa I.J. (1999)

Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 403-410.



## AREE DI RICADUTA DEGLI EFFETTI SALUTISTICI CON LATTE-FERMENTATI FUNZIONALI

L'individuazione di aree nell'ambito delle quali accertare le entità delle ricadute dei latte-fermentati funzionali come componenti della dieta in grado di offrire al consumatore un aiuto al mantenimento del suo stato di benessere, non può essere effettuata con nette delimitazioni e tanto meno con scomparti autonomi di definita entità.

È stato prima sottolineato che i latte-fermentati formano un gruppo di prodotti a tipologia diversa con proprietà funzionali salutistiche di base di carattere generale ma anche specifiche e che, nel tentativo di dare ordine all'esposizione, sono stati così suddivisi:

latte-fermentati con **proprietà funzionali di base considerate comuni**: yogurt (e vari tipi come gioddu, maryzum), kefir;

latte-fermentati con **proprietà funzionali di base considerate specifiche**: "yogurt" tibetano, latte fermentato biogenico, latte fermentato Yakult.

Con questi prodotti fermentati di base è stato poi individuato il gruppo dei **latte-fermentati con maggior proprietà funzionali** perché arricchiti:

- di microrganismi enterici probiotici;
- di composti prebiotici ad azione bifidogena;
- di probiotici-prebiotici in associazione per risultare prodotti simbiotici;
- di una opportuna associazione di probiotici e prebiotici, per manifestare in sequenza una più incisiva azione probiotica.

Si arriva poi al gruppo dei **latte-fermentati funzionali speciali** che, oltre ad avere le caratteristiche e le proprietà dei gruppi precedenti, presentano nuovi caratteri acquisiti con l'aggiunta di frutta o di estratti vegetali finalizzati al raggiungimento di specifici scopi salutistici.

Per tutti i latte-fermentati probiotici si può inoltre arrivare all'assunzione di un'altra importante proprietà, che è legata all'impiego di microrganismi probiotici gastro-protetti o a resistenza naturale, in modo che essi siano in grado di raggiungere in alto numero il tratto cieco-colon e che nello stesso tempo abbiano a dimostrare una elevata conservabilità nel tempo prima della loro ingestione.

Da tutto ciò, con riferimento ai latte-fermentati, emerge un ampio quadro applicativo nel quale si possono oggi inserire, per fornire un buon contributo al mantenimento e all'induzione del benessere dell'uomo, nuove opportunità per nuove strategie.

Si può in effetti operare per aree preferenziali specifiche di ricaduta degli effetti salutistici, e i sistemi che possono essere organizzati trovano, a titolo di esempio, l'articolazione che segue:

Tipo di sistema	Area di possibile ricaduta degli effetti salutistici	Tipo di preparazione	Principio attivo	Proprietà Particolari
Semplice	Inibizione di <i>Helicobacter pylori</i>	"Yogurt" tibetano	Metaboliti da lattobacilli	
Semplice	Azione ipotensiva	Latte-fermentato biogenico	Tripeptidi bioattivi da lattobacilli	
Complesso	Modulazione della microflora intestinale per il benessere generale	Yogurt ed altri latte-fermentati - probiotici - prebiotici - sinbiotici	Insieme di metaboliti da fermentazione	Con probiotici protetti o gastro-protetti o a resistenza naturale per superare le barriere gastriche e per acquisire conservabilità nel tempo.
Complesso	Controllo malattie cardiovascolari	Latte-fermentati funzionali più frutta od estratti vegetali ad azione specifica	Estratto di mirtillo licopene fitosteroli e fitosteroli	
Complesso	Inibizione dell'adesione di batteri patogeni al tratto alimentare ed urogenitale	Latte-fermentati funzionali più frutta od estratti vegetali	Estratto di mirtillo	

L'utilizzo dei latte-fermentati per prevenire i disordini intestinali e per ottenere effetti salutistici specifici, costituisce uno degli aspetti più interessanti della moderna nutrizione umana.

Dal consumo dello yogurt, quale latte-fermentato tradizionale, a quello dei vari tipi di latte-fermentati probiotici salutistici, vi è stato in questi ultimi decenni un intenso processo evolutivo, sia per quanto riguarda l'impostazione scientifica sia per le tecnologie di processo.

Le soluzioni che possono essere adottate sono, come visto, molteplici, le opportunità che si presentano sono varie e il settore nella dinamica che lo caratterizza è certamente in grado di ben finalizzare la messa a punto di specifici prodotti fermentati probiotici preparati per contribuire, come ingredienti della dieta, al mantenimento o all'instaurazione dello stato di benessere del consumatore.

Da tutto questo contesto emerge con sufficiente chiarezza l'importanza dell'alimento fermentato probiotico e, nello stesso tempo, polifunzionale, preparato con la garanzia della validità applicativa sulla scorta di un'ampia documentazione scientifica e in aderenza con chiare dimostrazioni epidemiologiche e cliniche della sua efficacia.

La presente panoramica è giunta così alla fine e la riproduzione di un manifesto Danone di tanti anni fa serve, per il tipo di pubblicità che evidenzia, a richiamare quanta strada sia stata percorsa per arrivare ai più recenti prodotti probiotici di Danone (*Lactobacillus casei* DN-114 001 - Actimel e *Bifidobacterium* DN-173 010 - Activia).







## NUOVI LATTE-FERMENTATI DI DANONE CON EFFETTI PROBIOTICI SPECIALI

### **ACTIMEL® e *Lactobacillus casei* IMUNITASS DN-114 001**

Actimel® è un latte-fermentato con le due tradizionali colture dello yogurt (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e con un probiotico specifico ed esclusivo di Danone, il *Lactobacillus casei* DN-114 001, noto come *Lactobacillus casei* IMUNITASS.

Il *Lactobacillus casei* IMUNITASS è stato isolato e scelto dai ricercatori di Danone Vitapole per le sue qualità probiotiche, tra cui la capacità di sopravvivenza dimostrata nel prodotto.

Il *Lactobacillus casei* IMUNITASS è un ceppo naturale di lattobacillo comunemente presente nel latte fermentato, nei vegetali fermentati e nell'intestino ed è contenuto in Actimel® a una concentrazione di  $10^8$  cfu/ml.

Appositi studi, sia sperimentali sia nell'uomo, hanno dimostrato che il *Lactobacillus casei* IMUNITASS è in grado di sopravvivere al passaggio gastroduodenale e di arrivare nell'intestino metabolicamente attivo e in quantità elevate.<sup>1,2,3</sup>

Uno studio ha inoltre dimostrato la presenza del *Lactobacillus casei* IMUNITASS nelle feci di soggetti in età pediatrica trattati con antibiotici betalattamici di vario tipo o con macrolidi, suggerendo il possibile uso di Actimel® anche in presenza di un trattamento antibiotico.<sup>4</sup>

## Effetti benefici di Actimel® sulle difese naturali dell'organismo

Una vasta gamma di studi condotti su Actimel® e sul *Lactobacillus casei* IMUNITASS in modelli sperimentali e sull'uomo, permettono di dimostrare i suoi effetti benefici in particolare sulle difese naturali del tratto gastrointestinale.

### Effetto sulla microflora intestinale

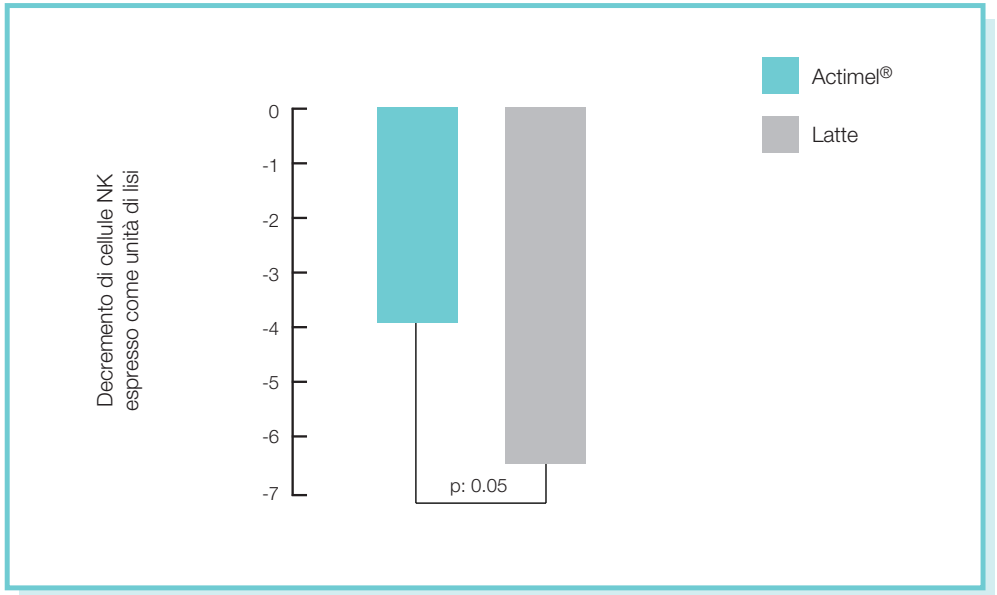
In uno studio condotto in bambini con età compresa tra 10 e 18 mesi che hanno assunto Actimel®, yogurt o latte gelificato (controllo), è stato rilevato un significativo incremento del numero di bambini (>50%) con una popolazione fecale di *Lactobacillus* superiore a  $6 \log^{10}$  cfu/g di feci nei bambini supplementati con *L. casei*.<sup>3</sup>

### Attività modulante il sistema immunitario

Gli effetti di Actimel® sono stati studiati sulle risposte immunitarie agli stress fisici (esercizi) e alle malattie infiammatorie.

È noto che un'attività fisica intensa provoca un indebolimento del sistema immunitario<sup>5</sup>, che può essere valutato misurando il numero e l'attività delle cellule NK.

In uno studio che ha coinvolto 25 atleti è stato riscontrato che l'assunzione di Actimel® determina un sensibile minor decremento della concentrazione di cellule NK due ore dopo il test da sforzo (**Figura 26**), a dimostrazione che *L. casei* IMUNITASS è in grado di modulare la risposta cellulare innata durante un intenso esercizio fisico.

**FIGURA 26.** Effetto di Actimel® sulla riduzione delle cellule NK indotta da intenso sforzo fisico

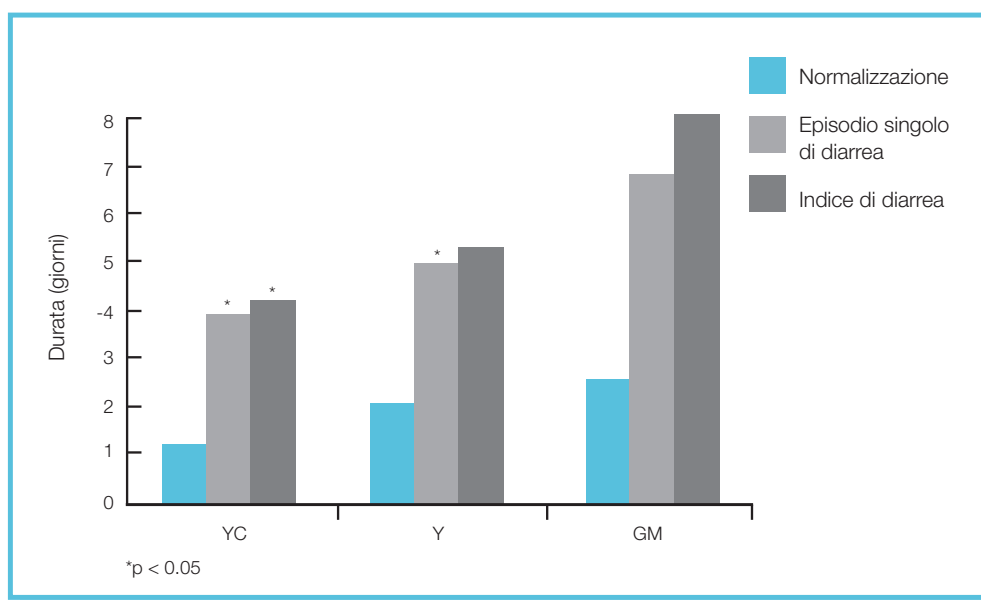
Nelle malattie infiammatorie quale il morbo di Crohn, la risposta immunitaria è associata a un aumento della citochina pro-infiammatoria TNF- $\alpha$ . I risultati di un apposito studio hanno dimostrato che l'assunzione di Actimel® determina una diminuzione della produzione di TNF- $\alpha$  da parte del tessuto infiammato nelle colture cellulari *ex vivo* prelevate da pazienti affetti dal morbo di Crohn, mettendo in evidenza l'interazione esistente tra *L. casei* IMUNITASS e l'epitelio; questa relazione potrebbe modulare il grado di attivazione delle cellule immunitarie intestinali durante gli episodi infiammatori.<sup>6</sup>

## Riduzione dell'incidenza e della durata degli episodi di diarrea nei bambini

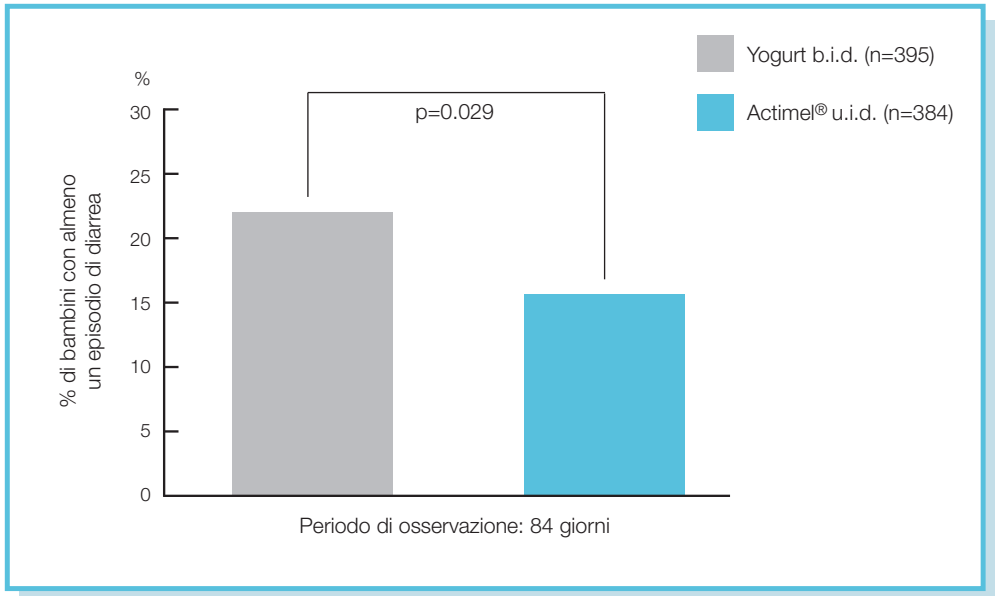
Differenti studi clinici hanno dimostrato i benefici del latte-fermentato con *L. casei* IMUNITASS (Actimel®) nei bambini affetti da diarrea di tipo infettivo.

In uno studio di confronto randomizzato tra yogurt, latte gelificato e Actimel®, quest'ultimo ha evidenziato la capacità di ridurre, significativamente e in misura maggiore dello yogurt, la durata degli episodi di diarrea in 287 bambini di età compresa tra 3 e 36 mesi (**Figura 27**).<sup>7</sup>

**FIGURA 27.** Effetto di Actimel® (YC) sulla durata degli episodi di diarrea e periodi di normalizzazione. Confronto con yogurt (Y) e latte gelificato (GM).



L'effetto benefico di Actimel® nei bambini è stato confermato da un altro studio, randomizzato e in doppio cieco, condotto su una vasta casistica (928 bambini di età compresa tra i 6 e i 24 mesi) che dimostra come Actimel® sia in grado di prevenire gli episodi di diarrea in modo significativamente superiore a quello dello yogurt.<sup>8</sup>

**FIGURA 28.** Effetto di Actimel® e dello yogurt sull'incidenza di diarrea acuta.

Un'ulteriore ricerca è stata effettuata per valutare gli effetti di Actimel® rispetto a quelli di un tradizionale latte indiano, il Dahi (latte fermentato di vacca o di bufala), sulla durata degli episodi di diarrea in bambini indiani con età compresa tra i 6 mesi e i 5 anni. Nei bambini trattati con Actimel®, il numero di episodi di diarrea è stato più limitato rispetto a quelli trattati con latte indiano Dahi.<sup>9</sup>

I risultati di questi studi clinici dimostrano quindi che nei bambini con diarrea acuta il latte fermentato con *L. casei* IMUNITASS (Actimel®) è efficace nel ridurre l'incidenza e la gravità della malattia.

### Profilo sicurezza di Actimel®

Actimel® un alimento probiotico adatto per tutta la famiglia, dall'età di 3 anni in poi, ed è inoltre indicato per le donne durante la gravidanza e l'allattamento, come parte di una dieta varia ed equilibrata.

Non sono stati riportati casi di reazioni allergiche indotte dall'assunzione di Actimel®; tuttavia, essendo un prodotto derivato dal latte, è controindicato nei soggetti allergici alle proteine del latte.

Sebbene alcuni lattobacilli siano stati associati ad infezioni, non sono mai stati riportati casi di infezione dovuti al ceppo *L. casei* IMUNITASS presente in Actimel®.

Durante i primi due anni di vendita del prodotto in Francia (1997-98) e nei primi

tre anni in Belgio (1996-98), gli unici rilievi pervenuti dai consumatori su episodi riguardanti la salute, sono stati quattordici casi di crampi addominali e diarrea. Questi rilievi sono stati associati agli effetti tipici che comporta l'assunzione di una bevanda fredda a stomaco vuoto. In nessun caso sono stati correlati al prodotto.

## Riferimenti bibliografici

1. Oozeer R., Goupil FeuFeuillerat N., Alpert CA. et al. (2002)  
*Lactobacillus casei* is able to survive and initiate new protein synthesis during transit in the digestive tract of human flora-associated mice.  
Appl. Environ. Microbiol. 68(7): 3570-3574.
2. Djouzi Z., Andrieux C., Degivry Marie-Christine, Bouley C., Szylit O. (1997)  
The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN-114 001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats.  
J. Nutrition 127(11): 2260-2266
3. Guérin-Dannan C., Chabanet C., Pedone C., Popot F., Vaissade P., Bouley C., Szylit O., Andrieux C. (1998)  
Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and jellied milk: influence on the intestinal microflora in healthy infants.  
J. Clin. Nutr. 67: 111-117
4. Morelli L. Salvini F., Agostoni C., Callegari ML., Zonenenschain D., Giovannini M. (2003)  
Tracking the fate of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain during a human trial in the presence of antibiotic treatment.  
Presented at 44th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research. Bilbao, Spain, 27-30 September 2003
5. Pujol P., Huguet J., Drobnic F., Banquells F., Ruiz O., Galilea P., Segarra N., Aguilera S., Burnat A., Mateos JA., Postaire E. (2000)  
The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. Sport Med, Training and Rehab 9 (3): 209-223
6. Borruel N., Carol M., Casellas F., Antolin M., de Lara F., Espin E., Naval J., Guarner F., Magdalena JR. (2002)  
Increased mucosal TNF-alpha production in Crohn's disease can be downregulated "ex vivo" by probiotic bacteria.  
Gut 51: 659-664
7. Pedone CA., Bernabeu AO., Postaire ER., Bouley CF., Reinert P. (1999)  
The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres.  
Int J Clin Practice 53 (3): 179-184
8. Pedone CA., Arnaud CC., Postaire ER., Bouley CF., Reinert P. (2000)  
Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea.  
Int. J. Clin. Practice. 54 (9): 568-571
9. Argawal KN., Bhasin SK, Faridi MMA., Mathur M., Gupta S. (2001)  
*Lactobacillus casei* in the control of acute diarrhoea. A pilot study.  
Indian Pediatrics 38: 905-910

## ACTIVIA® e *Bifidobacterium animalis* DN-173 010

Activia® è un latte-fermentato con i tradizionali ceppi dello yogurt (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) e con una coltura probiotica, il *Bifidobacterium animalis* DN-173 010.

Oltre agli effetti vantaggiosi dello yogurt, questo latte-fermentato presenta proprietà peculiari specifiche del *Bifidobacterium* utilizzato, che è presente in quantità elevate (circa  $10^8$  cfu/g), per l'intera shelf-life del prodotto

Diversi studi in volontari sani hanno dimostrato che il *Bifidobacterium* DN-173 010 è in grado di superare la barriera gastroduodenale e di arrivare nel colon vivo e in alte concentrazioni ( $>10^8$  cfu/g).<sup>1-4</sup>

Gli effetti, dimostrati clinicamente, indicano che il consumo regolare e giornaliero di Activia® ottimizza la funzionalità del tratto gastrointestinale, garantendo un transito più regolare e quindi un'efficace eliminazione dei residui organici dal corpo. Queste caratteristiche migliorano il benessere quotidiano e i benefici sulla salute a lungo termine.

### Effetti benefici di Activia® sul transito intestinale

Uno studio in doppio cieco, su adulti sani, di confronto tra Activia® e un latte fermentato identico in cui il bifidobatterio è stata ucciso mediante un trattamento termico, ha dimostrato che l'assunzione di *Bifidobacterium* DN-173 010 riduce significativamente la durata totale del transito nel colon e la durata del transito nel colon sigmoideo.

Il miglioramento della durata del transito è significativa sia negli uomini ( $p < 0,05$ ) sia nelle donne ( $p < 0,03$ ) (Tabella 34).<sup>5</sup>

**TABELLA 34.** Durata del transito nel colon prima (giorno 10) e dopo (giorno 21) assunzione di latte-fermentato con *Bifidobacterium* DN-173 010 (Activia®) o di latte di controllo.

	Activia® (n=36)			Controllo (n=36)		
	Giorno 10	Giorno 21	Delta (G21-G10)	Giorno 10	Giorno 21	Delta (G21-G10)
Durata totale del transito nel colon (ore)	33,0± 16,1	26,2± 14,7	-6,8 (-20,6%)	30,1± 16,4	30,6± 17,4	+0,5 (+1,6%)
Durata del transito nel colon sigmoideo (ore)	9,5± 8,6	5,8 ± 7,7	-3,7 (-38,9%)	7,9± 6,3	7,1± 8,7	-0,8 (-10,1%)

Anche un altro studio in doppio cieco, randomizzato e in crossover, di confronto tra l'efficacia di Activia® e di una preparazione fermentata identica ma priva di *Bifidobacterium* DN-173 010 (3x125 g), in cui sono state studiate 32 donne volontarie sane, ha dimostrato che l'assunzione di Activia® determina nelle donne una diminuzione della durata del transito nei vari segmenti del colon. Tale effetto è stato più pronunciato nelle donne con una durata del transito più lunga (Tabella 35).<sup>6</sup>

**TABELLA 35.** Durata totale del transito nel colon (DTC) prima e dopo assunzione di latte fermentato con *Bifidobacterium* DN-173 010 (Activia®) o di un prodotto di controllo (medie±DS).

Durata del transito (ore)	Popolazione totale (N=32)			Soggetti con DTC totale >40 ore (N= 21)		
	Basale	<i>Bifidus</i>	Controllo	Basale	<i>Bifidus</i>	Controllo
Colon destro	15,3 11,8	15,5 10,8	16,2 10,1	18,7 12,7	17,0 11,8	18,3 10,9
Colon sinistro	14,7 11,5	14,4 11,1	17,7 11,8	18,9 11,9	18,3 15,1	21,5 11,6
Colon sigmoideo	25,2 18,9	21,6 14,9	26,8 14,2	32,8 18,3	27,1 14,9	32,1 13,1
Totale	55,2 28,0	51,5 30,2	60,7 27,1	70,4 21,8	62,4 29,8	71,9 26,5

### Effetti benefici di Activia® sul transito intestinale di persone anziane

L'effetto sul transito intestinale di Activia® è stato studiato anche in soggetti anziani, una popolazione in cui la stipsi si presenta con frequenza particolarmente elevata, creando problemi di disagio sia fisico sia psicologico.

Due studi, il primo condotto in 100 soggetti anziani<sup>7</sup> e in secondo in 200<sup>8</sup>, hanno dimostrato che il consumo di Activia® riduce significativamente il tempo di transito intestinale sia nei soggetti con durata del transito media sia nei soggetti con durata del transito prolungata.

Questi studi hanno anche dimostrato che esiste una correlazione tra quantità di Activia® consumata e riduzione del tempo di transito: tre vasetti al giorno sono più efficaci di due e due vasetti sono più efficaci di uno.

Gli effetti di Activia® durano nel tempo: almeno due settimane, dopo il consumo di una porzione singola finale e almeno quattro settimane, dopo il consumo di una porzione doppia, segno di una colonizzazione efficace e persistente del *Bifidobacterium* DN-173 010.

## Conclusioni

Sulla base di tali evidenze cliniche è quindi possibile affermare che il *Bifidobacterium* DN-173 010 è un probiotico con un effetto funzionale benefico specifico ed efficace: il consumo regolare di latte-fermentato con questo probiotico (Activia®) riduce la durata del transito intestinale e può portare beneficio alle persone che soffrono di stipsi.

## Riferimenti bibliografici

1. Berrada N., Lemeland JF, Laroche G., Thouvenot P, Piaia. M. (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. J. Dairy Sci., 74: 409-413.
2. Pochart P., Marteau P., Bouhnik Y., Goderet I., Bourlioux P., Rambaud JC. (1992) Survival of *Bifidobacteria* ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an *in vivo* study using intestinal perfusion. Am. J. Clin. Nutr., 55: 78-80.
3. Pochart P., Marteau P., Bisetti N., Goderet I., Bourlioux P., Rambaud JC. (1990) Isolement des bifidobactéries dans les selles après ingestion prolongée de lait au bifidus. Med. Mal. Infect., 20: 75-78.
4. Duez H., Pelletier C., Cools S., Aissi E., Cayuela C., Gavini F., Bouquelet S., Neut C. and Mengaud J. (2000) A colony-immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces. J. Applied Microbiol., 88: 1019-27.
5. Bouvier M., Meance S., Bouley C., Berta JL., Grimaud JC. (2001) Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic transit time in healthy humans. Bioscience Microflora, 20(2): 43-48.
6. Marteau P., Cuillerier E., Meance S., Gerhardt MF, Myara A., Bouvier M., Bouley C., Bommelaer G., Grimaud JC. (2002) *Bifidobacterium animalis* (strain DN-173 010) shortens the colonic transit time in healthy women: a double blind randomised controlled study. Aliment. Pharmacol. Ther., 16: 587-593.
7. Meance S., Cayuela C., Turchet P., Raimondi A., Lucas C., Antoine JM. (2001) A fermented milk with a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. Microb. Ecol. Health Dis., 13: 217-222.
8. Antoine JM., Meance S., Cayuela C., Turchet P., Raimondi A., Lucas C. (2000) Effect of a specific probiotic (*Bifidobacterium* sp. DN-173 010) on gut transit time in elderly. Faseb J., 14(4): 160-171.

