

EXPERTISE: Valutazione del lievito lattico *Kluyveromyces marxianus fragilis* B03999 ai sensi delle linee guida del Min. della Salute Dic 2005 All 1.(doc.depositato presso il Ministero della Salute).

Le linee guida del Ministero della Salute affermano la necessità di indicare e caratterizzare i microrganismi probiotici a livello di specie e ceppo. In questo expertise viene descritta la caratterizzazione del Kluyveromyces B0399.

Dott. Enrico Bottona [1], Dott. Giancarlo Parisi [2], Dott. Maurizio Zilli [3].

VALUTAZIONE DEL LIEVITO LATTICO

Kluyveromyces marxianus fragilis B03999.

(cfr Linee guida dei probiotici . Min. della Salute Dic 2005 All 1)

[1] Responsabile S.O. di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva ULSS 5-Arignano(VI)

[2] Direttore UOC di Medicina Interna-Osp.S.M.del Prato ULSS2 Feltre(BL)

[3] Direttore SOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva Osp.S.M.della Misericordia-Udine[3]

1. Introduzione

Negli ultimi anni la letteratura scientifica ha riportato un sempre maggior numero di microrganismi considerati probiotici. Contemporaneamente ci sono sempre più frequenti segnalazioni sugli effetti benefici dell'utilizzo dei probiotici sulle funzioni immunologiche e digestive dell'uomo.

Nell'ottobre 2001 si è tenuta una riunione di esperti internazionali, sotto l'egida di FAO e WHO, al fine di valutare le evidenze scientifiche disponibili sulle proprietà, funzionalità, benefici e sicurezza dei probiotici. L'anno successivo, nell'aprile 2002, gli stessi esperti internazionali hanno stabilito in un documento i requisiti minimi necessari che definiva le caratteristiche di un probiotico ed hanno indicato le linee guida per la valutazione dello stesso.

Sulle indicazioni e suggerimenti espressi da questi due documenti il Ministero della Salute, nel dicembre 2005, ha emanato le "Linee guida di probiotici e prebiotici".

In esse il probiotico viene definito come: “ *Microrganismi vivi e vitali che conferiscono benefici alla salute dell’ospite quando consumati, in adeguate quantità, come parte di un alimento o di un integratore*”.

Il Ministero della Salute indica anche il processo per una corretta valutazione dei probiotici (allegato 1) e a questa indicazione si farà riferimento per valutare il ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999***.

2. Identificazione Tassonomica

Le linee guida del Ministero della Salute affermano la necessità di indicare e caratterizzare i microrganismi probiotici a livello di specie e ceppo. Lo stesso ceppo deve poi essere depositato in una collezione internazionale.

Il lievito ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** è stato identificato mediante procedure di isolamento, purificazione, conservazione, classificazione e identificazione basate sulle metodologie suggerite da J.P. van der Walt e D. Yarrow; l’identificazione sistematica è stata valutata in accordo con “Manual of Systematic Bacteriology” di Lodder, Kreger van Rij e Bergey.

Le procedure di identificazione e purificazione sono state eseguite dal DBVPG (Dipartimento di Biologia Botanica – settore microbiologia applicata – dell’Università di Perugia).

Dai ceppi selezionati (*Kluyveromyces fragilis*), è stato isolato (tipizzazione) il ceppo che fermentava il lattosio più efficacemente, sia in condizioni di aerobiosi che in anaerobiosi e che aveva la maggiore produzione di β -galattosidasi denominato: ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999***.

Tale ceppo è depositato presso BCCM-Belgium Coordinated Collections of Microorganism, Culture Collection Mycoteque de l’Université Catholique de Lovain (Belgium) con sigla B0399.

3. Caratterizzazione “funzionale” sia in vitro che nel modello animale.

I probiotici attualmente conosciuti possono appartenere alla categoria dei lattobacilli o dei lieviti.

Il ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** è un lievito : cellula di tipo EUCARIOTICO, dotata di nucleo contenente il materiale genetico, immobile, asporigena.

La tipizzazione e valutazione funzionale, sia in vitro che su modelli animali, sono state studiate in numerosi trials le cui caratteristiche sono riassunte nelle tabelle dell’allegato 2.

3.1 Attività enzimatica

Il *Kluyveromyces marxianus fragilis* B03999 fermenta gli zuccheri con produzione di acido lattico. Esso ha elevata attività lattasica dovuta alla produzione di β -galattosidasi (per tale motivo viene chiamato anche lievito lattico). L'attività enzimatica è di tipo **omofermentante**, vale a dire trasforma il glucosio solo in acido lattico, mentre l'azione eterofermentante porta alla produzione anche di anidride carbonica (CO₂), acido acetico ed alcol etilico. L'omofermentazione provoca quindi una minore produzione di gas e modifica più profondamente l'ambiente intestinale riducendone il pH.

L'attività omofermentante, inoltre, è vantaggiosa dal punto di vista energetico in quanto da una molecola di glucosio si ha la produzione di 2 molecole di ATP, rispetto a quella eterofermentante che produce 1 molecola di ATP soltanto.

L'effetto di questa caratteristica omofermentante è stato valutato nel test comparativo del trial n° 35.

3.2 Resistenza alla barriera gastrica

Un microrganismo probiotico deve essere in grado di resistere all'aggressione dei secreti gastrici e della bile al fine di pervenire vivo e vitale a livello intestinale.

Il ***Kluyveromyces marxianus fragilis* B03999** è in grado di resistere allo shock gastrico. Tale capacità è stata testata in vitro (prof P. Susmel dell'Università di Udine) mediante la misurazione della capacità fermentativa prima e dopo digestione gastrointestinale. La resistenza alla digestione è risultata eccellente rispetto ad prodotti commerciali simili e rispetto al lievito di birra. (trial n° 35).

La capacità di superamento della barriera gastrica è stata accertata anche con prove in vivo su maiale e cavalli testando la presenza di *Kluyveromyces* B0399 nelle feci (Tab 23.B5 trial n° 79) e la modifica del pH nel colon (trial n°51B e n° 57)

3.3 Attività sul modello animale

Fra i mammiferi superiori, il modello animale più utilizzato ai fini della sperimentazione è quello suino (vedi dati del Regno Unito della bibliografia). Il maiale è un animale che geneticamente è vicino alla specie umana e per tale somiglianza si stanno facendo notevoli sforzi in ambito scientifico al fine di apportare quelle modifiche genetiche che permettano il suo utilizzo nello xenotrapianto (trapianto di cellule, tessuti o organi tra specie animali differenti)

Anche il tipo di alimentazione (onnivora), l'anatomia e la fisiologia dell'apparato digerente sono simili a quelli umani. E' pertanto ipotizzabile che i risultati delle sperimentazioni alimentari condotte sui suini siano traslabili alla specie umana.

In tale ottica il ***Kluyveromyces marxianus fragilis* B03999** è stato somministrato a maialini svezzati (prof Paolo Bosi dell'Università di Bologna – trial n° 79).

La sperimentazione ha evidenziato come il probiotico modifichi il rapporto coliformi/lattobacilli a favore di questi ultimi. E' stato possibile, inoltre, recuperare il lievito B0399 ancora vivo e coltivabile

dall'intestino degli animali sacrificati in una proporzione variabile dal 37% al 47% a seconda del dosaggio somministrato; la differenza era significativa dal punto di vista statistico rispetto ai controlli. L'uso del probiotico nel cavallo ha acquisito popolarità negli ultimi anni come ingrediente alimentare per il controllo dei disturbi nutrizionali o dei patogeni intestinali. IL prof P. Susmel dell'Università di Udine ha valutato "Variazione del pH grande colon in cavalli dopo somministrazione di un probiotico lattico" (trial n° 57). Nell'intestino dei cavalli il lievito *Kluyveromyces marxianus fragilis B03999* è stato in grado di modificare il pH del grande colon in senso acidificante. Tale variazione dopo la somministrazione del probiotico riflette una variazione della fermentazione colica.

4. Valutazione di sicurezza; determinazione antibiotico-resistenza

I microrganismi probiotici devono essere sicuri e, in particolare, non devono essere portatori di antibiotico resistenza acquisita e/o trasmissibile.

Essi sono generalmente riconosciuti privi di effetti collaterali e il loro uso, di lunga durata e su ampia scala, rimane la miglior prova della loro sicurezza. Non sono state riscontrate proprietà patogene o di virulenza in lattobacilli, bifidobatteri o lattococchi.

In certe condizioni alcuni ceppi di lattobacilli sono stati associati ad eventi avversi come rari casi di batteriemia. Tuttavia, anche un recente studio epidemiologico non ha evidenziato un incremento di frequenza e di incidenza di batteriemia con l'aumento del consumo dei probiotici.

Il maggiore rischio nell'uso dei probiotici riguarda la possibile comparsa di antibiotico resistenza. Come per ogni batterio, essa è presente fra alcuni batteri lattici inclusi nei microrganismi probiotici. Questa caratteristica è trasmissibile mediante trasposizione di plasmidi. Per tale motivo le linee guida del Ministero della Salute raccomandano la determinazione del profilo delle antibiotico-resistenze per ogni singolo ceppo microbico utilizzato.

La resistenza agli antibiotici del *Kluyveromyces marxianus fragilis B03999* è stata valutata dal prof Ann Vaughan dell'Università di Perugia. I risultati hanno evidenziato un elevato grado di resistenza agli antibiotici testati.

Bisogna considerare, peraltro, che la resistenza del lievito lattico B03999 è dovuta alla differente organizzazione cellulare che esiste fra organismi procariotici (batteri) e quelli eucariotici (lieviti e cellule degli organismi superiori, uomo compreso).

Gli obiettivi dell'attività antibiotica sono le cellule procariotiche: in particolare peculiari strutture della cellula: il peptidoclicano della parete e gli enzimi coinvolti nella sua sintesi. Tali strutture non hanno eguali in altri tipi cellulari. Altri obiettivi degli antibiotici sono i ribosomi o enzimi, come la RNA polimerasi, presenti anche nelle cellule eucariotiche. In queste ultime, peraltro, gli enzimi sono differenti sia dal punto di vista morfologico come delle sequenze genetiche da cui sono codificati. Queste sequenze sono presenti su geni costitutivi e non sono acquisiti o portati da plasmidi o altri elementi trasportabili.

E' necessario sottolineare che le cellule eucariotiche dei lieviti non sono coinvolte nelle infezioni fagiche. I batteriofagi sono infatti in grado di trasportare tratti di DNA da un procarione ad un altro. Può accadere che nei frammenti genetici trasferiti sono contenuti geni per l'antibiotico resistenza che quindi si diffonde nella popolazione batterica. Questo problema, peraltro, non coinvolge le cellule dei lieviti. La antibiotico resistenza di *Kluyveromyces marxianus fragilis B03999* è quindi una resistenza naturale e non acquisita (vedi approvazioni dalla Comm Europea , dal FDA (USA) e dalla CFIA (Canada).

5. Dimostrazione di una attività funzionale nell'uomo

Numerosi microrganismi probiotici sono utilizzati negli alimenti, generalmente derivati dal latte fermentato. Alcuni di questi sono stati studiati per il loro uso nella patologia clinica umana. I meccanismi fondamentali mediante i quali i microrganismi producono i loro effetti benefici sono rappresentati dalla modulazione (transitoria) della microflora intestinale dell'ospite e dalla capacità di interagire con il sistema immune direttamente o attraverso la microflora autoctona. Gli effetti dei probiotici nella patologia umana, confermati e consolidati con studi clinici, sono:

- Prevenzione e/o riduzione della durata della diarrea da rotavirus o associata agli antibiotici come la riduzione dei disturbi da intolleranza al lattosio
- Riduzione della concentrazione dei metabolici putrefattivi dell'intestino
- Effetti benefici sulle alterazioni microbiche, infiammazione e altri disturbi in rapporto a: malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale, infezione da Helicobacter Pylori o "overgrowth" batterico.
- Normalizzazione del transito e della consistenza fecale in soggetti affetti da stipsi cronica o da colon irritabile.
- Prevenzione e normalizzazione delle allergie nelle malattie atopiche dei bambini.
- Prevenzione delle infezioni del distretto respiratorio o altre malattie come le infezioni del tratto genito-urinario.

Nello specifico molti dei disturbi in corso di sindrome dell'intestino irritabile quali gonfiore, "discomfort" addominale, diarrea, alvo alterno, sono attribuibili ad alterazioni della flora batterica intestinale. A conferma di ciò sono alcune conoscenze note da anni: una percentuale variabile dal 7 al 31% delle enterite acute infettive cronicizza in colon irritabile; nei pazienti con IBS vi è un'aumentata escrezione di idrogeno e metano per inadeguato aumento dei processi di fermentazione; autori italiani (Barbara et al. 2004) hanno documentato uno stato icroinfiammatorio della mucosa colica riferibile ad alterazione della flora intestinale.

Alcuni studi clinici condotti con probiotici hanno evidenziato, anche se in modo non univoco, un reale vantaggio del loro utilizzo mediante un'azione di riequilibrio della flora batterica intestinale.

La maggior parte di questi effetti benefici sono stati dimostrati con trials clinici che hanno utilizzato batteri probiotici. L'unico lievito utilizzato come probiotico, fino ad ora, è stato il Saccharomices

Boulardii. Esso è stato utilizzato nella prevenzione e nel trattamento di svariate forme di diarrea, tra cui quella dovuta ad infezione da *Clostridium difficile*. Nuove prospettive di ricerca si stanno aprendo nella terapia di mantenimento delle malattie infiammatorie croniche intestinali. IL *S. Boulardii* migliora anche i disturbi e la diarrea legata alla terapia eradicante per l'infezione da *Helicobacter Pylori*, anche se non influenza significativamente il tasso di eradicazione.

Il lievito ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** è comparabile, dal punto di vista microbiologico, al *Saccharomices Boulardii* e studi sperimentali, fra cui molti approvati dalla Commissione europea e dall'FDA americana, hanno chiaramente dimostrato nell'animale la sua attività probiotica. (vedi allegato 2).

Ciò conferma l'utilità probiotica del *Kluyveromyces* già nota da sempre nell'alimentazione in campo umano soprattutto come componente base del Kefir .

L'osservazione poi di alcune attività funzionali specifiche hanno dato luogo ad un crescente interesse dei consumatori e delle aziende farmaceutiche ed alimentari, per cui sono state condotte alcune sperimentazioni preliminari in vivo che ne stanno confermando l'utilità nell'ambito della patologia umana.

Il *Kluyveromyces B0399* è stato impiegato nella dermatite atopica e nei 10 pazienti trattati si è avuta la normalizzazione delle Ig E totali. (trial n° 75)

In ambito gastroenterologico è stato utilizzato, in associazione a *Saccharomices Cerevisiae* per il suo apporto di vitamine del gruppo B (l'attività probiotica del *S.C.* è trascurabile in quanto viene distrutto già a livello gastrico) a differenti dosaggi, in 45 pazienti affetti da colon irritabile. I risultati sono stati incoraggianti con miglioramento di molti dei disturbi correlati alla sindrome dell'intestino irritabile quali distensione addominale, regolarizzazione della frequenza dell'alvo e della consistenza fecale. (trial n° 16)

Questo studio, che conferma le i risultati delle prove condotte sugli animali, è da considerare preliminare e comunque apre la possibilità di intraprendere altri studi su casistiche più ampie e con disegni diversi, aventi come obiettivo la conferma ulteriore dell'utilità dell'impiego del lievito lattico ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** nella sindrome del colon irritabile.

Aperte rimangono anche le possibilità d'impiego descritte all'inizio del paragrafo, in cui i microrganismi probiotici hanno dimostrato la loro efficacia.

Per quanto riguarda il dosaggio, visti i dati e le condizioni alimentari approvati dalla Commissione Europea sui maialetti, risultano a ns avviso utili e coerenti le considerazioni fatte dal dr. Paolo Valles e dalla dr.ssa A. Lugano (allegato 2 elenco prove e studi su umano) secondo cui nella dieta giornaliera di un individuo di 70-80 kg è consigliabile e sufficiente introdurre circa 10 milioni di cellule vive di *Kluyveromyces 0399*.

Tale dosaggio , vista la scheda di formulazione prodotta da Valles e Lugano, corrisponde sostanzialmente anche con quello presente nel probiotico Bioval Plus utilizzato per la prova preliminare in vivo n.16 citata.

6. Conclusioni

Il ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** e' un lievito isolato da ceppi selezionati di *Kluyveromyces Fragilis* che fermenta il lattosio più efficacemente degli altri e che ha la maggiore produzione di Beta-galattosidasi.

La sua attività enzimatica è di tipo omofermentante, cioè trasforma il glucosio soltanto in acido lattico. Ciò è vantaggioso dal punto di vista energetico in quanto da una molecola di glucosio si ha la produzione di due molecole di ATP anziché una, come avviene in quella eterofermentante.

Numerose ed accertate dalla EFSA (EC) , dal FDA (USA) e dalla CFIA (Canada) sono le verifiche della sua sicurezza e delle sue proprietà probiotiche in campo animale, soprattutto nei suinetti .

Il ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** resiste all'aggressione dell'acidità gastrica come dimostrato in vitro e in vitro e raggiunge, vivo e vitale, l'intestino. A tale livello modifica il rapporto coliformi/lattobacilli a favore di questi ultimi. Inoltre, sempre nell'animale, modifica il Ph del colon in senso acidificante riflettendo, in tal modo, una variazione della fermentazione colica. E' stato inoltre dimostrato che presenta un elevato grado di antibiotico-resistenza di tipo naturale e non acquisita, garantendo sicurezza ed assenza di effetti collaterali.

Analizzando i dati preliminari nell'uomo, il ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** ha mostrato di normalizzare le IgE totali in un piccolo gruppo di soggetti affetti da dermatite atopica e di migliorare alcuni disturbi intestinali tipici in un altro gruppo di soggetti affetti da s. dell'intestino irritabile, quali meteorismo, alvo alterno, discomfort intestinale, diarrea.

Si può pertanto concludere che Il lievito lattico ***Kluyveromyces marxianus fragilis B03999*** e' un lievito che presenta attività probiotica e soddisfa pienamente le linee guida che il Ministero della Salute ha tracciato in termini di definizione di probiotico. Questo lievito possiede molte caratteristiche che ne fanno ipotizzare un suo uso anche in campi specifici della patologia umana, prevalentemente nella patologia dell'intestino (diarrea da Rotavirus, sindrome dell'intestino irritabile, normalizzazione del transito intestinale in soggetti con stipsi cronica). Esiste inoltre la possibilità di un suo impiego nella prevenzione e normalizzazione delle allergie nelle malattie atopiche dei bambini e nella prevenzione delle infezioni del tratto genito-urinario (cfr prova in vitro n° 96).

Addi_ 2 ottobre 2008

Dott. Enrico Bottona
Responsabile S.O. di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva
ULSS 5-Arignano(VI)

Dott.Giancarlo Parisi
Direttore UOC di Medicina Interna-Osp.S.M.del Prato
ULSS2 Feltre(BL)

Dott.Maurizio Zilli

Direttore SOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva
Osp.S.M.della Misericordia-Udine

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- FAO/WHO EXPERT CONSULTATION: "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria" Cordoba (Argentina) 2001.
(http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/)
- FAO/WHO EXPERT CONSULTATION: "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food" London Ontario (Canada) 2002. (http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/)
- AFFSA. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. 2005
(www.afssa.fr)
- Ministero della Salute: Linee guida probiotici e prebiotici. Dicembre 2005
(<http://www.ministerosalute.it/alimenti/nutrizione/linee>)
- Goossens D, Jonkers D, Stobberingh E, van den Bogaard A, Russel M, Stockbrügger R Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. Scand J Gastroenterol Suppl. 2003;(239):15-23.
- [de Vrese M](#), [Schrezenmeir J](#).
Probiotics, prebiotics, and synbiotics.
Adv Biochem Eng Biotechnol. 2008;111:1-66.