

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**Studio del potenziale prebiotico degli alimenti con un modello intestinale in vitro
e analisi multi-omiche**

Tesi in
Microbiologia delle fermentazioni

Relatore:

Prof. Andrea Gianotti

Correlatore:

Dott. Lorenzo Nissen

Candidata:

Alice Canora

Matricola N° 886022

Anno Accademico 2019/2020

Sessione unica

A papà Jhonny

Sommario

1. Introduzione	1
1.1 Il microbiota intestinale umano	1
1.2 Relazione tra dieta e microbiota intestinale umano	6
1.3 I probiotici	7
1.3.1 Modulazione delle funzioni immunitarie	10
1.3.2 Produzione di acidi organici	11
1.3.3 Interazione con il microbiota intestinale	12
1.3.4 Interazioni probiotico-ospite	13
1.3.5 Miglioramento della funzione barriera	13
1.3.6 Produzione di molecole con effetti locali	14
1.3.7 Produzione di enzimi	14
1.4 I prebiotici	15
1.4.1 Difesa contro gli agenti patogeni	19
1.4.2 Modulazione immunitaria	19
1.4.3 Maggiore assorbimento di minerali	20
1.4.4 Miglioramento della funzione intestinale	20
1.4.5 Effetti metabolici	21
1.4.6 Effetto sulla sazietà	21
1.5 Interazione tra i componenti degli alimenti ed il microbiota intestinale	22
1.5.1 I carboidrati ed il microbiota intestinale	22
1.5.2 Le proteine ed il microbiota intestinale	23
1.5.3 I grassi ed il microbiota intestinale	24
1.5.4 Il sale ed il microbiota intestinale	25
1.5.5 Gli additivi alimentari ed il microbiota intestinale	25
1.5.6 I micronutrienti ed il microbiota intestinale	26

1.5.7 I polifenoli ed il microbiota intestinale	27
1.6 Effetto delle diete sul microbiota intestinale	28
1.6.1 Effetto di diete vegane e vegetariane sul microbiota	28
1.6.2 Effetto della dieta senza glutine sul microbiota.....	30
1.6.3 Effetto della dieta chetogenica sul microbiota.....	31
1.6.4 Effetto di diete ad alto contenuto di glucosio o fruttosio sul microbiota.....	33
1.6.5 Effetto della dieta a basso contenuto di FODMAP sul microbiota.....	33
1.6.6 Effetto della dieta occidentale sul microbiota intestinale	34
1.6.7 Effetto della dieta mediterranea sul microbiota	35
1.7 I modelli di fermentazione intestinale in vitro per lo studio del microbiota	37
1.7.1 I modelli di fermentazione in batch	38
1.7.2 I modelli di fermentazione dinamica	39
1.7.3 Il modello in vitro del colon TNO (TIM-2).....	41
1.7.4 Il simulatore SHIME®.....	42
1.7.5 Il simulatore gastro-intestinale: SIMGI	45
1.7.6 Il modello intestinale polifermentatore (PolyFermS)	46
1.7.7 Modelli componibili.....	48
1.7.8 Il modello in vitro dell'intestino tenue (TSI).....	49
1.7.9 Modelli con microbiota rappresentativo non fecale.....	49
2. Studio di ricerca sperimentale	51
3. Obiettivo e scopo.....	51
4. Materiali e Metodi	53
4.1 Donatori campioni biologici	53
4.2 Reagenti e prodotti chimici	53
4.3 Prodotti EcoProlive e controlli	53
4.4 Digestione gastrica e duodenale in vitro	54

4.5 Fermentazione fecale in coltura Batch e raccolta dei campioni	54
4.6 Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA.....	56
4.7 Analisi dei dati di sequenza	57
4.8 Enumerazione dei Gruppi Batterici tramite qPCR.....	57
4.9 Analisi del Volatiloma con SPME GC-MS.....	59
4.10 Analisi statistica	60
5. Risultati e discussione	61
5.1 Controlli di qualità per la convalida di MICODE	61
5.2 Cambiamenti delle diversità alfa e beta nei batteri fecali	61
5.3 Abbondanza batterica fecale relativa a livello di Phylum.....	63
5.4 Popolazioni del microbiota discriminate a livello di specie.....	65
5.5 Cambiamenti nelle popolazioni batteriche fecali selezionate con qPCR	70
5.6 Analisi del volatiloma attraverso SPME GC/MS.....	73
5.7 Cambiamenti nei principali metaboliti microbici legati al potenziale prebiotico.....	77
5.8 Correlazioni multi-omiche relative al potenziale prebiotico.....	81
6. Conclusioni.....	83
7. Bibliografia.....	85
8. Ringraziamenti	102

1. Introduzione

1.1 Il microbiota intestinale umano

Il tratto gastrointestinale umano ospita una popolazione complessa e dinamica di specie batteriche commensali, che si sono co-evolute con l'ospite, generando un rapporto simbiotico. Si stima che il numero di microrganismi che popolano il tratto gastrointestinale superi centomila miliardi di cellule microbiche per grammo, di quasi duemila differenti specie (Chong *et al.* 2019). Come risultato del vasto numero di cellule batteriche nel corpo, l'ospite e i microrganismi che lo abitano sono spesso indicati come "superorganismo" (Thursby & Juge, 2017).

Ogni individuo ha una sua impronta digitale batterica, cioè un profilo di specie proprio, diverso da quello di altri individui. La variabilità interindividuale è dovuta alle transizioni infantili, all'uso di antibiotici, nonché alle abitudini di vita, dietetiche e culturali (Rinninella *et al.*, 2019). Esiste però un "core" di almeno 57 specie comuni a tutti gli individui. I phyla microbici intestinali dominanti sono *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, con i due phyla *Firmicutes* e *Bacteroidetes* che rappresentano il 90% del microbiota intestinale (Capurso, 2016).

Il phylum più ricco è quello dei *Firmicutes* (gram-positivi), che comprende il 46-58% del totale dei batteri. È composto da più di 200 generi diversi, come *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Ruminococcus*. Il phylum dei *Bacteroidetes* (gram-negativi) comprende circa il 30-40% dei batteri presenti nel microbiota intestinale ed è rappresentato in particolare dai generi *Bacteroides* e *Prevotella*. Il phylum degli *Actinobacteria* è proporzionalmente meno abbondante (3-7%) ed è rappresentato principalmente dal genere *Bifidobacterium*. (Lay *et al.*, 2005). Seppur sotto l'1% sono presenti anche gli *Archaea* metanogenici *Methanobrevibacter smithii* e *Methanosphaera stadtmanae* (Capurso, 2016).

Una ricca e diversificata comunità microbica porta a una composizione del microbiota intestinale ben bilanciata e sana; al contrario una composizione batterica intestinale alterata può derivare da diversi fattori come farmaci, infezioni, invecchiamento, stile di vita, interventi chirurgici e cattiva alimentazione. La disbiosi è stata associata alla patogenesi di molte malattie infiammatorie e infezioni. (Rinninella *et al.*, 2019).

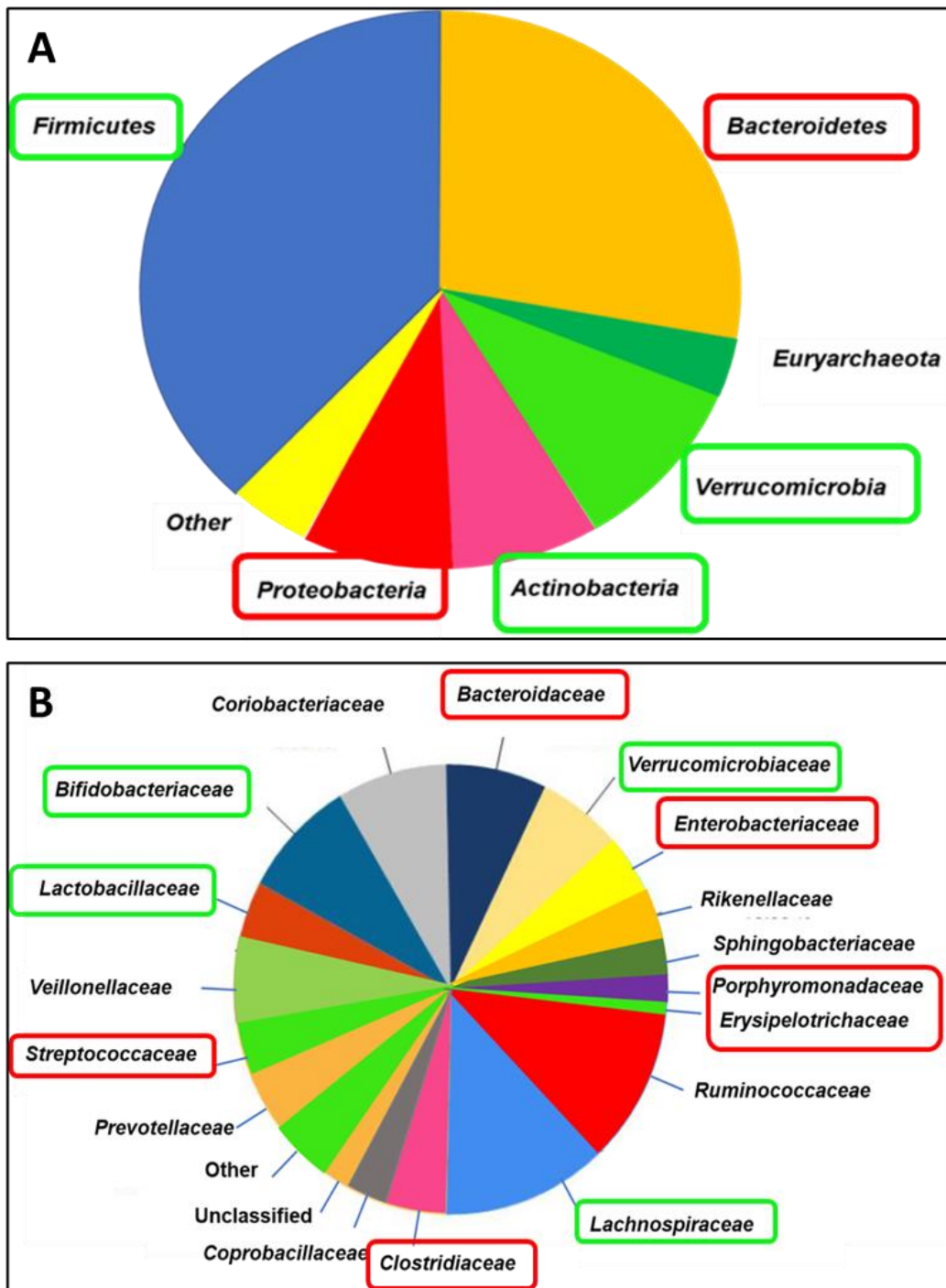


Figura 1. Composizione del microbiota intestinale umano; A) livello phylum, B) livello famiglia

La densità e la composizione delle comunità microbiche differiscono significativamente lungo il tratto gastrointestinale. Lo stomaco e l'intestino tenue ospitano un numero relativamente basso di microrganismi a causa dell'inibizione di crescita derivata principalmente dai sali biliari, dalle secrezioni esocrine del pancreas e dalla peristalsi frequente. Nel colon, invece,

essendo le nicchie ecologiche ricche di substrati, il pH neutro ed il potenziale redox ottimale, i microrganismi raggiungono livelli di 10^{11} - 10^{12} cellule per grammo di contenuto intestinale; prevalentemente anaerobi come *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (Gibson e Roberfroid, 1995).

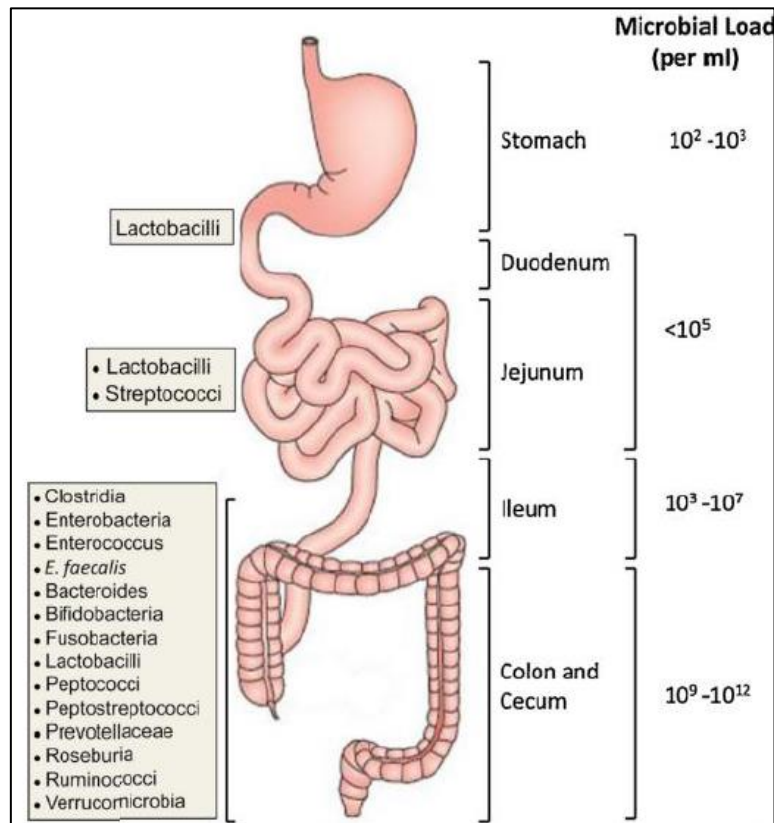


Figura 2. Distribuzione del microbiota lungo il tratto gastrointestinale.

La normale interazione fra microbi intestinali e il loro ospite umano è un rapporto simbiotico, benefico per entrambi: l'ospite mette a disposizione un habitat ricco di nutrienti e il microbiota conferisce elementi utili alla sua salute (Capurso, 2016).

Come riassunto nella figura 3, il microbiota intestinale è coinvolto in funzioni essenziali per il mantenimento della salute, come lo sviluppo del sistema immunitario, la corretta funzionalità intestinale nella digestione, il mantenimento dell'integrità della barriera intestinale, l'omeostasi metabolica, la produzione di vitamine, la sintesi di aminoacidi e neurotrasmettitori, il metabolismo degli acidi biliari, le funzioni protettive (Sanders et al., 2019).

Come descritto da Capurso (2016), ci sono numerose evidenze dell'attività strutturale del microbiota a favore del tratto gastrointestinale, ad esempio: *Bacteroides thetaiotaomicron*

induce l'espressione della small proline-rich protein 2A (sprr2A), necessaria per il mantenimento dei desmosomi dei villi epiteliali; *Lactobacillus rhamnosus* produce due proteine solubili (p40 e p75) che possono prevenire l'apoptosi delle cellule epiteliali; *Akkermansia muciniphilia* può incrementare i livelli di endocannabinoidi che controllano la funzione di barriera diminuendo l'endotossemia.

Per quanto riguarda le funzioni protettive, una peculiare attività del microbiota è quella di competere con i batteri potenzialmente pericolosi e patogeni, attraverso la produzione di sostanze in grado di inattivarli (*Cario et al., 2007*); l'alterazione del pH intestinale (*Yan et al., 2011*); la sottrazione dei nutrienti (*Cani et al., 2009*) ed infine mantenendo l'integrità della barriera mucosa, formata da batteri, muco e cellule epiteliali (*Stappenbeck et al., 2002*).

Le funzioni metaboliche del microbiota intestinale si esplicano attraverso la produzione di un grande numero di metaboliti, la maggior parte dei quali prodotti della fermentazione batterica. Il nostro colon riceve dall'ileo materiale digerito (che verrà poi trasportato nel colon sinistro ed emesso con le feci), e materiale non digerito come amido resistente, fibre dietetiche, zuccheri semplici, alcoli, proteine e substrati endogeni, cioè cellule epiteliali sfaldate, muco ed enzimi intestinali. Questi substrati vengono fermentati dal microbiota, in particolare da *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* ed *Enterobacteria*, portando alla formazione di acidi organici, idrogeno, etanolo, succinato, formato metano, CO₂; nonché composti potenzialmente bioattivi utili per l'ospite, come gli acidi grassi a catena corta (SCFA) (*Capurso, 2016*). Avendo a disposizione un enorme patrimonio enzimatico, il microbiota intestinale può essere visto come una comunità di cellule in grado di cooperare in molte reazioni metaboliche necessarie per la biotrasformazione di molecole estranee che non possiamo metabolizzare facilmente, come farmaci, xenobiotici, polifenoli, antibiotici (*Riccio e Rossano, 2020*).

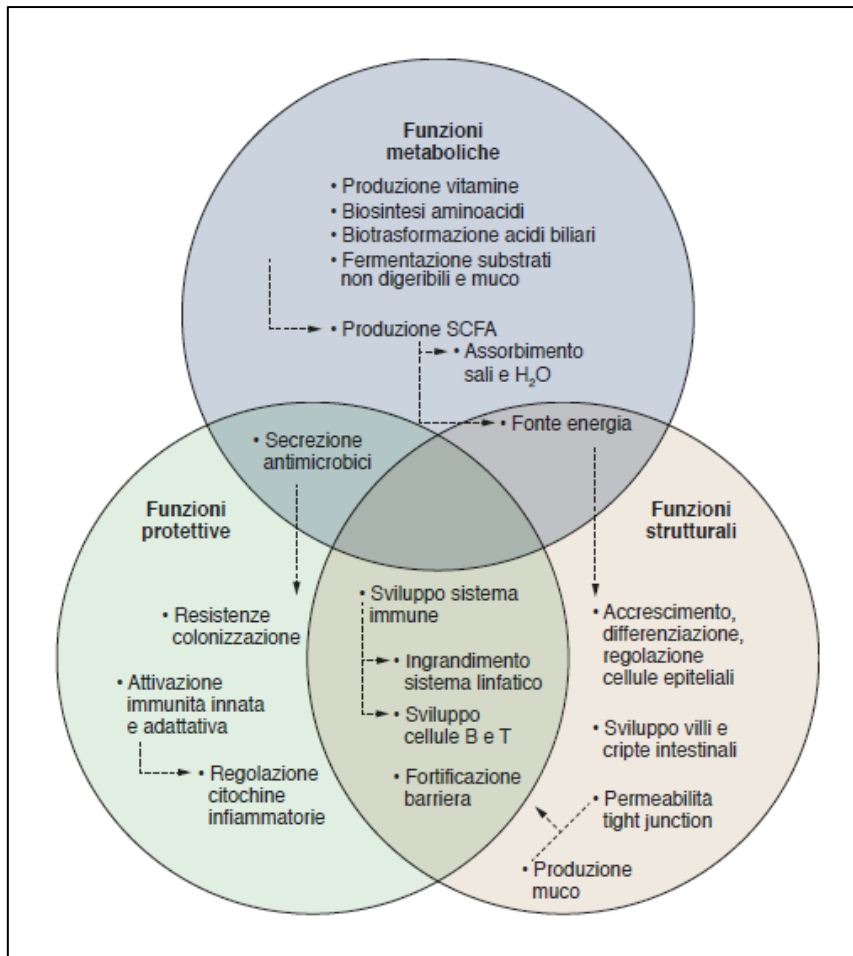


Figura 3. Funzioni del microbiota intestinale (Capurso, 2016).

Considerando la capacità di influenzare la funzione degli organi e dei sistemi distali, per molti aspetti il microbiota intestinale assomiglia a un organo endocrino (Forsythe et al., 2010; Evans et al., 2013). Come descritto in uno studio di Clarke e collaboratori (2014), il microbiota ha la capacità di produrre una vasta gamma di composti simili agli ormoni che svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'attività degli organi distali, compreso il cervello. È stata riconosciuta l'influenza del microbiota nella regolazione dell'attività metabolica: prove crescenti suggeriscono il suo coinvolgimento nella regolazione del glucosio e del peso. Si pensa che il microbiota abbia un ruolo anche nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, tramite la produzione o il rilascio di neurotrasmettitori come la serotonina e la modulazione della disponibilità di triptofano. A differenza di altri organi endocrini, il microbiota ha un'intensa plasticità e può alterarsi drasticamente e rapidamente in risposta alla dieta.

Secondo Lyte (2010), il microbiota soddisfa condizioni più importanti di qualsiasi definizione concettuale di organo poiché, nonostante l'evidente dissomiglianza fisica, è in grado non solo di influenzare, ma anche di rispondere alle secrezioni di altri organi.

1.2 Relazione tra dieta e microbiota intestinale umano

Alcuni composti presenti negli alimenti, come i poliooli, le fibre prebiotiche o i composti fenolici, sono scarsamente metabolizzati e assorbiti dall'ospite prima della trasformazione guidata dal microbiota del colon (Possemiers *et al.* 2011). Infatti, delle migliaia di specie che abitano l'intestino crasso, i microorganismi benefici sono deputati a questa azione (Hooper, Littman e Macpherson 2012). Per il mantenimento di un buon stato di salute risulta di fondamentale importanza l'equilibrio nel rapporto tra le specie di microrganismi benefici, commensali ed anche opportunistici. L'alterazione di questo equilibrio alimenta patologie dannose, come le sindromi metaboliche (Quin *et al.* 2012), le problematiche di malassorbimento (Kau *et al.* 2011), o le malattie infiammatorie intestinali (IBD) (Frank *et al.* 2007).

Influenzando l'eubiosi del microbiota intestinale, la dieta gioca un ruolo fondamentale nella comprensione degli effetti benefici del microbiota intestinale nei confronti dell'ospite, compreso il suo metabolismo a lungo termine (Wu *et al.* 2011; David *et al.* 2014).

È stato riconosciuto che il tipo di dieta e le abitudini alimentari sono i fattori che più incidono sull'equilibrio del microbiota intestinale (Rinninella *et al.* 2019).

D'altra parte, in diversi studi l'efficacia di diete sulle variazioni dei phyla fondamentali del microbiota intestinale (*Bacteroidetes* e *Firmicutes*) è stato dibattuto, infatti, sembra che questa sia in grado di influenzare maggiormente il microbiota intestinale a livelli filogenetici inferiori (Nissen, Casciano e Gianotti, 2020). Ad esempio, un alterato regime di assunzione di carboidrati potrebbe avere un impatto su specifici gruppi batterici: è stato osservato che adottando diete a basso contenuto di carboidrati si è verificata una riduzione dei *Bifidobacterium spp.*, *Roseburia spp.* ed *Eubacterium rectale*; la riduzione si è verificata anche nel contenuto di acidi grassi a corta catena (SCFA), principalmente a causa di una drastica perdita di acido butirrico (Duncan *et al.* 2007). Un contributo importante al cambiamento delle

popolazioni del microbiota intestinale deriva anche dalla natura dei carboidrati, così come dalla resistenza alla digestione. Uno studio di Walker et al. (2011) ha evidenziato che il consumo di amido resistente (RS) può aumentare la quantità di *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* ed *E. rectale*, mentre amido resistente combinato in una dieta con un basso contenuto di carboidrati ad alto contenuto proteico (WL) può aumentare *Oscillibacter valericigenes*, ma può diminuire l'abbondanza di *Roseburia* ed *E. rectale*. Allo stesso modo, una dieta ricca di fibre può favorire la crescita di *Bifidobacterium*, dei gruppi *Ruminococcus* e *Lactobacillus-Enterococcus* (Shen, Zhao e Tuohy 2011; Schroeder et al. 2018).

Per ottenere tali risultati sui microbi, le principali tecniche utilizzate finora variavano dalla microbiologia dipendente dalla coltura al FISH (ibridazione fluorescente in situ) e dalla qPCR (PCR quantitativa) fino alle tecnologie NGS (Next Generation Sequencing). Inoltre, per condurre indagini sui metaboliti la maggior parte degli studi hanno raggiunto risultati robusti grazie all'ausilio di tecniche cromatografiche e più recentemente grazie ad analisi in NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) (Nissen, Casciano e Gianotti, 2020).

1.3 I probiotici

La prima definizione ufficiale di “probiotico” è stata redatta nel 2001 da una commissione incaricata dall'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura delle Nazioni Unite, dopo che il governo argentino fece richiesta nel 2000 affinché la FAO formasse un gruppo di esperti per valutare le proprietà salutari e nutrizionali dei probiotici negli alimenti. In questo modo si voleva ottenere un riconoscimento internazionale ed univoco di quello che possiamo definire un concetto che fa parte della storia umana. La definizione data fu piuttosto ampia per comprendere una grande varietà di microrganismi, ospiti, vantaggi, siti target e tipi di prodotto, mantenendo così l'essenza delle definizioni storiche offerte nei decenni precedenti e stabilendo un'importante base di consenso. Nel 2014 questo concetto è stato ribadito e corretto grammaticalmente in un documento redatto dall' International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAAP) sull'ambito e sull'utilizzo appropriato del termine probiotico, portando alla definizione consensuale di probiotici come “microrganismi vivi che, somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite”.

A differenza di quanto riportato in alcune definizioni iniziali, secondo le quali i probiotici funzionano “contribuendo all’equilibrio microbico intestinale dell’ospite” (Parker, 1974) o “migliorando le proprietà della microflora indigena” (Havenaar e Huis In’t Veld, 1992), nell’attuale definizione condivisa di probiotici i loro effetti non sono considerati solamente quelli mediati dal microbiota intestinale, infatti, altri tipi di meccanismi sono noti. L’idea che i probiotici possano agire non solo influenzando il microbiota colonizzatore apre le porte ad una più ampia gamma di possibilità probiotiche, incoraggiando l’innovazione nel campo (Sanders et al. 2019).

Ceppi di *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*, presentano una lunga storia di utilizzo sicuro ed efficace come probiotici, mentre *Roseburia spp.*, *Akkermansia spp.*, *Propionibacterium spp.* e *Faecalibacterium spp.* mostrano promesse per il futuro (Sanders et al. 2019). Gran parte della nostra conoscenza sui meccanismi probiotici si basa sulla ricerca che utilizza modelli umani ex vivo, in vitro, animali o colture cellulari. La figura 4 mostra meccanismi noti distribuiti tra vari ceppi probiotici. Non tutti i meccanismi sono stati confermati nell’uomo e non esistono in ogni ceppo probiotico, infatti, sebbene più meccanismi siano probabilmente co-espressi in un singolo probiotico, l’importanza di un dato meccanismo dipenderà da molti fattori (Sanders et al. 2019). Ad esempio, come riportato in studi condotti da Ng et al. (2010) e Mujagic et al. (2017), in un intestino infiammato la capacità di sotto-regolare i mediatori infiammatori ed aumentare la funzione di barriera epiteliale potrebbe essere più importante, mentre uno studio condotta da Del Piano et al. (2010) dimostra come la capacità di aumentare gli acidi grassi a corta catena (SCFA) e l’idratazione nel colon potrebbero essere fondamentali per normalizzare la motilità intestinale.

La massima espressione degli effetti benefici di un probiotico può essere influenzata da molti fattori, come le proprietà del microbiota di base dell’ospite (Sanders et al. 2019).

Nonostante esistano pochi dati, uno studio condotto da Maldonado-Gomez et al. (2016), ha dimostrato che la persistenza dei probiotici nell’intestino è collegata alle proprietà del microbiota di base. La persistenza di *Bifidobacterium longum subsp. longum AH1206* nell’intestino umano è stata prevista dalla bassa abbondanza nell’ospite di *B. longum* e da bassi livelli di geni di utilizzo dei carboidrati microbici. In questo studio non è stato monitorato nessun endpoint clinico, ma la persistenza a lungo termine potrebbe essere una proprietà che contribuisce all’ottenimento dei benefici fisiologici (Sanders et al. 2019). Tuttavia, i risultati

di diversi studi clinici che non prevedevano la suddivisione dei partecipanti in base al microbiota di base, suggeriscono che la funzione probiotica non è necessariamente dipendente dalla presenza di uno specifico microbiota basale (*Murphy et al. 2019; Korpela et al. 2018*). I microrganismi probiotici agiscono attraverso una varietà di mezzi, tra cui la modulazione della funzione immunitaria, la produzione di acidi organici e composti antimicrobici, l'interazione con il microbiota residente, l'interfacciamento con l'ospite, il miglioramento dell'integrità della barriera intestinale e la formazione degli enzimi. Certamente le prove della relazione causa-effetto dei meccanismi di azione dei microrganismi probiotici negli ospiti umani devono ancora essere raccolte, ma i progressi tecnologici nel sequenziamento del genoma e nelle analisi del microbiota, ed i progressi chirurgici che consentono il campionamento in vivo in tempo reale, dovrebbero aiutare ad acquisire nuovi dati nei prossimi anni (*Sanders et al. 2019*).

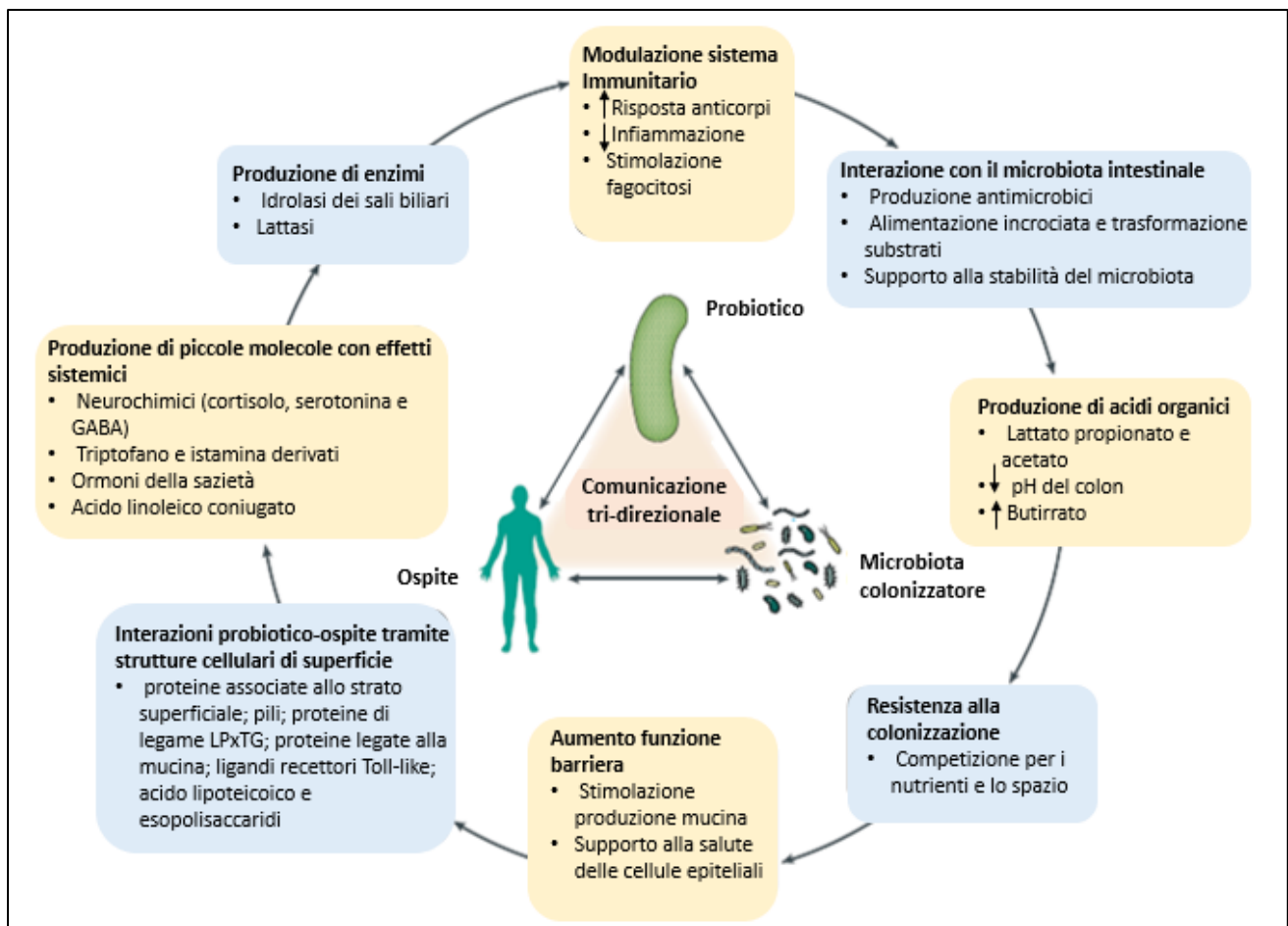


Figura 4. Meccanismo d'azione dei probiotici. È probabile che diversi meccanismi determinino i benefici clinici forniti dai probiotici per la salute dell'ospite. In alcuni casi questi meccanismi sono guidati direttamente dalle interazioni che avvengono tra i probiotici ed il microbiota intestinale, come la produzione di prodotti antimicrobici e l'alimentazione incrociata di altri microrganismi residenti. In altri casi, come avviene con le cellule immunitarie, i loro effetti potrebbero essere dovuti all'interazione con le cellule ospiti. GABA, acido gamma-amminobutirrico. (Sanders et al. 2019).

1.3.1 Modulazione delle funzioni immunitarie

È stato dimostrato che alcuni probiotici aumentano la fagocitosi o l'attività delle cellule natural-killer ed interagiscono direttamente con le cellule dendritiche (Klaenhammer et al. 2012). Studi condotti da Przemaska-Kosicka et al. (2016), Vitetta et al. (2017), e Childs et al. (2014), dimostrano anche la capacità di alcuni probiotici di sovra-regolare la secrezione di anticorpi, ottenendo migliori difese contro i patogeni e aumentando le risposte ai vaccini. I ceppi probiotici, inoltre, possono aumentare i livelli di citochine antinfiammatorie con implicazioni per la riduzione del cancro del colon e della colite (Klaenhammer et al. 2012). Le fimbrie, le

capsule e le strutture superficiali espresse da alcuni probiotici, sono un driver meccanicistico per molte di queste attività (Sanders et al. 2019).

1.3.2 Produzione di acidi organici

Le specie probiotiche appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* producono acido lattico ed acetico come prodotti finali primari del metabolismo dei carboidrati. Come mostrato in vari sistemi modello (Flint et al. 2015; Aoudia et al. 2016; Rios-Covian et al. 2016), questi acidi organici, quando prodotti *in situ*, possono abbassare il pH luminale, scoraggiando la crescita di agenti patogeni. Gli SCFA, principalmente acido acetico, butirrico e propionico, derivano dalla fermentazione colonica di fibre alimentari non digerite, carboidrati non digeribili o amido resistente. Partecipando ai meccanismi anti-infiammatori ed inviando segnali a numerosi organi (figura 5), la loro presenza nel corpo umano in quantità sufficienti è essenziale per la salute e il benessere dell'ospite (Le Blanc et al., 2017).

Come riportato da Markowia-Kopec e Slizewska (2020), la produzione di SCFA è stata verificata per numerosi probiotici, ad esempio: *Bifidobacterium longum* SP 07/3 e *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 sono in grado di produrre acido acetico, propionico e lattico; mentre *Lactobacillus salivarius* spp *salcinius* JCM 1230 e *Lactobacillus agilis* JCM 1048 acido propionico, butirrico e lattico.

In uno studio condotto da Wang et al. (2014), invece, è stato testato l'effetto del consumo orale di *Lactobacillus plantarum* P-8 sulla microflora intestinale umana. Dopo una somministrazione di 4 settimane, è stato riscontrato l'aumento del *Bifidobacterium* e di altri batteri benefici, mentre il *Desulfovibrio* e altri patogeni opportunisti sono diminuiti. È stato riscontrato un aumento statisticamente significativo dei livelli di acetato e propionato in tutti i gruppi di età testati.

Altri scienziati hanno anche testato il potenziale anti-tumore di un probiotico contenente in combinazione *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* BCRC 12188, *Lactobacillus plantarum* BCRC 12251 e *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869. Lo studio è stato condotto su topi per 12 settimane ed ha dimostrato che la somministrazione a lungo termine della miscela probiotica ha aumentato la produzione di SCFA (che potrebbero regolare gli enzimi antiossidanti), inibendo l'apoptosi cellulare e il danno cerebrale, con conseguente

miglioramento della memoria e delle capacità di apprendimento in topi anziani trattati con galattosio (Ho et al., 2019).

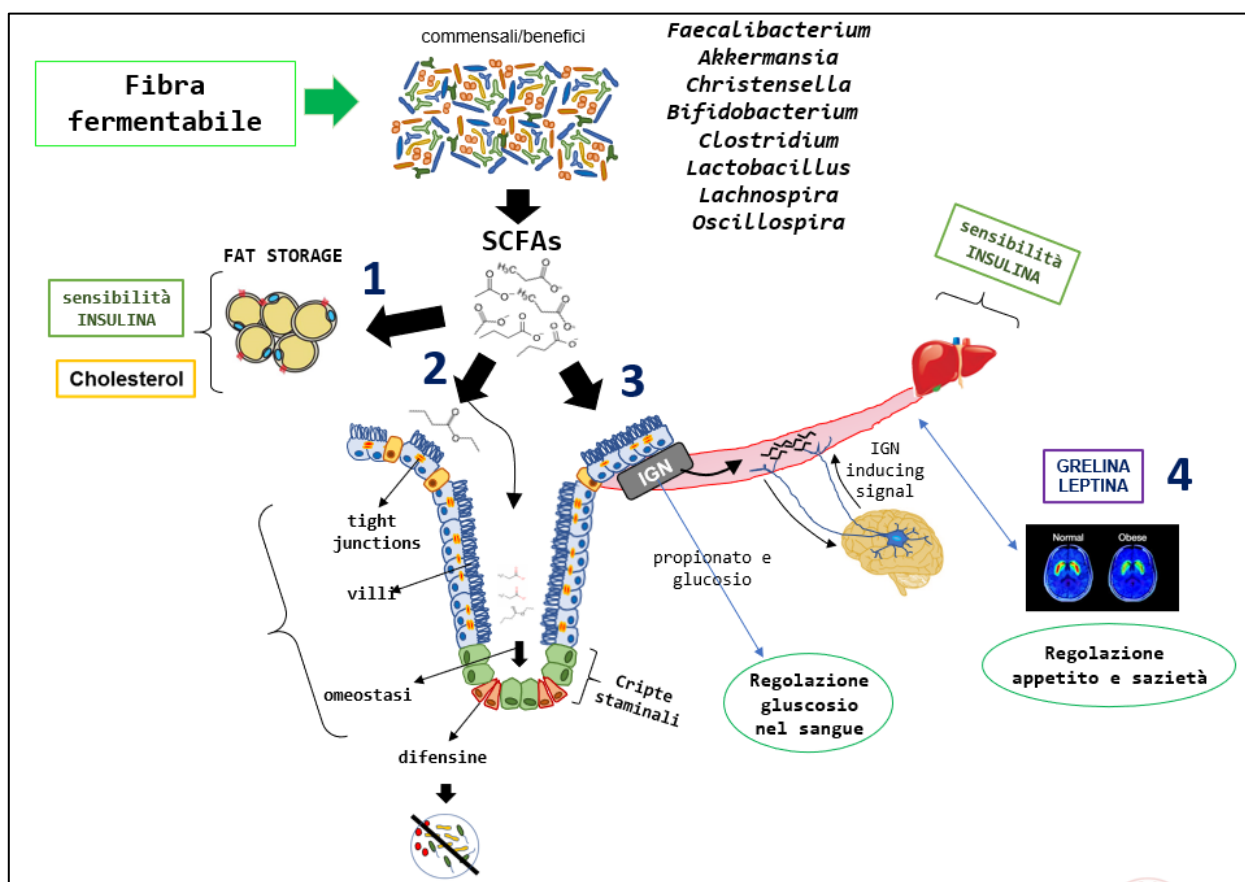


Figura 5. Ruolo degli SCFAs nell'organismo umano.

1.3.3 Interazione con il microbiota intestinale

I ceppi probiotici possono interagire con il microbiota intestinale attraverso la competizione per i nutrienti, l'antagonismo, l'alimentazione incrociata ed il supporto della stabilità del microbiota (Van Baarlen, Wells e Kleerebezem 2013). Producendo acetato, i *Bifidobatteri* possono nutrire altri membri del microbiota intestinale. A causa del metabolismo saccarolitico, che porta alla produzione di acidi organici, e della produzione di batteriocine, molti ceppi probiotici sono antagonisti verso altri microrganismi (Hegarty et al. 2016). Le batteriocine possono essere attive contro i patogeni in molti siti, tra cui il tratto urinario umano e l'intestino di esseri umani ed animali (Mokoena 2017; Bali et al. 2016). Come dimostrato da Maldonado-Gomez et al. (2016) e Abdulkadir et al. (2016), ceppi di *B. longum* AH1206 e *B. bifidum* ATCC15696 persistono nell'intestino del neonato, sebbene in questo caso la diminuzione dei

patogeni presenti non sia stata messa in relazione alla produzione di batteriocine. La capacità di alcuni ceppi probiotici di migliorare l'eradicazione dell'*Helicobacter pylori* potrebbe comportare una certa inibizione dell'agente patogeno, tuttavia, esistono forti evidenze che i probiotici in questo contesto riducano gli effetti avversi degli antibiotici utilizzati nel trattamento (Fang et al. 2019).

1.3.4 Interazioni probiotico-ospite

Come evidenziato da Sanders et al. (2018), le interazioni dei ceppi probiotici con i tessuti dell'ospite sono mediate dalle macromolecole che si trovano sulla superficie cellulare, comprese sia le componenti proteiche (come le proteine associate allo strato superficiale, quelle leganti la mucina, i pili e le proteine leganti LPxTG) che le componenti non proteiche, (come l'acido lipoteicoico, il peptidoglicano e gli esopolisaccaridi). È stato dimostrato che queste strutture influenzano il legame alle cellule intestinali e vaginali, alla mucina ed alle cellule immunitarie o dendritiche, con conseguente aumento dei tempi di transito e miglioramento dell'integrità della barriera. Confrontando il genoma di *Lactobacillus rhamnosus GG*, con quello di *Lactobacillus rhamnosus GR-1* è possibile avere un esempio delle diverse strutture superficiali: il primo microrganismo utilizza i pili per interagire con l'intestino, mentre il secondo possiede un gruppo unico di esopolisaccaridi che aiutano l'attività vaginale (Petrova et al. 2018).

1.3.5 Miglioramento della funzione barriera

La barriera intestinale rappresenta un'unità funzionale responsabile di due principali compiti cruciali per la sopravvivenza dell'individuo: permettere l'assorbimento dei nutrienti e difendere l'organismo dall'ingresso di macromolecole non desiderate, spesso dannose (Rinninella et al. 2019). Come dimostrato da La Fata, Weber e Mohajeri (2018), diversi ceppi probiotici di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sono in grado di aumentare l'espressione delle proteine "tight junction", che saldano un enterocita all'altro. Inoltre, in modelli 3D di cellule primarie di intestino tenue combinate con cellule immunitarie di maialino, è stata verificata la capacità di aumentare la resistenza trans-epiteliale di membrana, anche in co-culture con patogeni o dopo stress da patogeni (Nissen et al., 2011).

1.3.6 Produzione di molecole con effetti locali

In un lavoro di Yan et al. (2013) sono state descritte piccole molecole prodotte da alcuni ceppi probiotici con diversi effetti sull'ospite e sul suo microbiota. Tra le scoperte più interessanti troviamo sicuramente la produzione di sostanze neurochimiche in grado di influenzare la funzione cerebrale, come ossitocina, acido gamma-aminobutirrico, serotonina, triptamina, noradrenalina, dopamina ed acetilcolina (Kim et al. 2018; Janik et al. 2016; Reid 2019). Uno studio condotto da Liang et al. (2015), ha evidenziato che, aggiungendo all'alimentazione del ratto stressato utilizzato nel sistema modello, *Lactobacillus helveticus* NS8 i livelli plasmatici di corticosterone ed ormone adrenocorticotropo sono risultati più bassi, mentre i normali livelli di serotonina e noradrenalina nell'ippocampo sono stati ripristinati.

1.3.7 Produzione di enzimi

Come dimostrato da studi condotti da Kotz et al. (1994) e Costabile et al. (2017) enzimi microbici come la β -galattosidasi e l'idrolasi dei sali biliari, prodotti e rilasciati da alcuni ceppi probiotici, sono in grado di migliorare rispettivamente la digestione del lattosio e i profili lipidici nel sangue dell'uomo. Ad esempio, nello yogurt, la presenza dello *Streptococcus thermophilus* facilita la digestione del lattosio. La sua predisposizione ad essere permeabilizzato dalla bile quando entra nell'intestino tenue, promuove il rilascio della β -galattosidasi microbica, che scinde il lattosio nei suoi costituenti più facilmente digeribili, cioè glucosio e galattosio; questo si traduce in un beneficio clinico per le persone intolleranti al lattosio. L'EFSA ha ritenuto che le prove di questo effetto fossero sufficienti per autorizzare un claim salutistico riguardante *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* come componenti dello yogurt in grado di alleviare i sintomi della cattiva digestione del lattosio.

1.4 I prebiotici

I prebiotici sono stati definiti per la prima volta in un lavoro condotto da Gibson & Roberfroid nel 1995; poi nel 2017 un aggiornamento alla definizione è stato fornito tramite un documento di consenso degli esperti redatto da Gibson et al. poiché, di fronte ai progressi scientifici, era diventato necessario chiarire cosa costituissero e cosa non costituissero una sostanza prebiotica. Dunque, una sostanza prebiotica è stata definita come “un substrato che viene utilizzato selettivamente da microrganismi ospiti che conferiscono un beneficio per la salute”.

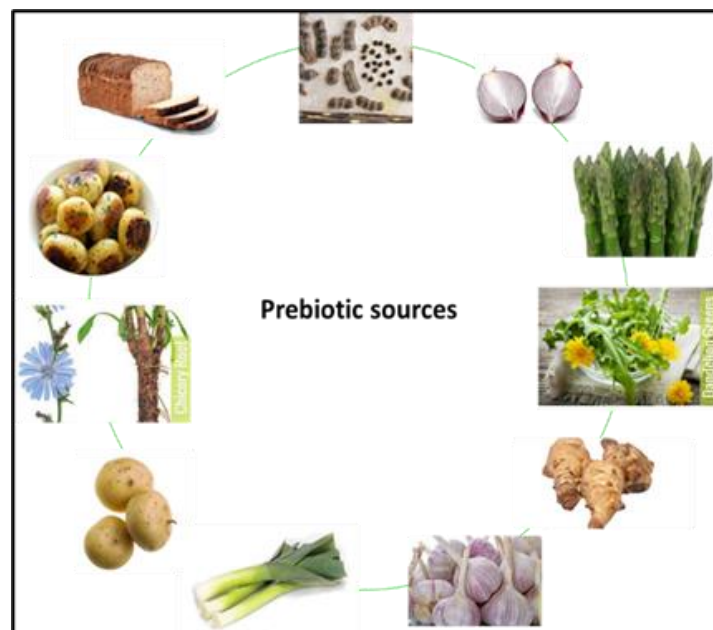


Figura 6. Fonti naturali di prebiotici.

Il desiderio di ottimizzare il mondo microbico associato all'uomo per ottenere un miglioramento della salute ha condotto allo sviluppo di composti indirizzati ad un gruppo di microrganismi in continua espansione. I prebiotici non sono più visti semplicemente come stimolatori della crescita di bifidobatteri e lattobacilli, ma sono ormai riconosciuti per i loro effetti a livello del sistema metabolico e fisiologico (Gibson et al. 2017). Come sottolineato da Collins et al. (2018), sebbene l'intestino rimanga la porta di accesso alla maggior parte di questi effetti, non è l'unica; infatti, si stanno conducendo numerosi studi al fine di ottenere ulteriori informazioni riguardanti l'influenza dei prebiotici sulle comunità microbiche del tratto urogenitale, delle aree orali-nasali e della pelle.

Per capire come funzionano, e soprattutto come sfruttare i prebiotici per “indirizzare” il microbiota ed ottenere un beneficio sulla salute, bisogna tenere presente che i microrganismi vivono in ecosistemi funzionali complessi (Sanders et al. 2019). All’interno di questi, i batteri hanno una moltitudine di ruoli, inclusa la conversione di carboidrati alimentari, proteine ed alcuni grassi in entrata in metaboliti che possono avere effetti positivi o negativi sulla salute dell’ospite (Li et al. 2016; Kasubuchi et al. 2015; Verbeke et al. 2015; David et al. 2014). Come riportato da Gibson et al. (2017) gli attuali prebiotici sono prevalentemente a base di carboidrati, ma altre sostanze come i polifenoli e gli acidi grassi polinsaturi potrebbero esercitare effetti prebiotici.

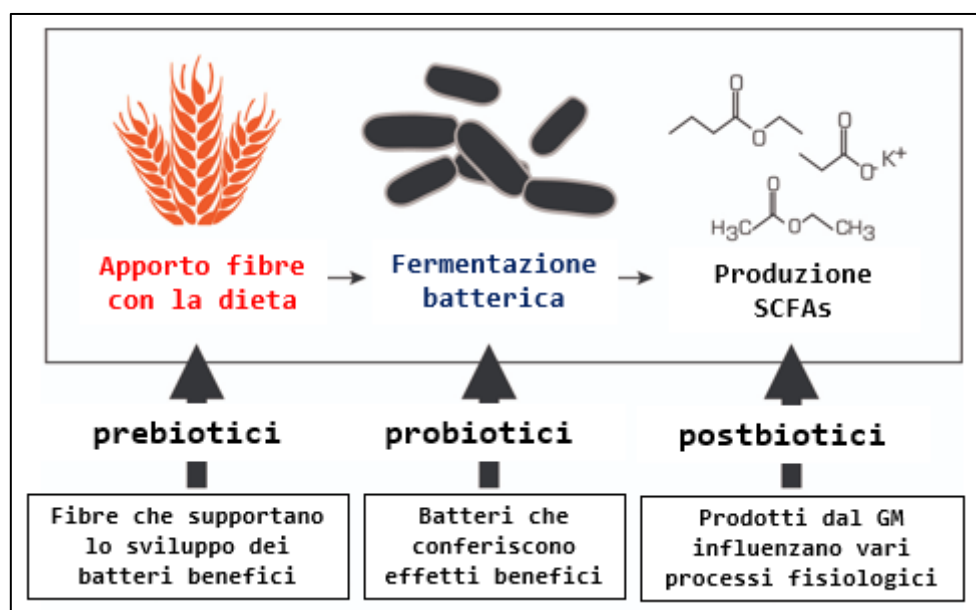


Figura 7. Digestione delle fibre vegetali alimentari.

Microrganismi come i *bifidobatteri* sono in grado di metabolizzare in modo molto efficiente i carboidrati a basso peso molecolare, possedendo una gamma di glicosidasi cellulari ed extra-cellulari e sistemi di trasporto specifici (Falony et al. 2009; Riviere et al. 2018). Invece, altri microrganismi, come quelli appartenenti al genere *Bacteroides*, riescono ad utilizzare i polisaccaridi ad alto peso molecolare (Flint et al. 2012; Hamaker e Tuncil 2014). A questo proposito, come descritto da Ze et al. (2012), alcuni batteri potrebbero essere di notevole importanza in quanto possiedono la capacità di avviare la scomposizione di particolari substrati. Ad esempio, *Ruminococcus spp* può facilitare la degradazione dell’amido resistente,

portando alla liberazione di destrine a basso peso molecolare che a questo punto possono essere metabolizzate dalla comunità microbica. Il percorso da un polisaccaride ad un acido grasso a corta catena, dunque, è una rete metabolica complessa ed indiretta. Come riportato in studi di Hosseini et al. (2011) e Louis e Flint (2009) acetato e lattato, che sono i principali prodotti metabolici finali dei bifidobatteri e dei batteri lattici, vengono utilizzati da altri microrganismi per produrre, ad esempio, propionato e butirrato.

Un'ulteriore complicazione in questi studi è rappresentata dal fatto che la risposta dell'ecosistema ai carboidrati è fortemente influenzata dai microrganismi già presenti; come evidenziato da Flint, Duncan e Louis (2017), i microbiomi individuali dominati da *Prevotella* sono in grado di fermentare i carboidrati più rapidamente rispetto a quelli a dominanza *Bacteroides*. Inoltre, uno studio condotto da Chen et al. (2017) mostra che quando questi distinti inoculi fecali, dominati da *Prevotella* o *Bacteroides* vengono incubati con frutto-oligosaccaridi (FOS) oppure con due differenti arabinosilani, il profilo degli acidi grassi a corta catena prodotti risulta nettamente diverso e correlato al microbioma. Anche uno studio condotto da Wu et al. (2017), utilizzando un modello di fermentazione in batch in vitro contenente microbiota umano ed oligosaccaridi di isomalto come fonte di carbonio, mostra un'influenza simile del microbioma di partenza sulla fermentazione dei carboidrati.

Grazie agli studi sul microbioma basati sul sequenziamento del DNA ribosomiale 16S è stata acquisita maggiore consapevolezza della ricchezza dell'ecosistema microbico intestinale (Qin et al. 2010), tuttavia, questi non forniscono una comprensione delle interazioni funzionali tra i membri del microbiota intestinale. Come sottolineato da Ha, Lam e Holmes (2014) e Moya e Ferrer (2016) sta diventando chiaro che, sebbene i microbiomi intestinali individuali possano essere piuttosto diversi, vi è un elevato livello di ridondanza funzionale ed alcune funzioni ecologiche specifiche sono svolte da una serie di batteri in individui diversi.

Poiché la comprensione dell'ecologia funzionale del microbiota intestinale è imperfetta, la scoperta dei meccanismi d'azione dei prebiotici rappresenta una sfida. Nonostante questo, i meccanismi attraverso i quali un prebiotico può portare a benefici per la salute sono stati descritti grazie a ricerche condotte utilizzando modelli in vitro o animali; in molti casi, tuttavia, è difficile stabilire che si verifichino effettivamente nel microbiota intestinale umano (Sanders et al. 2019). Nei prossimi paragrafi verranno descritti gli effetti prebiotici, che includono la

difesa contro i patogeni, la modulazione immunitaria, l'assorbimento dei minerali, la funzione intestinale, gli effetti metabolici e la sazietà.

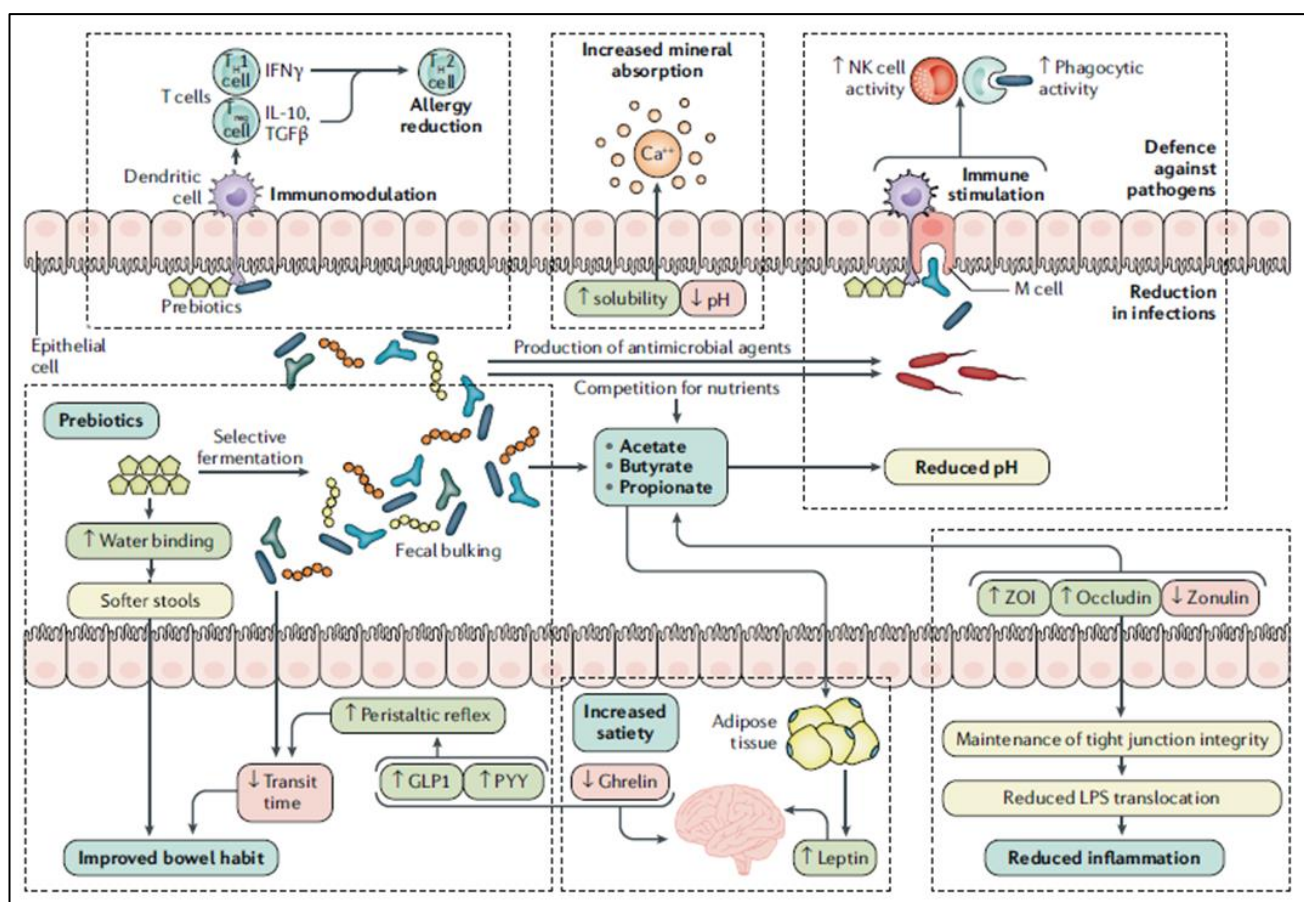


Figura 8. Meccanismi d'azione identificati dei prebiotici. La premessa è che i prebiotici entrano nell'intestino e vengono utilizzati selettivamente. Questo passaggio aumenta la crescita batterica e la funzionalità di generi o specie specifici, derivandone benefici per la salute. La massa fecale e il miglioramento delle abitudini intestinali si verificano a causa della crescita microbica. La regolazione immunitaria può essere influenzata dall'aumento della biomassa e dei componenti della parete cellulare dei batteri. I prodotti metabolici includono acidi organici, che oltre all'abbassamento del pH intestinale possono anche influenzare l'integrità epiteliale e la regolazione ormonale. I batteri che rispondono all'assunzione di prebiotici possono influenzare la composizione del microbiota attraverso l'elaborazione di agenti antimicrobici e le interazioni competitive. GLP1, peptide1 simile al glucagone; Cellula M, cellula micro-piegata; Cellula NK, cellula natural-killer; PYY, peptide YY; TGFβ, trasformante fattore di crescita-β; Cellula TH1, cellula T-helper di tipo 1; Cellula TH2, cellula T-helper di tipo 2; Cellula T reg, cellula T regolatrice; ZO1, zonula occludens 1 (Sanders et al. 2019).

1.4.1 Difesa contro gli agenti patogeni

L'attività di difesa nei confronti dei patogeni può essere studiata in vitro grazie all'utilizzo di sistemi modello, come riportato in studi condotti da Fooks e Gibson (2002) e Tzortzis et al. (2004). Attraverso la somministrazione di prebiotici e la propagazione di batteri benefici si otterrà un abbassamento del pH luminale, inibendo la crescita dei patogeni. L'instaurarsi di una popolazione stabile di microrganismi commensali ridurrà la disponibilità di nutrienti per i microrganismi invasori, rendendo difficile la colonizzazione. Vulevic et al. (2008) e Vulevic et al. (2015) evidenziano che, in studi condotti su individui anziani, dieci settimane di consumo giornaliero di galatto-oligosaccaridi (GOS) hanno indotto aumenti della funzione immunitaria, in particolare aumentando l'attività fagocitaria e delle cellule natural-killer.

In un recente studio di Bragança Ribeiro e Maria Costa (2021) è stato verificato il potenziale antimicrobico dei polifenoli della fibra di oliva. LOPP (polvere ottenuta dalla sansa di oliva arricchita di liquido) e POPP (polvere ottenuta dalla sansa di oliva arricchita di polpa) sono stati sottoposti a una digestione gastrointestinale simulata in vitro seguita da una fermentazione fecale in vitro. Le polveri di sansa di oliva hanno mostrato un'attività anti adesione variabile tra l'1,4 e il 22% verso *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*. L'effetto più pronunciato è stato rilevato per POPP contro batteri Gram-positivi: le aderenze di *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* sono state inibite almeno del 20%. POPP è composto principalmente da fibre insolubili, ma contiene anche una notevole quantità di composti fenolici liberi e legati (in particolare oleuropeina aglicone e idrossitirosolo), che possono agire come agenti anti-adesione alla mucina intestinale. La luteolina, ad esempio, è stata trattenuta in quantità maggiori nella frazione non digerita di POPP ed è stata descritta per possedere attività antimicrobica contro diverse specie batteriche (Aziz et al., 2018; Sousa et al., 2006)

1.4.2 Modulazione immunitaria

Nonostante i meccanismi esatti non siano ancora chiari, ci sono prove che l'intervento prebiotico possa essere in grado di ridurre le risposte delle cellule T-helper di tipo 2, influenzando il processo allergico. I dati più favorevoli sono stati raccolti da studi condotti su neonati. Durante uno studio in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo su 259

neonati, la somministrazione di latte artificiale arricchito con GOS e FOS a catena lunga è stata associata ad una riduzione dell'incidenza inferiore al 50% di dermatite atopica, respiro sibilante ed orticaria rispetto ai neonati non alimentati con il latte prebiotico (*Moro et al. 2006; Ivakhnenko e Nyankovskyy 2013*). In uno studio in doppio cieco, controllato con placebo, condotto da Arslanoglu et al. (2012), si evidenzia che in neonati sani a rischio di atopica, alimentati per sei mesi con una formula ipoallergenica arricchita di prebiotici, si è verificata una riduzione superiore a cinque volte dell'insorgenza di allergie cinque anni dopo l'alimentazione.

1.4.3 Maggiore assorbimento di minerali

La maggior parte dell'assorbimento dei minerali avviene tramite meccanismi di trasporto attivo nell'intestino tenue. La fermentazione dei prebiotici, portando alla produzione di acidi grassi a corta catena, determina un abbassamento del pH luminale. Questo calo del pH può aumentare la solubilità del calcio, fornendo una maggiore forza motrice per l'assorbimento passivo (*Goss et al. 2007*). Studi condotti da Abrams et al. (2007); Abrams, Griffin e Hawthorne (2007) e Whisner et al. (2013), hanno dimostrato che il consumo da parte di giovani adolescenti di una miscela di FOS ed inulina oppure GOS, può provocare un marcato aumento dell'assorbimento e del calcio mineralizzato nell'osso. Questo intervento precoce potrebbe ridurre l'incidenza di osteoporosi più avanti nella vita, tuttavia, questa ipotesi è supportata da dati provenienti da modelli animali e mancano studi a lungo termine sugli esseri umani.

1.4.4 Miglioramento della funzione intestinale

Spesso i miglioramenti nella funzione intestinale sono stati attribuiti al semplice accumulo fecale dovuto al consumo di fibre alimentari. Tuttavia, come dimostrato da Kanauchi, Andoh e Mitsuyama (2013) e Hurst et al. (2014), studi sugli animali hanno dimostrato che gli acidi grassi a corta catena prodotti dalla fermentazione dei prebiotici possono regolare gli ormoni intestinali che a loro volta sono in grado di modulare le risposte motorie locali dell'intestino. Inoltre, la capacità di legare l'acqua dei carboidrati prebiotici ha l'effetto di ammorbidire le feci, facilitando il passaggio (*Lamsal 2012; Hager et al. 2011*).

1.4.5 Effetti metabolici

Numerose meta-analisi, come quelle condotte da Kellow, Coughlan, e Reid (2014), Beserra et al. (2015), Liu et al. (2017) e Guo et al. 2012, hanno indagato gli effetti metabolici dei prebiotici; sebbene i risultati tra gli studi varino, in generale è possibile concludere che l'intervento prebiotico ha un effetto positivo sull'omeostasi del glucosio, l'infiammazione ed il profilo lipidico nel sangue negli essere umani.

Alla base di molte ricerche sui prebiotici, sulla funzione di barriera e sull'infiammazione c'è l'ipotesi che i prodotti di fermentazione, come gli acidi grassi a corta catena, siano probabili mediatori degli effetti benefici. Tuttavia, come dimostrato da Bhatia et al. (2015) e Akbari et al. (2017), almeno in vitro, i GOS possono stimolare direttamente l'espressione di proteine a giunzione stretta nelle linee cellulari epiteliali intestinali e diminuire il flusso transepiteliale. Invece, per quanto riguarda la capacità dell'inulina di migliorare la risposta glicemica, come evidenziato da Neyrinck et al. (2016), questa potrebbe essere dovuta all'inibizione diretta del complesso enzimatico isomaltasi-saccarasi intestinale, ma finora questi risultati provengono da studi sui topi.

1.4.6 Effetto sulla sazietà

Gli acidi grassi a corta catena prodotti dalla fermentazione nell'intestino possono interagire con specifici recettori degli acidi grassi (FFAR2 e FFAR3) e regolare la lipolisi ed il rilascio del peptide-1 simil glucagone (*Stoddart, Smith, e Milligan 2008; Bolognini et al. 2019*). Poiché questi recettori si trovano su molti tessuti, potrebbero essere un collegamento chiave per comprendere la relazione tra fermentazione dei prebiotici e benefici per la salute sistemica. Come descritto da Chambers, Morrison, e Frost (2015) e Mithieux (2014) gli SCFA possono regolare l'appetito tramite diversi meccanismi. L'interazione con le cellule L del colon, ad esempio, si traduce nella produzione di ormoni anoressigeni come PYY e GLP-1; il propionato che arriva al fegato attraverso la vena porta epatica, invece, stimola la gluconeogenesi che agisce come un segnale di sazietà. Secondo uno studio sui topi, condotto da Frost et al. (2014), l'acetato, il principale acido grasso a corta catena formato dalla fermentazione prebiotica, può attraversare la barriera ematoencefalica ed entrare nell'ipotalamo, promuovendo segnali anoressici.

1.5 Interazione tra i componenti degli alimenti ed il microbiota intestinale

Influenzandone la composizione in termini di ricchezza e diversità, i componenti alimentari hanno un impatto chiave sul microbiota intestinale. Se da un lato l'elevato apporto di proteine animali, grassi saturi, zuccheri e sale potrebbe stimolare la crescita di batteri patogeni a scapito di quelli benefici, dall'altro il consumo di polisaccaridi complessi e proteine vegetali potrebbe essere associato ad un aumento della quantità di batteri benefici. Inoltre, omega-3, polifenoli e micronutrienti sembrano essere in grado di conferire benefici per la salute attraverso la modulazione del microbiota intestinale (*Rinninella et al. 2019*).

Nei prossimi paragrafi verranno analizzate nello specifico le interazioni tra i diversi componenti alimentari ed il microbiota intestinale.

1.5.1 I carboidrati ed il microbiota intestinale

I carboidrati possono essere classificati in substrati digeribili e non digeribili. Quelli digeribili (come glucosio, fruttosio e galattosio) vengono degradati enzimaticamente nell'intestino tenue e rapidamente rilasciati nel sangue sotto forma di glucosio; quelli non digeribili, macroscopicamente chiamati "fibre alimentari", raggiungono l'intestino crasso poiché resistenti alla digestione nell'intestino tenue.

Le fibre alimentari possono essere classificate in base alla loro solubilità in acqua ed alla possibilità di essere facilmente fermentate dai batteri del colon. Inulina, pectine, beta-glucani, FOS e GOS sono considerate fibre solubili in acqua e fermentescibili; mentre cellulosa, emicellulosa, lignina ed amido resistente sono considerate insolubili e non fermentabili.

Le fibre alimentari fermentabili subiscono una fermentazione saccarolitica ad opera dei batteri intestinali che porta essenzialmente alla produzione di monosaccaridi, acidi grassi a corta catena (in particolare acetato, propionato e butirrato) e gas (cioè metano ed anidride carbonica). Dunque, i carboidrati accessibili al microbiota, indicati come "MAC", diventano disponibili come prebiotici da metabolizzare in acidi grassi a corta catena (*Rinninella et al. 2019*).

Come dimostrato da Tsukahara et al. (2003) e Klampfer (2003), gli SCFA sono coinvolti nell'omeostasi del colon poiché stimolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule epiteliali, l'assorbimento di sali ed acqua, il mantenimento dell'integrità della mucosa e la diminuzione dell'infiammazione. I tipi e le quantità di acidi grassi a corta catena prodotti sono

determinati principalmente dalla composizione del microbiota intestinale e dalla quantità di carboidrati consumati. Di conseguenza, le popolazioni batteriche rilevate nelle feci sono influenzate dal tipo e dalla quantità di carboidrati non digeribili assunti nella dieta umana (Maukonen e Saarela 2015).

1.5.2 Le proteine ed il microbiota intestinale

La fermentazione degli amminoacidi avviene nel colon distale ad opera dei principali phyla microbici tra cui *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Rispetto a quella saccarolitica la fermentazione proteolitica produce meno acidi grassi a corta catena, determina invece il rilascio di acidi grassi a catena ramificata (come isobutirrato, 2-metilbutirrato e isovalerato) e substrati potenzialmente tossici come l'ammoniaca, le cui ammine includono nitrosammine e trimetilammina N-ossido (Rinninella et al. 2019).

A seconda del tipo di proteina introdotta dall'ospite, gli effetti sulla composizione del microbiota intestinale variano. Come dimostrato da David et al. (2014) e Reddy, Weisburger e Wynder (1975), il consumo di proteine di origine animale provenienti in particolare da carne rossa e latticini, può portare ad un aumento dell'abbondanza di batteri anaerobici tolleranti alla bile come *Bacteroidetes*, *Alistipes* e *Bilophila*, inducendo un aumento nella produzione di trimetilammina N-ossido, composto noto per il suo potenziale pro-aterogenico. Inoltre, uno studio condotto da Jantchou et al. (2010) ha evidenziato che un elevato consumo di proteine di origine animale potrebbe aumentare il rischio di malattie infiammatorie intestinali (IBD) attraverso una produzione accumulata di idrogeno solforato (H₂S) da parte di batteri (ad esempio *Desulfovibrio spp.*) che riducono il solfato dai solfati inorganici alimentari e dagli amminoacidi solforati. Per quanto riguarda le proteine vegetali, invece, uno studio condotto da Swiatecka et al. (2011) ha dimostrato come il consumo di proteine del pisello abbia determinato l'aumento di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e la riduzione di *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens* patogeni.

1.5.3 I grassi ed il microbiota intestinale

Come dimostrato da Cândido et al. (2018), la quantità e la tipologia dei grassi alimentari influenzano la composizione del microbiota intestinale.

Diversi studi condotti sugli animali hanno evidenziato che un elevato apporto di grassi alimentari, in particolare di quelli saturi (SFA), determinando una diminuzione dei *Bacteroidetes* ed un aumento dei *Firmicutes* e dei *Proteobacteria*, potrebbe portare a disbiosi intestinale. Inoltre, si potrebbero verificare alterazioni della barriera intestinale a causa dell'abbondanza di batteri che riducono i solfati, che essendo in grado di ridurre i legami disolfuro nel muco, ne causano difetti ed aumentano l'infiammazione intestinale (Rinninella et al. 2019). Per quanto riguarda gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), una revisione condotta da Wolters et al. (2018) ha evidenziato che questi non hanno alcun effetto sugli indici di ricchezza/diversità, sulla distribuzione dei phylum, e sul rapporto tra *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. A livello di famiglia e genere, invece, le diete ricche di acidi grassi monoinsaturi (come la "dieta mediterranea") potrebbero essere correlate positivamente al genere *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Turicibacter* ed alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, mentre potrebbero essere correlate negativamente al genere *Bifidobacterium*.

Passando agli acidi grassi polinsaturi (PUFA), questi sono suddivisi in omega-3 ed omega-6. I PUFA omega-3, presenti soprattutto nei pesci grassi, possono esercitare un'azione positiva sul microbiota, ripristinandone una sana composizione ed aumentando la produzione di composti antinfiammatori. Invece, l'elevato rapporto PUFA omega-6/omega-3, predominante nella dieta occidentale, è stato correlato ad una maggiore permeabilità della barriera intestinale e ad endotossemia metabolica attraverso un meccanismo guidato dal microbiota intestinale (Rinninella et al. 2019).

Una famiglia distinta di PUFA sono gli isomeri coniugati dell'acido linoleico, i così detti "CLA". Questi, derivando dalla bio-idrogenazione dell'acido linoleico ad opera di batteri presenti nel rumine, si trovano in alimenti di origine animale come manzo, agnello, burro e latticini. Come dimostrato da Den Hartigh (2019), l'integrazione alimentare con CLA in topi può promuovere notevoli cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale: a livello di phylum si è riscontrato una diminuzione di *Firmicutes* ed un aumento di *Bacteroidetes*, mentre a livello di specie un arricchimento di *Butyrivibrio*, *Roseburia* e *Lactobacillus*, con conseguente aumento di butirrato nelle feci ed acetato nel plasma. Questi effetti sulla

composizione del microbiota intestinale potrebbero parzialmente spiegare le proprietà benefiche attribuite ai CLA.

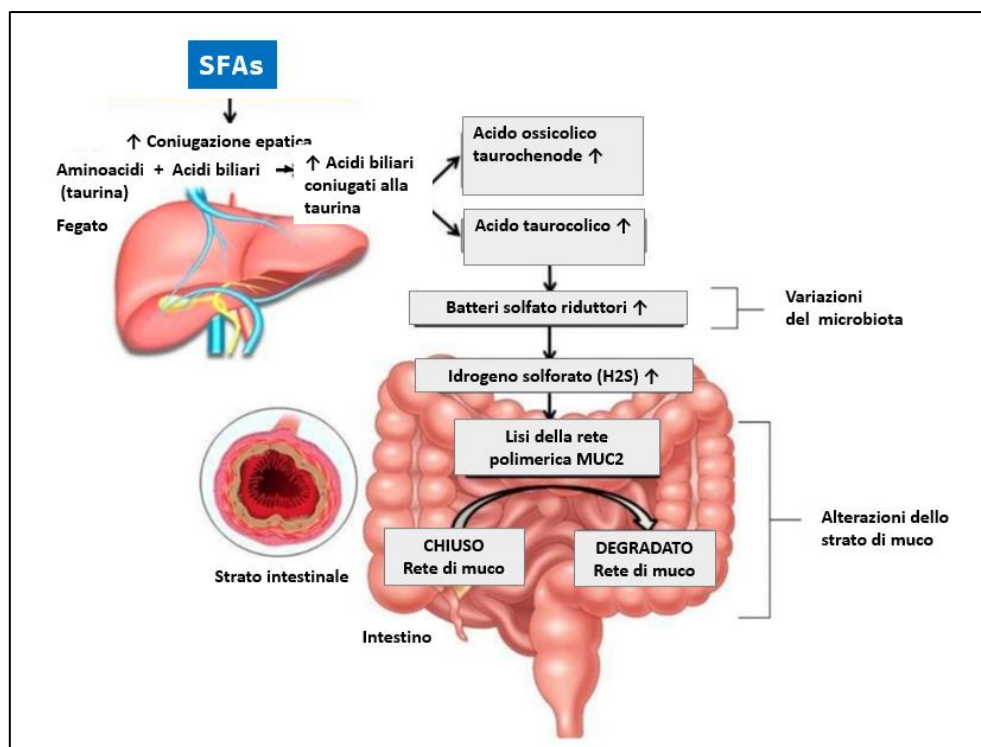


Figura 9. I grassi ed il microbiota intestinale umano.

1.5.4 Il sale ed il microbiota intestinale

Come evidenziato da diversi studi sui topi, una dieta ricca di sale può provocare alterazioni della composizione del microbiota intestinale, con un possibile aumento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*. Questo si traduce in una produzione alterata di acidi grassi a corta catena, che può essere associata a modifiche della permeabilità intestinale e dell'omeostasi immunitaria (Rinninella et al. 2019).

1.5.5 Gli additivi alimentari ed il microbiota intestinale

Gli additivi alimentari come i dolcificanti artificiali e gli emulsionanti sono incorporati in quasi tutti gli alimenti trasformati, spesso per favorirne la stabilità nel tempo e migliorarne la consistenza ed il gusto. La maggior parte dei dolcificanti artificiali non calorici passa attraverso il tratto gastrointestinale umano senza essere digerita dall'ospite, e quindi incontra direttamente il microbiota intestinale. Diversi rapporti hanno dimostrato che il consumo di queste sostanze

potrebbe alterare il microbiota intestinale ed indurre nell'ospite effetti avversi mediati dal microbiota, come ad esempio l'intolleranza al glucosio (Rinninella et al. 2019).

Suez e collaboratori (2014) hanno condotto uno studio nel quale per una settimana volontari sani, che normalmente non consumavano dolcificanti artificiali non calorici, hanno ricevuto una dose di 5 mg/Kg di saccarina. Questi soggetti hanno sviluppato una tolleranza al glucosio inferiore e nella loro feci sono stati rilevati un aumento di *Bacteroides spp* e *Lactobacillus spp* ed una diminuzione di *Clostridiales spp*.

In uno studio condotto da Palmnäs et al. (2014) è stato riportato che somministrando acqua con basse dosi (5-7 mg/die) di aspartame per otto settimane, il microbiota intestinale dei ratti utilizzati nel modello subiva cambiamenti significativi: sono stati rilevati una maggiore abbondanza di *Enterobacteriaceae* e *Clostridium leptum*, insieme ad elevati livelli di glucosio a digiuno e risposte insuliniche alterate. Secondo uno studio in vitro condotto da Chassaing et al. (2015), gli emulsionanti alimentari come le lecitine ed i mono e digliceridi degli acidi grassi, potrebbero aumentare la traslocazione batterica attraverso gli epitelii, promuovendo l'infiammazione sistemica ed alterando la localizzazione e la composizione del microbiota.

1.5.6 I micronutrienti ed il microbiota intestinale

Le vitamine e i minerali sono fondamentali per la regolazione del metabolismo energetico, la crescita e differenziazione cellulare e per le funzioni immunitarie. Numerose vitamine possono essere sintetizzate dal microbiota intestinale, come la tiamina, la riboflavina, la niacina, la biotina, l'acido pantotenico, il folato e la vitamina k. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la vitamina D potrebbe avere un impatto sulla composizione del microbiota, modulandolo ed aumentando l'abbondanza di ceppi batterici potenzialmente benefici (Rinninella et al. 2019). Anche sostanze antiossidanti come i carotenoidi, potrebbero influenzare il microbiota intestinale. Recenti studi hanno evidenziato che, da una parte, la luteina estratta dal ribes nero ha promosso la crescita di bifidobatteri e lattobacilli e la riduzione di *Bacteroidetes spp* e *Clostridium spp*; e dall'altra che gli effetti antiinfiammatori del beta-carotene sono mediati dal microbiota intestinale (Rinninella et al. 2019).

Per quanto riguarda i metalli, anch'essi sono coinvolti in numerosi processi fisiologici batterici che influiscono sul microbiota intestinale. Uno studio condotto da Zackular et al. (2016) ha

evidenziato l'aumento dell'attività della tossina prodotta dal *Clostridium difficile* in topi colonizzati dal patogeno e alimentati con una dieta contenente un eccesso di zinco. Come dimostrato da Costante et al. (2017), la disponibilità di ferro influenza la composizione del microbiota: nei topi una dieta ricca di eme ha determinato la riduzione della diversità microbica, aumentando l'abbondanza di *Proteobacteria* e riducendo la presenza di *Firmicutes*.

1.5.7 I polifenoli ed il microbiota intestinale

Come è ormai noto, i polifenoli sono implicati nella prevenzione di numerose malattie come il diabete e l'obesità, e dunque rappresentano un argomento di crescente interesse per la comunità scientifica. Tuttavia, il loro assorbimento e la loro biodisponibilità nell'uomo rimangono poco chiari e controversi. In generale, i ricercatori sono concordi nell'affermare che le interazioni reciproche del microbiota intestinale e dei composti fenolici hanno un impatto rilevante sulla biodisponibilità di questi composti (Rinninella et al. 2019).

Diversi studi hanno dimostrato che i composti fenolici possono determinare un aumento dei microorganismi benefici. Come dimostrato da Ozdal e collaboratori (2016), tramite l'integrazione di antociani è stato rilevato un aumento di *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus* ed *Enterococcus spp*. Allo stesso tempo, modulando la trasformazione dei composti fenolici in metaboliti più piccoli, il microbiota gioca un ruolo chiave per quanto riguarda la biodisponibilità e le proprietà delle pro-antocianidine.

1.6 Effetto delle diete sul microbiota intestinale

Come già discusso nel paragrafo 1.2, le abitudini alimentari possono influenzare fortemente la composizione del microbiota intestinale.

L'occidentalizzazione della dieta può ridurre la diversità microbica intestinale in termini di phyla e genere portando a disbiosi, alterazione della funzione barriera, della permeabilità e del normale funzionamento delle cellule immunitarie, aumentando il rischio di insorgenza di malattie croniche. Per quanto riguarda, invece, le diete di eliminazione come quella a basso contenuto di FODMAP o quella senza glutine, sebbene in pazienti selezionati possano migliorare i sintomi di alcune malattie come IBS e celiachia, gli effetti a lungo termine sul microbiota intestinale richiedono delucidazioni. La dieta mediterranea, ad oggi, rimane la soluzione migliore per ottenere un microbiota diversificato e stabile, che assicuri la regolare attività delle funzioni immunitarie dell'ospite. Dunque, aumentando la conoscenza delle interazioni tra composti alimentari e batteri intestinali specifici, potrebbe essere adottato un nuovo approccio nutrizionale, basato sulla costruzione di una dieta personalizzata finalizzata alla modulazione ed al ripristino di un microbiota intestinale sano (*Rinninella et al. 2019*).

Al fine di illustrarne meglio vantaggi e criticità, nei prossimi paragrafi verranno presi in considerazione gli effetti di specifiche diete sul microbiota intestinale.

1.6.1 Effetto di diete vegane e vegetariane sul microbiota

A differenza degli onnivori, i vegetariani non consumano nessun tipo di carne e pesce. I vegani rappresentano un sottogruppo di vegetariani che escludono dalla loro dieta anche i prodotti di origine animale come le uova, il latte ed i latticini.

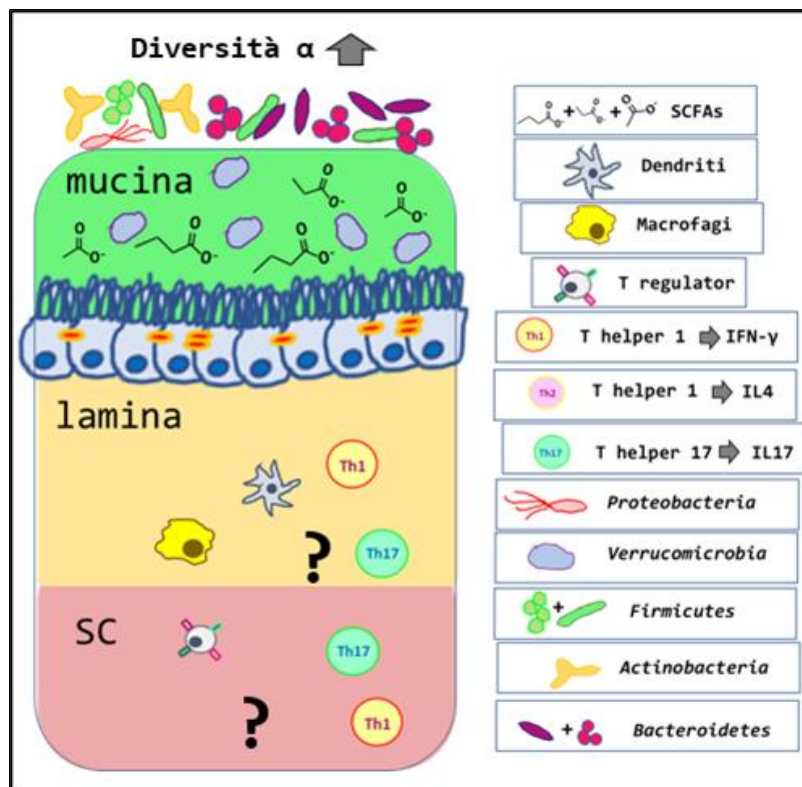


Figura 10. Effetto di diete vegane e vegetariane sul microbiota

Sono stati condotti diversi studi al fine di confrontare il microbiota intestinale di individui onnivori, vegetariani e vegani. Un lavoro di Matijašić et al. (2014), mostra che nei vegani e nei vegetariani rispetto agli onnivori, sono stati riscontrati rapporti più elevati di *Bacteroides/Prevotella*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium clostridioforme*, *Klebsiella pneumoniae* e *Faecalibacterium prausnitzii*; e rapporti inferiori di *Clostridium cluster XIVa* e *Bilophila wadsworthia*. Un lavoro di Zimmer et al. (2012), invece, ha evidenziato che in vegani e vegetariani la conta di specie *Bifidobacterium* e *Bacteroides* risulta più bassa, mentre non è stata rilevata alcuna differenza tra vegani ed onnivori dalla quantificazione dei livelli fecali di acidi grassi a corta catena e dalla produzione di metano attraverso il respiro.

Questi studi suggeriscono che le diete vegane e vegetariane influenzano il microbiota ma non è possibile trarre conclusioni sulla sua composizione a causa delle diverse metodologie utilizzate per la sua identificazione, e dell'eterogeneità del campione in termini di dimensioni, influenze dell'origine geografica, dell'età, del sesso e della massa corporea. Dovrebbero,

inoltre, essere considerati gli effetti sulla modulazione del microbiota intestinale dei polifenoli, molto presenti nelle diete vegane e vegetariane (Rinninella et al. 2019).

1.6.2 Effetto della dieta senza glutine sul microbiota

La celiachia è una malattia autoimmune in cui il glutine provoca una forte infiammazione intestinale. Poiché in grado di ripristinare la normale mucosa intestinale nei pazienti celiaci, negli anni '60 la dieta priva di glutine è stata riconosciuta come una potenziale cura ed al momento rimane l'unica terapia possibile per chi soffre di questa malattia.

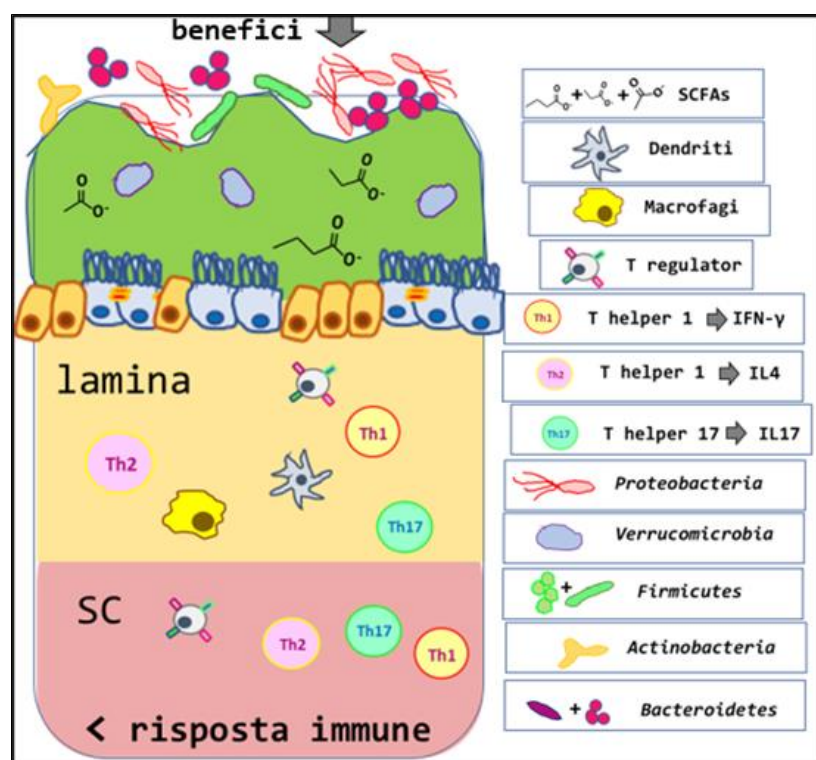


Figura 11. Effetto della dieta senza glutine sul microbiota.

De Palma e collaboratori (2009) hanno studiato gli effetti di una dieta senza glutine somministrata a soggetti sani per un mese, riscontrando una diminuzione di *Bifidobacterium*, *Clostridium lituseburense* e *Faecalibacterium prausnitzii* ed un aumento dei conteggi di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli*. Bonder et al. (2016) hanno evidenziato che le variazioni maggiori si verificano nella famiglia delle *Veillonellaceae*, diminuendone significativamente l'abbondanza nell'intestino di chi adotta una dieta senza glutine.

Nonostante la maggior parte dei lavori condotti al fine di valutare le variazioni del microbiota in seguito all'adozione di una dieta senza glutine presentino limitazioni importanti, tra cui campioni di piccole dimensioni e l'uso di tecniche a basso rendimento (come le tecniche di coltura e quelle molecolari non basate sul sequenziamento), è stata dimostrata una diminuzione di batteri benefici come *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Questo determina una diminuzione della produzione degli acidi grassi a corta catena, con conseguente riduzione dei loro effetti positivi sul metabolismo e sull'immunità dell'ospite (*Rinninella et al. 2019*). Inoltre, come dimostrato da diversi studi (*De Palma et al. 2009; Bonder et al. 2016; Sanz 2010; Di Cagno et al. 2011*) l'aumento di specie dannose quali *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Klebsiella*, potrebbe influenzare i profili microbici e l'omeostasi a lungo termine della mucosa intestinale di soggetti sani.

1.6.3 Effetto della dieta chetogenica sul microbiota

La dieta chetogenica è una dieta normo calorica a contenuto elevato di grassi e bassissimo di carboidrati, utilizzata in soggetti affetti da epilessia resistente ai farmaci e la sindrome da carenza di GLUT1. Nonostante sembri una terapia dietetica efficiente per la riduzione del peso in pazienti obesi, il mantenimento del peso corporeo raggiunto solitamente è problematico (*Rinninella et al. 2019*).

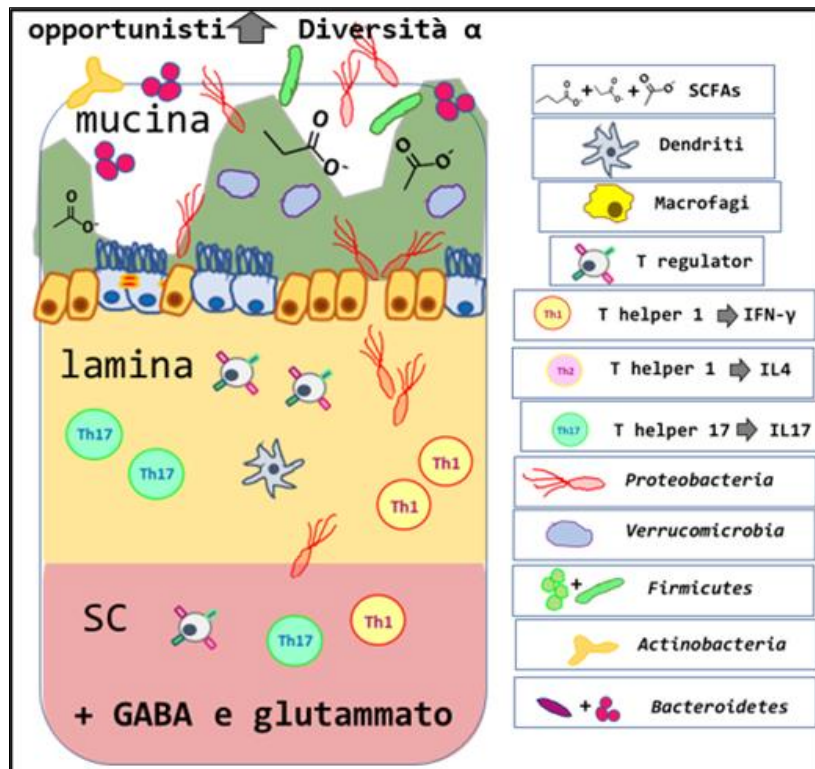


Figura 12. Effetto della dieta chetogenica sul microbiota.

Uno studio di Tagliabue e collaboratori (2017), si è focalizzato sul confronto della composizione del microbiota di pazienti trattati con la dieta chetogenica prima e dopo tre mesi di dieta, dimostrando un arricchimento in *Desulfovibrio spp.*, coinvolto nell'esacerbazione dell'infiammazione intestinale. Lindefeldt et al. (2019) studiando il microbiota di bambini affetti da epilessia prima e dopo tre mesi di dieta chetogenica, hanno riscontrato una diminuzione di bifidobatteri, *Eubacterium rectale* e *Dialister* ed un aumento di *E.coli* durante l'intervento. Poiché questa dieta comporta una riduzione dell'assunzione dei carboidrati, la diminuzione dei batteri benefici del microbiota intestinale, come i bifidobatteri, è associata all'introduzione limitata da parte dell'ospite di polisaccaridi. Dunque, sebbene la dieta chetogenica abbia un impatto positivo su un'ampia gamma di malattie, rimangono da chiarire gli effetti a lungo termine di questo trattamento dietetico sulla composizione del microbiota intestinale e conseguentemente sull'omeostasi dello strato di muco e sulle funzioni immunitarie, più nello specifico nei soggetti sani che adottano la dieta chetogenica per la perdita di peso (Rinninella et al. 2019).

1.6.4 Effetto di diete ad alto contenuto di glucosio o fruttosio sul microbiota

L'eccesso di zucchero nelle abitudini alimentari moderne è stato collegato all'obesità, a diverse malattie metaboliche come il diabete mellito di tipo II ed alle malattie cardiovascolari. In un lavoro condotto da Do et al. (2018), somministrando regimi dietetici distinti (dieta normale, dieta ad elevato contenuto di glucosio e dieta ad alto contenuto di fruttosio) a topi per 12 settimane, è stato studiato l'impatto della dieta ad alto contenuto di zucchero sul microbiota intestinale. Nei topi alimentati con la dieta ad elevato contenuto di glucosio e la dieta ad elevato contenuto di fruttosio è stata evidenziata una minore diversità microbica rispetto ai topi nutriti con la dieta normale; in particolare è stata riscontrata una diminuzione di *Bacteroidetes* ed un aumento di *Proteobacteria* oltre che un significativo aumento della permeabilità intestinale. Dunque, diete ad alto contenuto di glucosio o fruttosio possono modellare il microbiota intestinale, aumentando il rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* e la proporzione di *Proteobacteria*, causando anche l'alterazione della permeabilità intestinale e la maggiore espressione delle citochine infiammatorie nel colon.

1.6.5 Effetto della dieta a basso contenuto di FODMAP sul microbiota

I FODMAP (acronimo di "Fermentable, Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols", creato nel 2004 dalla Monash University) sono un gruppo di carboidrati e polioli altamente fermentescibili ma scarsamente assorbiti. Negli ultimi anni la dieta a basso contenuto di FODMAP è stata utilizzata da diversi medici soprattutto per il trattamento di malattie come l'IBS e l'IBD (Rinninella et al. 2019). Uno studio condotto da Halmos e colleghi (2014) mostra che in pazienti con IBS trattati con una dieta a basso contenuto di FODMAP, si evidenziano concentrazioni simili di acidi grassi a corta catena ed una riduzione dell'abbondanza batterica del 47% rispetto ad una dieta abituale. Una dieta a basso contenuto di FODMAP, infatti, potrebbe ridurre l'introduzione di prebiotici, portando così ad una scarsa presenza di batteri benefici all'interno del microbiota intestinale. Per contrastare questi squilibri ed in particolare ripristinare i livelli di *Bifidobacterium* l'integrazione con i probiotici sembrerebbe una buona soluzione; tuttavia, sono necessari studi più ampi per comprendere sia gli effetti a lungo termine delle diete a basso FODMAP sulla composizione del microbiota che i potenziali benefici dell'integrazione con probiotici (Rinninella et al. 2019).

1.6.6 Effetto della dieta occidentale sul microbiota intestinale

La dieta occidentale è un'abitudine alimentare ampiamente adottata nei paesi economicamente sviluppati e sempre più anche nei paesi in via di sviluppo, caratterizzata da un elevato apporto di grassi totali, proteine animali e zuccheri raffinati.

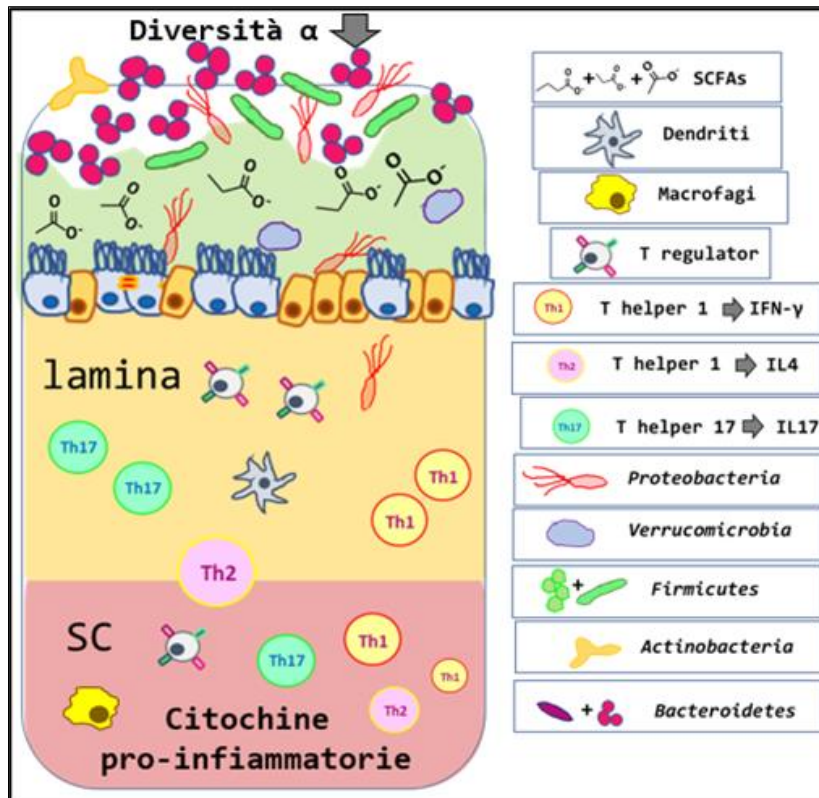


Figura 13. Effetto della dieta occidentale sul microbiota.

Come dimostrato da David et al. (2014), l'elevato consumo di proteine animali aumenta l'abbondanza di microrganismi bile-tolleranti, come *Alistipes*, *Bilophila* e *Bacteroides* e diminuisce i livelli di Firmicutes che metabolizzano i polisaccaridi vegetali dietetici come *Roseburia*, *Eubacterium rectale* e *Ruminococcus bromii*. Diversi studi hanno evidenziato che questo tipo di dieta ha effetti dannosi sul microbiota intestinale, inducendo scarsa diversità microbica e disbiosi, effetti negativi sulla mucosa intestinale ed infiammazione (Rinninella et al. 2019).

1.6.7 Effetto della dieta mediterranea sul microbiota

Il concetto di “dieta mediterranea” è stato sviluppato per descrivere le abitudini alimentari tipiche degli abitanti del bacino del Mediterraneo, principalmente in gran parte della Grecia e nell’Italia meridionale.

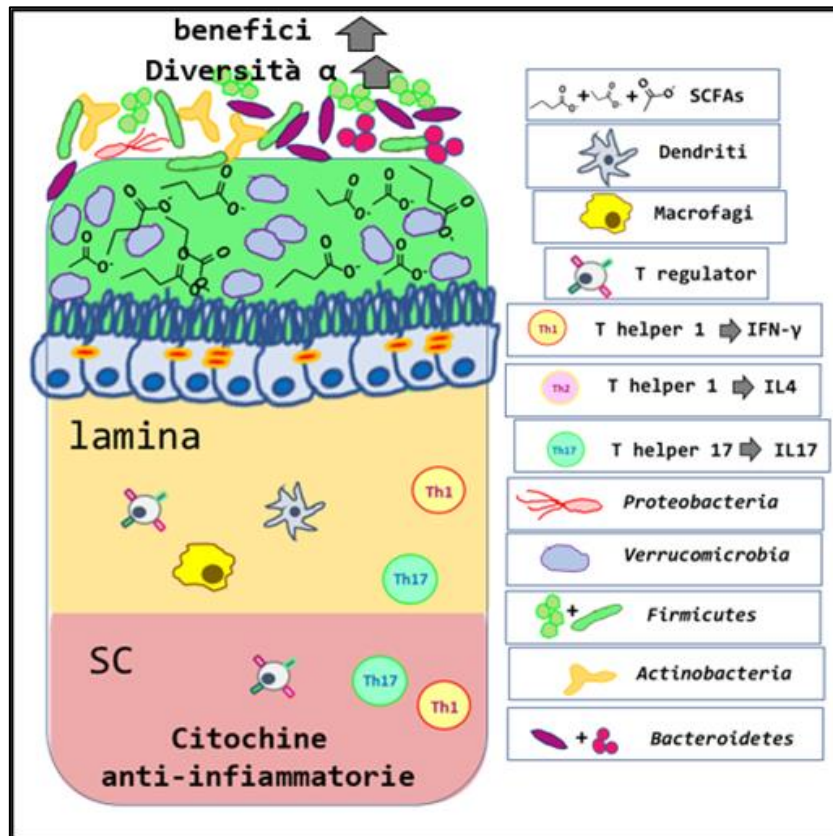


Figura 14. Effetto della dieta Mediterranea sul microbiota.

Questa dieta, essendo incentrata sul consumo di frutta, verdura, olio di oliva, noci, legumi e cereali integrali, apporta quantitativi elevati di MUFA, PUFA, polifenoli ed altri antiossidanti, fibre prebiotiche, carboidrati a basso indice glicemico e proteine di origine vegetali. Questo regime alimentare è stato collegato a numerosi benefici per la salute, come la riduzione del rischio di mortalità e la prevenzione di molte malattie come il diabete, la sindrome metabolica, il deterioramento cognitivo e la depressione (Rinninella et al. 2019). Per quanto riguarda i suoi effetti sul microbiota intestinale, Garcia-Mantrana e colleghi (2018) hanno evidenziato la correlazione tra una minore aderenza alla dieta mediterranea ed il rapporto *Firmicutes-Bacteroidetes* più alto. Inoltre, conte più elevate di bifidobatteri ed acidi grassi a corta catena totali erano collegate ad un maggior consumo di nutrienti di origine vegetale, come proteine

vegetali e polisaccaridi. De Filippis et al. (2016) e Mitsou et al. (2017) hanno sottolineato che l'aderenza alla dieta mediterranea ha un effetto benefico sul microbiota intestinale e sul profilo metabolomico associato, determinando un aumento dei batteri totali, del rapporto *Bifidobatteri/E. coli*, della quota relativa di *Bacteroides*, e degli SCFA totali, nonché una diminuzione dei livelli di *E.coli*.

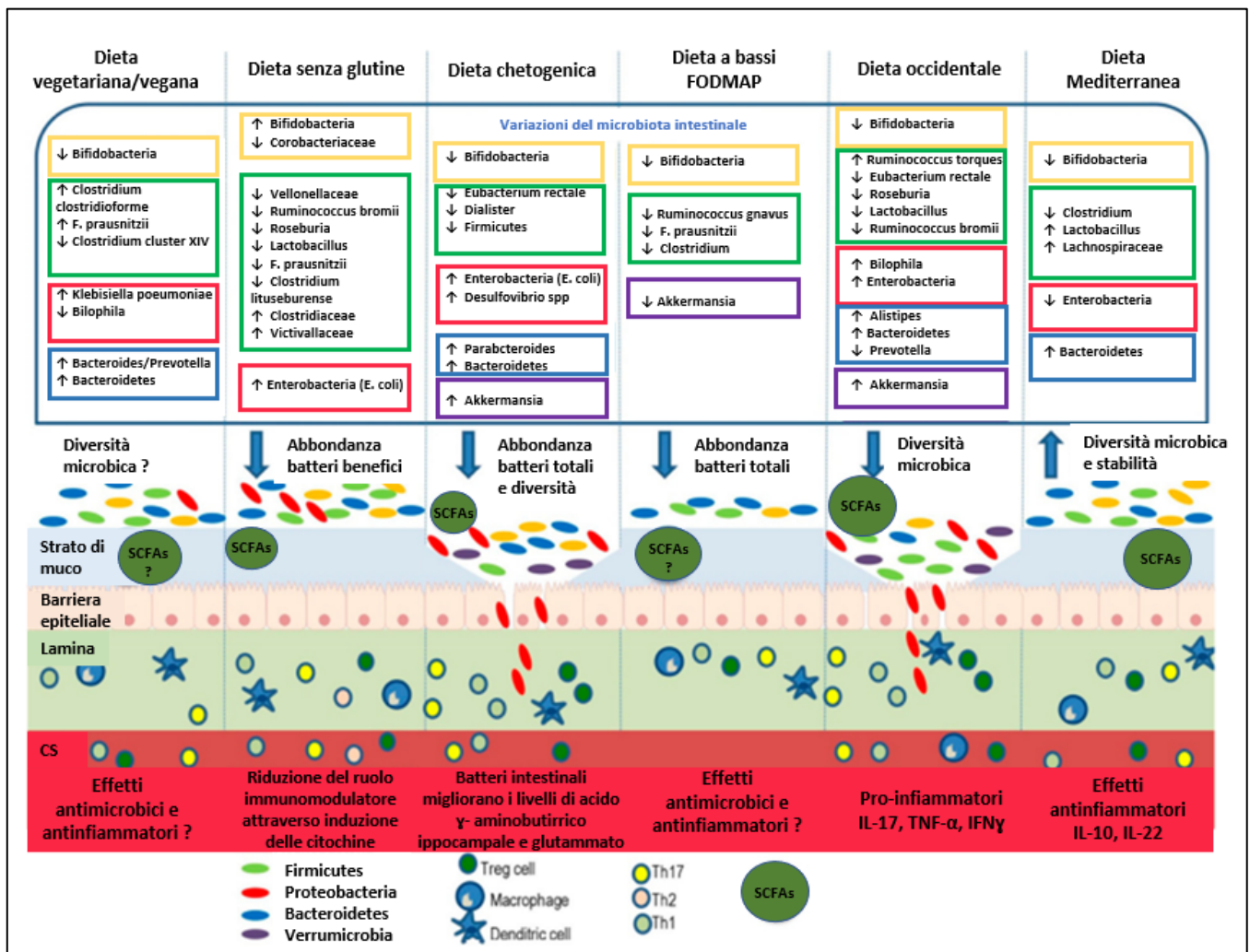


Figura 15. Effetti di diversi tipi di dieta sul microbiota intestinale, sullo strato di muco e sulle cellule immunitarie (Rinninella et al. 2019).

1.7 I modelli di fermentazione intestinale in vitro per lo studio del microbiota

I modelli di fermentazione intestinale in vitro furono inizialmente introdotti nelle ricerche di nutrizione e microbiologia applicata negli anni '90. La ricerca in vivo riguardante l'intestino umano, oltre ad essere limitata per motivi etici, è riservata principalmente a condizioni patologiche o a studi farmacologici, per questo, microbiologi e nutrizionisti negli ultimi vent'anni hanno messo a punto diversi modelli di fermentazione intestinale in vitro per mimare la digestione umana degli alimenti o dei loro singoli costituenti e studiare il cambiamento ed i ruoli del microbiota associato (*Guerra et al. 2012; Venema and Van den Abbeele 2013; Koutsos et al. 2017*).

Questi modelli sono notevolmente migliorati nel tempo, in particolare per quanto riguarda la somiglianza alla complessità delle fasi della digestione, la replicabilità delle condizioni sperimentali e la moltitudine di parametri ecologici da analizzare. Permettono, dunque, di avere a disposizione uno strumento utile e flessibile per indagare l'influenza sul microbiota intestinale di un'ampia varietà di fattori come i composti presenti in una determinata dieta (ad esempio i probiotici), i microrganismi patogeni, le sostanze bioattive, farmaceutiche e tossiche (*Nissen, Casciano e Gianotti, 2020*).

La logica dei modelli in vitro è quella di coltivare nel modo più rappresentativo possibile il microbiota intestinale umano sotto condizioni ambientali regolate. L'applicazione principale è quella di concentrarsi sullo spostamento dei gruppi microbici e delle specie selezionate insieme ai loro metaboliti, saggiando nel tempo la loro diversità, ricchezza ed abbondanza nella comunità. Inoltre, è possibile studiare come viene digerito un composto, quali sono le vie metaboliche attivate, il tipo e la quantità dei metaboliti prodotti. È auspicabile che ulteriori prospettive si focalizzino sui problemi determinati da agenti patogeni, sull'ecologia delle sindromi intestinali, e sulle interazioni del microbiota intestinale con composti prebiotici all'interno delle matrici alimentari complesse (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*).

Molti modelli adottano un inoculo fecale proveniente da donatori sani o malati, al fine di mimare al meglio l'ecosistema di indagine desiderato correlato al colon. La maggior parte di questi modelli, tuttavia, manca di feedback da parte dell'ospite, infatti, non sono presenti cellule epiteliali e cellule immunitarie, le quali sono importanti componenti nelle interazioni ospite-microbo (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*). I diversi modelli intestinali in vitro più

famosi attualmente disponibili variano in complessità, riproducibilità e versatilità, fornendo una varietà di opzioni per condurre la nutrizione in vitro e la ricerca sull'ecologia microbica. La somiglianza con la realtà è la caratteristica principale per una simulazione di successo e potrebbe essere basata sia sulla complessità del finto microbiota che sull'ambiente creato tramite i parametri impostati nei reattori (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*). Come suggerito da Nissen, Casciano e Gianotti (2020) attualmente i modelli più competitivi devono includere un microbiota intestinale complesso, piccoli volumi di lavoro, compartimenti distinti interconnessi tra loro, ambienti biochimici ed ecologici rigorosi e controllati da un computer, così come l'accessibilità senza l'introduzione delle mani per non contaminare il finto microbiota. Per scegliere il modello più adatto allo studio da eseguire, è necessario conoscerne le caratteristiche, i vantaggi ed i limiti di ognuno.

Verranno dunque presentati i modelli intestinali più utilizzati, focalizzandosi sul loro concetto base di funzionamento, le caratteristiche tecniche e le applicazioni di ricerca.

1.7.1 I modelli di fermentazione in batch

La riproduzione dell'ecosistema del microbiota intestinale con modelli di fermentazione in batch (BFM) è l'approccio più semplice, versatile e accessibile perché è caratterizzato da un ambiente anaerobico chiuso e da una simulazione di breve durata. Questi modelli statici implicano che il test termini quando il substrato è esaurito e di conseguenza l'accumulo di metaboliti microbici tossici interrompe l'equilibrio microbico iniziale. I BFM possono essere organizzati variando i gradi di complessità, passando da flaconi chiusi inoculati con specie microbiche definite, a reattori controllati che lavorano con sospensioni fecali (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*). Tipicamente, i BFM vengono utilizzati per studiare l'interazione di un dato composto con il microbiota intestinale. Le condizioni ecologiche nei reattori controllati sono guidate da una piastra riscaldante per la temperatura, un sistema di dosaggio di alcali o acidi per il mantenimento di un pH stabile e N₂ che gorgoglia su un mezzo chimico basale per l'anaerobiosi e la nutrizione. Studi di fermentazione in batch condotti da Liu, Gibson e Walton (2016) hanno dimostrato l'effetto prebiotico di trans-galattooligosaccaridi (B-GOS) e inulina, mentre uno studio di Sarbini et al. (2011) ha provato l'effetto selettivo della destrina sul microbiota intestinale, sugli acidi grassi a corta catena (SCFA) e sulla produzione di gas.

Questo tipo di sistemi presentano lo svantaggio di avere una somiglianza limitata alle condizioni in vivo, ma il vantaggio di avere un costo accessibile, di essere logisticamente flessibili e facili da usare (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

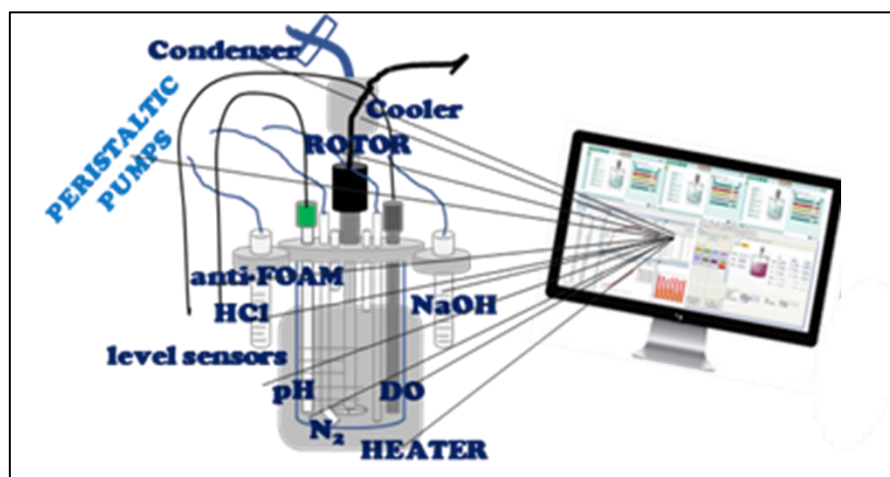


Figura 16. Un modello single batch MiniBio (Applikon Biotechnology, NL) controllato dal computer.

1.7.2 I modelli di fermentazione dinamica

Maggiore somiglianza alle condizioni in vivo possono essere ottenute con i modelli di fermentazione dinamica (DFM). Questi permettono di valutare le risposte del microbiota intestinale ai composti alimentari nell'arco di un tempo prolungato e spazialmente su un ecosistema più complesso delle diverse nicchie del tratto gastrointestinale. Nei DFM il sistema è costantemente alimentato da nutrienti essenziali tramite pompe peristaltiche e l'ambiente ecologico è rigorosamente mantenuto, dunque in questi sistemi il microbiota intestinale non si confronta con i problemi di mancanza di nutrienti (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

La maggior parte dei DFM umani presentano una configurazione a più fasi, come il modello realizzato originariamente presso l'Università di Reading (Fig 17), costituito da tre recipienti connessi tra loro (Gibson, Cummings e Macfarlane 1988).

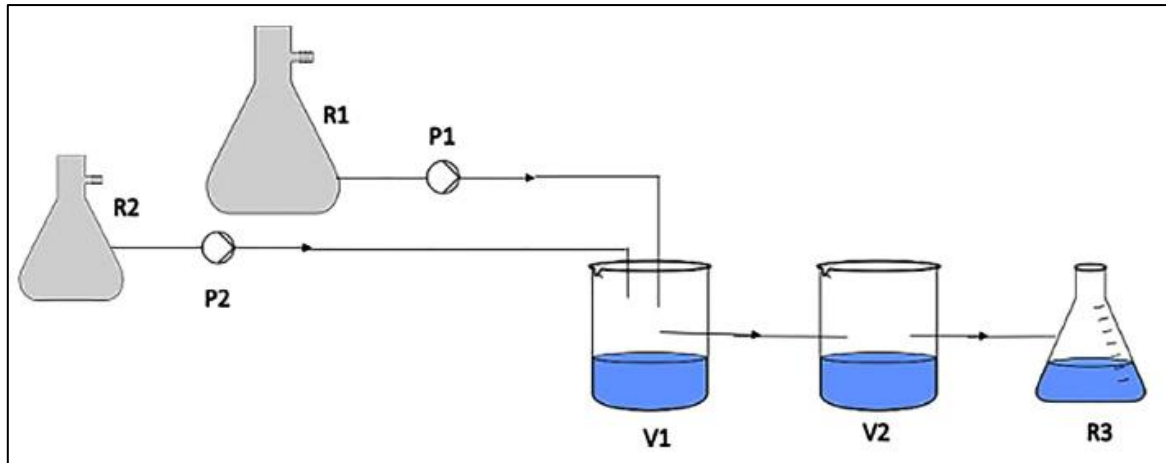


Figura 17. Sistema di coltura in continuo a tre stadi (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

Questi recipienti sono allineati in serie per imitare le nicchie ecologiche del colon prossimale, trasversale e distale. L'atmosfera microaerofila e anossica viene mantenuta ai livelli desiderati distribuendo dosi di N_2 o O_2 , guidati da sensori di ossigeno disciolto (DO) o agitatori meccanici. Il dosaggio di N_2 è preferito rispetto a quello di CO_2 , perché quest'ultima può influenzare il pH. Il primo recipiente è caratterizzato da un ambiente lievemente acido ed abbondanza nutrizionale, questo induce una rapida crescita del microbiota intestinale similmente a quello che accade nel colon prossimale. Invece, negli altri recipienti il pH è neutro, i substrati sono scarsi e questo causa una lenta crescita del microbiota intestinale, analogamente alle regioni distali del colon. Lungo tutto il sistema la vitalità delle popolazioni del microbiota intestinale, derivante da un campione fecale, è mantenuta grazie alla temperatura stabile ed all'uso di un mezzo nutrizionale basale (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

Hobden et al. (2013) hanno testato l'effetto della destrina di grano sul microbiota intestinale utilizzando un modello a tre stadi, mentre Costabile et al. (2015) hanno utilizzato un modello dinamico per studiare differenti formulazioni di succo di arancia in relazione alla funzionalità probiotica. Quest'ultimo studio ha dimostrato uno spostamento effettivo del microbiota collegato a quei succhi arricchiti con supplementi probiotici, come l'aumento dell'abbondanza di *Bifidobacterium spp.* e la riduzione del gruppo del *Clostridium histolyticum*, così come la produzione maggiore di acidi grassi a corta catena. Questi output sono stati ottenuti mediante tecniche FISH ed analisi gascromatografiche.

Questo sistema più complesso ha una riproducibilità limitata a causa di possibili fluttuazioni sulle impostazioni dei parametri, ma è conveniente, personalizzabile e semplice da utilizzare (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

1.7.3 Il modello in vitro del colon TNO (TIM-2)

Il TIM-2 è un modello brevettato del colon in vitro sviluppato dall'Organizzazione olandese per la ricerca applicata situata all'Aia. Può funzionare insieme al TIM-1, che simula le nicchie ecologiche dello stomaco e dell'intestino tenue. Il modello combinato è stato accettato dalle più importanti agenzie di regolamentazione in tutto il mondo e potrebbe includere alcuni componenti aggiuntivi, come il segmento intestinale e le colture cellulari umane. Finora, TIM-1 insieme a TIM-2 possono simulare l'intero tratto gastrointestinale umano (Nissen, Casciano e Gianotti 2020). Concentrandosi solo sul TIM-2, il sistema è un DFM, la maggior parte dei parametri sono gestiti da un computer, ed è diviso in quattro scomparti funzionanti, che mimano la parte prossimale dell'intestino crasso. Oltre alle caratteristiche ecologiche standard, un software controlla l'assorbimento dell'acqua ed i metaboliti microbici da una membrana semipermeabile. È presente un sistema di dialisi, con l'intento di prevenire un accumulo di metaboliti tossici. Successivamente, il software può analizzare il rilascio, la bioaccessibilità ed il profilo di interazione delle sostanze di dosaggio in ogni singolo comparto. Il TIM-2 è caratterizzato anche da un flusso di acqua riscaldata all'interno dei quattro contenitori di vetro ed una membrana flessibile che si schiaccia in modo simile alla peristalsi, favorendo anche la miscelazione ed il movimento dei liquidi intestinali (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

Il microbiota intestinale è derivato dall'inoculo di sospensioni fecali umane (Maathuis et al. 2009; Reimer et al. 2014) ed è alimentato con un mezzo speciale, denominato SIEM (mezzo di efflusso ileale simulato), costituito da un complesso di zuccheri, proteine indigeribili, bile residua insieme a minerali e vitamine selezionate (Koen et al. 2000; Van Nuenen, Meyer e Koen 2003). Prima di iniziare l'esperimento, il microbiota intestinale necessita di acclimatarsi per circa 16 ore, in seguito il periodo sperimentale dura 72 ore.

La crescita del microbiota intestinale è combinata con N₂ che viene fatto gorgogliare, in modo da mantenere il potenziale redox intorno a 300 mV, come rilevato nel colon umano. Gli acidi risultanti dal metabolismo microbico sono neutralizzati attraverso il rilascio di NaOH; questo

contribuisce a mantenere il pH del sistema intorno a 5.8, valore riscontrato nel colon prossimale (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

Hanno condotto studi con il TIM-2 Aguirre et al. (2014), mostrando come la fermentazione di diversi carboidrati non digeribili proceda diversamente per il microbiota intestinale di soggetti magri ed obesi; Kortman et al. (2016) hanno evidenziato come i preparati di ferro modifichino il microbiota intestinale; mentre Sàyago-Ayerdi, Zamora-Gasga e Venema (2019) hanno dimostrato il potenziale prebiotico della buccia di mango.

Lo studio di Aguirre et al. (2014), applicando l'apparato NGS Roche, ha riscontrato differenze nel rapporto *Bacteroidetes/Firmicutes*, nonché diverse proporzioni di *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, quando venivano integrati diversi prebiotici. Inoltre, i dati sequenziati sono stati accoppiati con gli SCFA (acidi grassi a corta catena), i BCFA (acidi grassi a catena ramificata), ed alla valutazione dell'ammoniaca e del lattato.

Questo tipo di sistema presenta lo svantaggio di essere dispendioso in termini di tempo, fatica e costi, ma possiede il vantaggio di avere un'elevata somiglianza ai sistemi in vivo, le condizioni sperimentali sono molto riproducibili e risulta adattabile a stanze di laboratorio piccole (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

1.7.4 Il simulatore SHIME®

Il simulatore dell'ecosistema microbico intestinale umano (SHIME) è un sistema brevettato sotto il patrocinio di ProDigest e dell'Università di Ghent. È composto da cinque reattori collegati, costruito in serie per riprodurre l'intero tratto gastro-intestinale, dal tratto gastrico al colon distale (Van den Abbeele et al. 2010). I reattori sono recipienti di vetro a doppia camicia collegati tra loro da pompe peristaltiche (Fig 18). I primi due simulano rispettivamente lo stomaco e l'intestino tenue, ad intervalli precisi viene pompato un mezzo nutritivo nel primo, mentre i succhi pancreatici e biliari nel secondo (Venema e Van den Abbeele 2013). Le tre sezioni del colon sono costituite da compartimenti con diversa capacità di lavoro, cioè 500 mL, 600 mL e 800 mL, sono soggetti ad agitazione ininterrotta delle giranti, e presentano valori di pH somiglianti ai valori in vivo (Van den Abbeele et al. 2010).

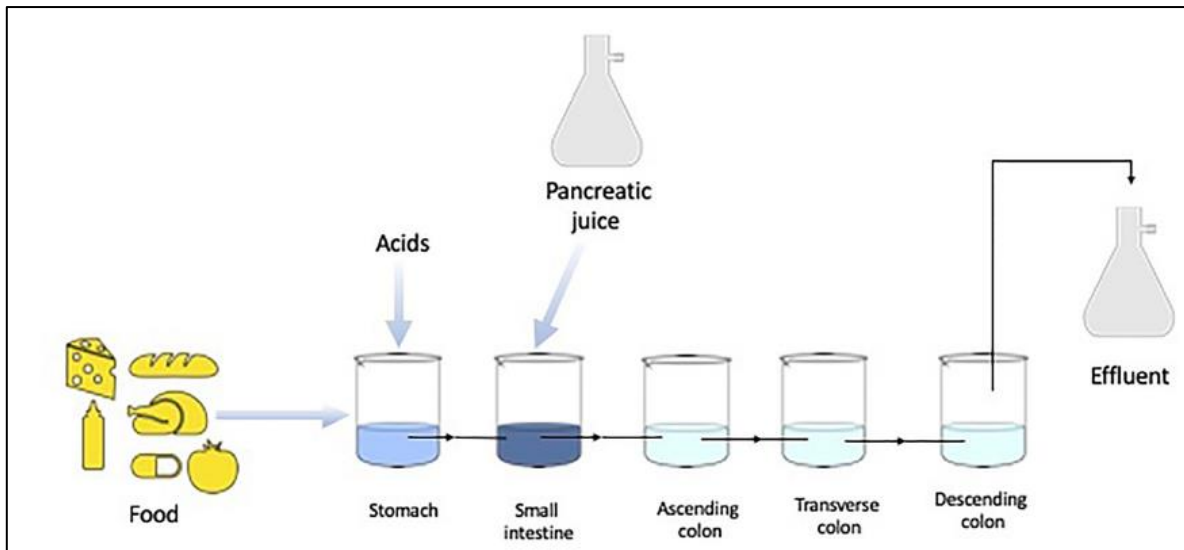


Figura 18. Rappresentazione schematica del SHIME (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

L'inoculo microbico del grande intestino è un campione di feci da donatori sani, che necessita di almeno 14 giorni di acclimatazione al regime ecologico dei reattori, in modo che i microbi fecali possano avanzare verso un microbiota intestinale del colon rappresentativo (Van den Abbeele et al. 2010; Venema e Van den Abbeele 2013)

Il sistema SHIME è un utile strumento in vitro per condurre indagini preliminari sulle interazioni tra ecosistemi microbici complessi, come dimostrato da Giuliani et al. (2019), i quali hanno indagato l'effetto dei sottoprodotti vegetali sul microbiota umano. Terpend et al. (2013) e Van de Wiele et al. (2004) hanno utilizzato il sistema SHIME per studiare l'effetto sul microbiota intestinale di arabinogalattani, FOS e inulina nativa di cicoria.

Questo tipo di sistema richiede un elevato dispendio di tempo e fatica, non è adatto a piccoli laboratori, e non è accessibile in termini di costi, ma ha probabilmente la maggiore somiglianza ai sistemi in vivo rispetto agli altri modelli (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

Recentemente è stato introdotto l'M-SHIME, che rispetto alla versione precedente combina un segmento distinto per i microorganismi associati allo strato di mucina (Fig 19) (Van den Abbeele et al. 2011b). Infatti, una simulazione più realistica della microbiologia intestinale prevede l'inclusione di un microbiota rappresentativo associato allo strato di mucina fissato sull'epitelio (Swidsinski et al. 2008; Van den Abbeele et al. 2011c; Belzer e de Vos 2012).

La mucina è una glicoproteina molto viscosa presente nei secreti mucosi del tratto respiratorio e gastro-intestinale, che svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'epitelio. In vivo, la

popolazione microbica associata allo strato di mucina interagisce più efficacemente con l'epitelio rispetto al microbiota associato al lume intestinale, risultando così cruciale per generare effetti immunomodulatori (Lievin-Le Moal e Servin 2006). Una delle principali funzionalità del microbiota di questa nicchia è la degradazione dei glicani dal muco dell'ospite (Derrien et al.2004). I metaboliti specifici prodotti servono successivamente come substrati per il microbiota intestinale del lume, influenzando direttamente la sua composizione (Schroeder 2019).

Lo strato di muco è abitato principalmente da *Archaea metanogeni*, batteri solfato-riduttori e batteri acetogeni (Nava et al.2012; Nkamga, Henrissat e Drancourt 2017; Singh et al. 2019).

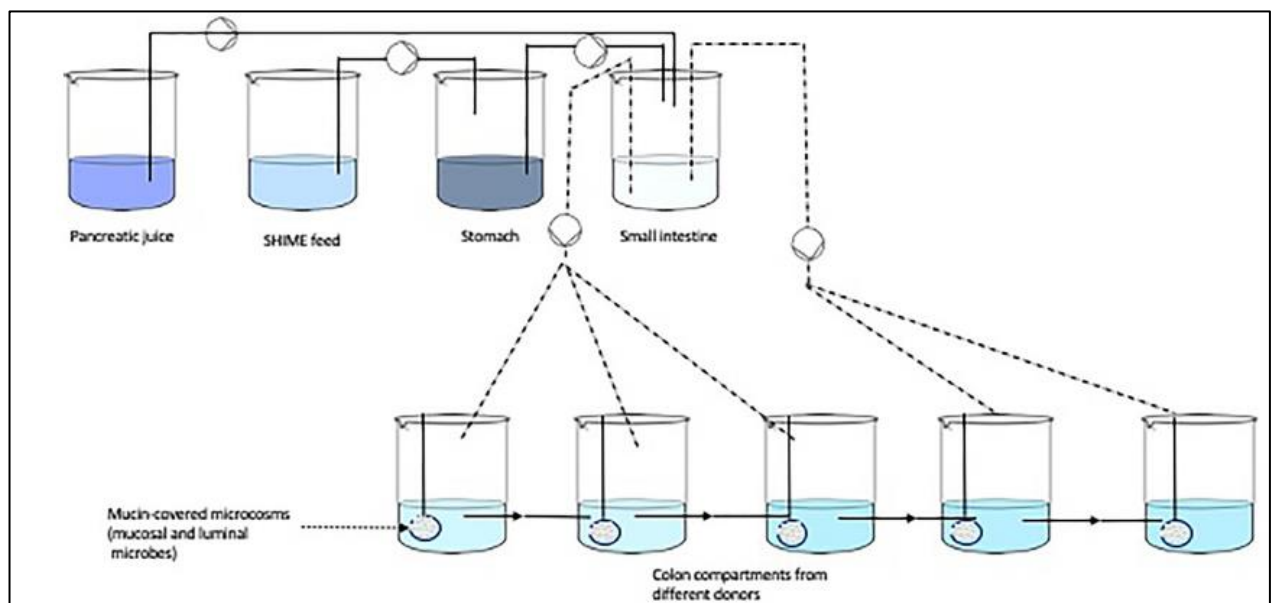


Figura 19. Rappresentazione schematica dell'M-SHIME (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

In uno studio di Truchado et al. (2017) questo modello è stato utilizzato per studiare gli effetti modulatori degli arabinossilani a lunga catena (LC-AX) nei confronti del microbiota luminale e mucoso. I risultati del sequenziamento 16S del microbiota con il Miseq (Illumina, Hayward, CA) ed i dosaggi in GC degli acidi grassi volatili suggeriscono un potenziale beneficio prebiotico degli LC-AX in quanto avevano determinato l'arricchimento di *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Roseburia* ed *Enterococcus*.

1.7.5 Il simulatore gastro-intestinale: SIMGI

Il modello SIMGI è un sistema multicamera in grado di replicare l'intero tratto gastro-intestinale umano sviluppato in Spagna presso l'Istituto di ricerca di Scienze degli alimenti (CIAL-CSIC-UAM, Madrid, Spagna) (Barroso *et al.* 2015). Il modello è composto da cinque reattori controllati da remoto tramite PC con software dedicato e connessi da pompe peristaltiche. Le prime due unità rappresentano il settore gastrico ed il piccolo intestino, mentre gli altri tre rappresentano le tre sezioni principali dell'intestino crasso (Fig 20).

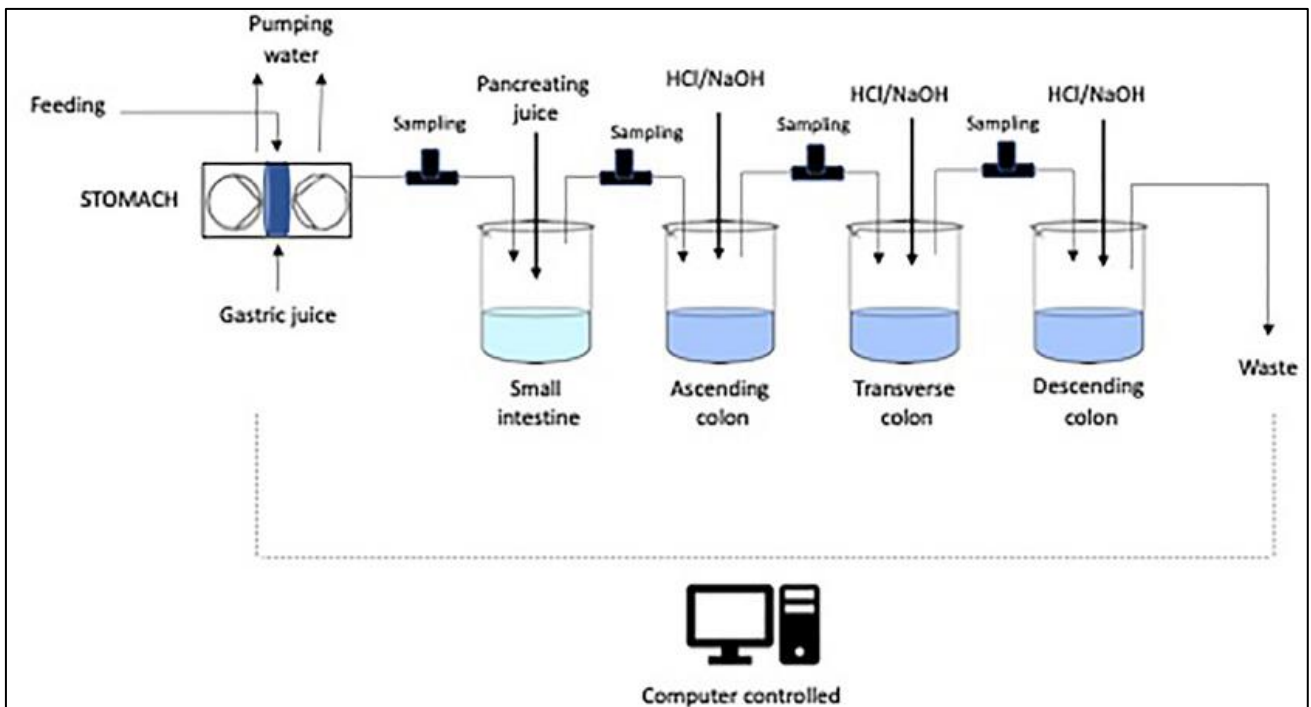


Figura 20. Diagramma schematico del SIMGI (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

Nella prima unità due moduli, separati da una giacca in mezzo, sono posti sopra una vasca, il serbatoio viene utilizzato come riserva per i succhi gastrici, e la giacca mobile serve a miscelare il suo contenuto con l'ausilio di flussi di acqua. Le altre quattro unità a valle sono invece reattori di vetro dove il mezzo viene tenuto in agitazione impiegando agitatori magnetici. Similmente ad altri modelli DMF, grazie all'impostazione di parametri specifici di pH ed atmosfera, le condizioni ecologiche sono distinte in ogni compartimento (Nissen, Casciano e Gianotti 2020). Il periodo sperimentale può durare fino a 6 giorni, a seconda della simulazione desiderata dallo studio (Barroso *et al.* 2015). Gli studi con il SIMGI hanno dimostrato l'effetto della mucillagine dei semi di chia (Tamargo *et al.* 2018) e del vino rosso (Cueva *et al.* 2015) sul

microbiota intestinale umano. I risultati di Tamargo et al. (2018) sono stati ottenuti con una coltura microbiologica dipendente e con analisi SPME-GCMS degli SCFA ed hanno dimostrato che nessun cambiamento significativo ha influenzato i gruppi microbici del microbiota del colon, anche se sono stati evidenziati aumenti significativi della produzione di SCFA. Da un lato gli studi condotti con questo simulatore necessitano di molto tempo e sono meno realistici e riproducibili a causa dei parametri ambientali meno rigorosi, dall'altro il SIMGI risulta essere accessibile dal punto di vista economico, logisticamente flessibile e facile da usare (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*).

1.7.6 Il modello intestinale polifermentatore (PolyFermS)

La riproduzione del microbiota intestinale utilizzando un inoculo fecale, sebbene sia un metodo versatile e vantaggioso, è stato messo in discussione, soprattutto perché non tiene conto delle diverse abilità e strategie utilizzate dai microrganismi per colonizzare e resistere negli epiteli intestinali dell'ospite. I gruppi microbici più resistenti alla fame sono in grado di superare gli altri, determinando uno spostamento ecologico che limita la somiglianza del modello alla realtà, in quanto popolazioni essenziali, finora meno aggressive nella lotta per il substrato intestinale, diventano non competitive (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*). Un altro esempio che allarga il difetto è la mancanza di campioni di feci di popolazioni microbiche associate ad un biofilm (*Macfarlane e Macfarlane 2007; Macfarlane e Dillon 2007*).

Per risolvere questo problema e mantenere un certo livello di diversità ed abbondanza di specie durante esperimenti a lungo termine, è stato sviluppato un processo di immobilizzazione, che consiste nell'intrappolare il microbiota fecale tramite una tecnica di micro-incapsulamento (*Le Blay et al. 2010; Zihler et al. 2011; Payne et al. 2012; Dostal et al. 2013*).

Il primo sistema ad applicare questa tecnologia è stato il PolyFermS model, un DFM realizzato presso l'ETH di Zurigo da un mandato europeo congiunto (*Zihler-Berner et al. 2013*).

Ciascuno dei cinque reattori del modello possiede un inoculo microbico indipendente ed il modello può mantenere una comunità microbica stabile sotto uno stress test di 38 giorni. Inoltre, il microbiota artificiale assomiglia al microbiota fecale di un donatore sano, preservando i principali gruppi batterici tassonomici nel corso degli esperimenti sia in termini di diversità che di abbondanza (*Zihler-Berner et al. 2013*).

Il modello (Fig 21) è composto da un reattore contenente l'inoculo per il colon prossimale superiore fatto di microbiota intestinale micro-incapsulato. Il contenuto di questa sezione viene utilizzato per rifornire continuamente i reattori a valle disposti in parallelo, che funzionano di conseguenza con le condizioni ambientali del colon prossimale. I reattori di secondo stadio servono come controllo per confrontare la risposta a caratteristiche sperimentali (Zihler-Berner et al. 2013; Poeker et al. 2018).

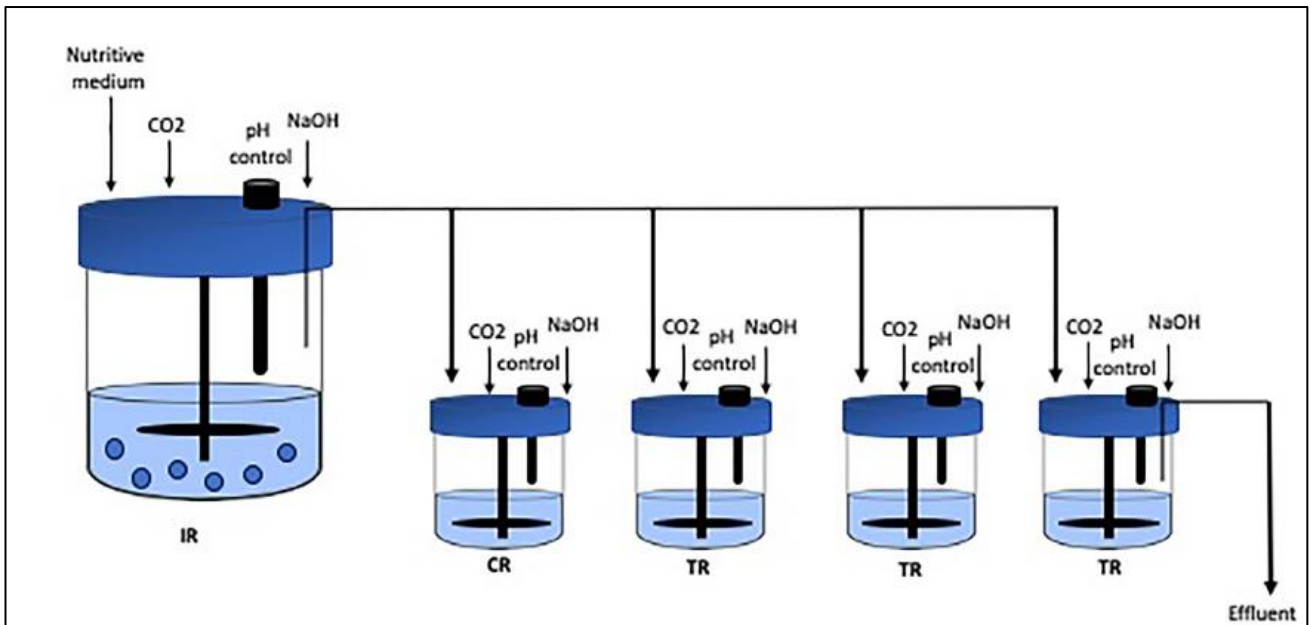


Figura 21. Design del modello intestinale Polifermentatore PolyFermenter S (Nissen, Casciano e Gianotti 2020)

PolyFermenter S è stato utilizzato per valutare gli effetti di modulazione del microbiota intestinale di fibre alimentari fermentabili (Poeker et al. 2018) e per studiare l'impatto di alcuni componenti di formulati per neonati che imitano il latte materno, sul microbiota intestinale infantile (Doo et al. 2017). Poeker et al. (2018), accoppiando HPLC, SYBR Green qPCR e sequenziamento MiSeq 16S (Illumina, San Diego, CA, USA) hanno dimostrato correlazioni positive di *Prevotellaceae* con il propionato e *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* con il butirato dopo un'integrazione prebiotica. L'utilizzo di Polyfermenter S richiede tempo e fatica, ma sembra essere molto stabile nel tempo, migliorando il parallelismo con le condizioni in vivo (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

1.7.7 Modelli componibili

Il modello in vitro Mini-Bio è un sistema brevettato da Applikon Biothecnology (Delft, Paesi Bassi) recentemente introdotto nella ricerca applicata. Mini-Bio rappresenta un sistema in vitro flessibile, che può funzionare come BFM o DFM, in grado di generare numerosi dati ad alta velocità, i quali vengono controllati, analizzati e archiviati da un potente software dedicato.

I parametri per le varie condizioni colturali vengono salvati in un database e caricati direttamente nel sistema per replicare esattamente gli esperimenti già eseguiti (*O'Donnell et al. 2018*). La principale novità di questo modello è la capacità del software di supervisionare da remoto la fermentazione e di controllare esperimenti paralleli, gestendo fino a 32 bioreattori (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*). Il volume di lavoro di ogni bioreattore di vetro può essere regolato in base alle condizioni desiderate, fino ad un minimo di 50 ml. Inoltre, diversi dispositivi consentono di ottenere prestazioni superiori, ad esempio: un set di giranti meccanici che muovendosi fino a 2000 rpm permettono di coltivare colture cellulari ad alta densità o in mezzi viscosi; un sistema antischiuma integrato con sensori di livello; spargitori di gas regolati da quattro controllori di flusso di massa; sei pompe digitali a velocità regolabile o micro valvole di aggiunta (microlitri); un sistema di auto-settaggio che regola i cambiamenti delle condizioni di processo durante la fermentazione; un dispositivo per il controllo e la regolazione rapida della temperatura; un condensatore elettrico in grado di mantenere un'atmosfera pura ed una microcamera ottica per monitorare la qualità della coltura cellulare (*Lattermann e Buchs 2015*). I sistemi Mini-Bio sono stati utilizzati da Levi e Lesmes (2014) per sviluppare un modello in grado di imitare le condizioni del canale alimentare di soggetti anziani, utile per lo studio di alimenti e formulazioni orali sviluppati per soddisfare le esigenze geriatriche.

I sistemi Mini-Bio hanno lo svantaggio di essere meno accessibili dal punto di vista economico, ma presentano il vantaggio di essere flessibili, inseribili sotto una cappa da laboratorio, e di garantire un'elevata riproducibilità grazie all'impostazione ed al controllo rigorosi dei parametri (*Nissen, Casciano e Gianotti 2020*).

1.7.8 Il modello in vitro dell'intestino tenue (TSI)

Il modello TSI è un DFM composto da cinque reattori funzionanti con un volume minimo di 12 mL ciascuno, che simula il transito attraverso l'intestino tenue (Cieplak et al. 2018). Ogni reattore è sigillato in una camera in PVC ed insieme sono compressi in un box in cui la temperatura è costantemente impostata da un flusso liquido proveniente da un serbatoio di circolazione dell'acqua, riscaldato da un termostato a serpentina (Nissen, Casciano e Gianotti 2020). L'atmosfera è mantenuta stabile dal costante gorgoglio di N₂ o da un catalizzatore di anaerobiosi tradizionale. Un agitatore magnetico a piastre diviso in cinque unità determina l'agitazione del mezzo, mentre una camera di dialisi simula l'assorbimento dei nutrienti. Attraverso la copertura settica mediante cui i reattori sono isolati, la sonda del pH ed un ago possono essere introdotti per effettuare l'aggiunta di succhi pancreatici ed il campionamento di input e output per la camera di dialisi (Cieplak et al. 2018).

I parametri principali sono controllati da un computer. Il range di pH, ad esempio, è monitorato grazie al dosaggio automatico di alcali ed acidi tramite una specifica scrittura codificata in Software Matlab (The MathWorks, MA). Inoltre, fluidi gastrici ed intestinali artificiali vengono utilizzati per replicare la composizione elettrolitica e la pressione osmotica come quelle che si verificano in vivo (Minekus et al. 2014).

Cieplak et al. (2018) hanno testato con il modello TSI il comportamento di tre presunti ceppi probiotici di *Lactobacillus* e ricorrendo ad una coltura microbiologica dipendente hanno dimostrato la sopravvivenza dei ceppi che passano attraverso il tratto gastrointestinale.

Il TSI ha lo svantaggio di essere meno realistico e riproducibile a causa di impostazioni ambientali meno rigide, ma il vantaggio di essere logisticamente flessibile e facile da usare (Nissen, Casciano e Gianotti 2020).

1.7.9 Modelli con microbiota rappresentativo non fecale

La maggior parte dei modelli intestinali in vitro utilizza una sospensione fecale come inoculo, quindi la possibilità di creare una comunità microbica complessa e riproducibile è limitata (Fehlbaum et al. 2015). Inoltre, l'ostacolo principale è la complessità del microbiota intestinale, che possiamo definire un'entità multiforme (Lederberg 2000). Infatti, oltre alla presenza di 2000 specie batteriche che risiedono nell'intestino, esiste una diversità interpersonale (Chong

et al. 2019). Dunque, per studiare l'ecologia intestinale aumentando la somiglianza al microbiota intestinale, come modelli sono state suggerite popolazioni microbiche definite (*De Roy et al. 2014*). Schäpe et al. (2019) per le applicazioni in modello in vitro hanno proposto un microbiota intestinale umano di base esteso (SIHUMIX). Questo finto consorzio microbico è composto da otto specie batteriche (*Anaerostipes caccae*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bifidobacterium longum*, *Blautia producta*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium ramosum*, *Escherichia coli K-12* e *Lactobacillus plantarum*) che guidano i principali eventi metabolici raggiunti in vivo nell'intestino (*Becker et al. 2011*). Secondo Guzman-Rodriguez et al. (2018) l'uso di un modello fondamentale di microbiota ed il rispetto del microbiota fecale, trasmettono una più chiara valutazione dell'influenza degli input ecologici sulla composizione e la funzione del microbiota riprodotto; mentre Vandeputte et al. (2016) sottolineano che la principale limitazione delle comunità microbiche semplificate rispetto a quelle complesse è la minore stabilità in una procedura a lungo termine.

2. Studio di ricerca sperimentale

Il lavoro relativo alla parte sperimentale di questa tesi è stato condotto presso il DiSTAL dell'Università di Bologna, utilizzando il modello in vitro intestinale MICODE (Multi-Unit In vitro Colon Model) nel setting del colon prossimale.

È stato testato un prodotto alimentare innovativo: un pane arricchito con fibra ricca di polifenoli estratta dalle olive durante la produzione dell'olio extra vergine.

Per poter comprendere il potenziale prebiotico dell'alimento arricchito, questo è stato paragonato ad un pane di controllo non arricchito e ai frutto-oligosaccaridi (FOS).

3. Obiettivo e scopo

Oggi, per garantire una maggiore sostenibilità dei prodotti alimentari e contrastare l'inquinamento generato dalla produzione sintetica di nuovi composti, lo sfruttamento dei sottoprodotti della trasformazione industriale delle materie prime è un elemento fondamentale. La sansa sgrassata di oliva (DOP) è un sottoprodotto derivante dalla lavorazione dell'olio di oliva ed il suo utilizzo potrebbe rappresentare una strategia innovativa ed a basso costo per formulare alimenti ad elevato valore aggiunto. Proprio per questo, durante il progetto europeo H2020 EcoProlive sono stati realizzati diversi prodotti da forno nei quali la sansa di oliva sgrassata è stata aggiunta come ingrediente funzionale.

In questo lavoro ci siamo concentrati sullo studio di un pane arricchito col 4% (p/p) di DOP, prodotto come descritto nello studio di Di Nunzio e collaboratori (2019).

La sansa sgrassata di oliva è caratterizzata da un elevato contenuto di polifenoli, risulta dunque interessante valutare il suo impatto sul microbiota del colon umano e verificarne il potenziale prebiotico. La funzionalità dei prodotti da forno arricchiti non può essere valutata semplicemente determinando la loro composizione chimica; le modifiche che si verificano durante la digestione e l'effetto sul sistema biologico devono essere attentamente considerati. A questo scopo, i prodotti studiati sono stati sottoposti a digestione gastro duodenale e successivamente a fermentazione colonica distale nel modello intestinale in vitro MICODE (Multi-Unit In vitro Colon Model). Il campionamento è stato effettuato prima, durante e dopo 24 ore di fermentazione, al fine di eseguire analisi metabolomiche tramite SPME GCMS,

sequenziamento genomico 16S del microbiota colonico attraverso MiSeq e quantificazione assoluta delle principali specie batteriche tramite qPCR.

Dunque, attraverso lo studio di indicatori ecologici come: la biodiversità e l'eubiosi microbica; l'attività prebiotica; la produzione di composti desiderabili (SCFAs e MCFAs); la modulazione di composti dannosi (BCFAs e indolo); la presenza di molecole volatili correlate alla salute e la riduzione dei gruppi batterici coinvolti nelle fermentazioni proteolitiche, l'obiettivo di questo studio è spiegare con un rapporto diretto causa-effetto la capacità del nostro pane arricchito in polifenoli di fibre di possedere un'affermazione prebiotica.

4. Materiali e Metodi

4.1 Donatori campioni biologici

I donatori fecali, due femmine ed un maschio tra i 30 ed i 45 anni, erano in buona salute. Non avevano ricevuto un trattamento antibiotico per almeno 3 mesi prima della raccolta delle feci, precedentemente all'esperimento non avevano intenzionalmente assunto integratori pre- o probiotici e non avevano manifestato precedenti disturbi intestinali. Inoltre, i donatori non erano consumatori di medicinali da banco e di bevande alcoliche, non erano fumatori e seguivano la dieta mediterranea da molto tempo; in particolare due erano onnivori ed uno vegetariano. I tre donatori, essendo stati informati degli obiettivi e delle procedure dello studio, hanno dato il loro consenso verbale all'utilizzo del loro materiale fecale per gli esperimenti, in accordo con le procedure etiche richieste dall'Università di Bologna.

4.2 Reagenti e prodotti chimici

Prodotti chimici, solventi ed enzimi per la digestione in vitro e la fermentazione in batch erano di altissimo grado analitico e sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Fr), salvo diversa indicazione. I reagenti per la biologia molecolare (PCR e qPCR) così come i kit per l'estrazione del DNA e la depurazione degli standard genetici sono stati acquistati da Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA).

4.3 Prodotti EcoProlive e controlli

I prodotti EcoProlive erano prototipi di pane lievitati tramite lievito di birra prodotti nell'ambito del progetto europeo H2020 ECOPROLIVE. Il processo produttivo e la composizione approssimativa, compreso il contenuto fenolico e l'attività antiossidante sono riportati nella pubblicazione di Di Nunzio e collaboratori (2019). Un campione contenente il 4% (p/p) di sansa di oliva sgrassata (DOP) ottenuta come sottoprodotto della lavorazione industriale delle olive è stato comparato con lo stesso pane non addizionato di DOP. Frutto-

oligosaccaridi (FOS) della cicoria (Sigma-Aldrich, USA) sono stati utilizzati come controllo positivo prebiotico.

4.4 Digestione gastrica e duodenale in vitro

Il processo di digestione è stato eseguito secondo il protocollo standardizzato INFOGEST (*Minekus et al., 2014*), come descritto da Valli e collaboratori (2018), su 5 g di ogni prodotto da forno sperimentale per 245 min (2 minuti di digestione orale, 120 minuti di digestione gastrica e 120 minuti di digestione intestinale) a 37 °C. Durante la digestione in vitro hanno avuto luogo diversi trattamenti enzimatici consecutivi mediante aggiunta di: saliva simulata (contenente 75 U/mL di α -amilasi), succo gastrico simulato (contenente 2000 U/mL di pepsina) a pH acido e succo pancreatico simulato (contenente 10 mM di bile e 100 U/mL di pancreatina) a pH neutro. Dopo la digestione, le soluzioni risultanti sono state congelate a -18 °C fino all'ulteriore fermentazione colonica in vitro.

4.5 Fermentazione fecale in coltura Batch e raccolta dei campioni

Le fermentazioni coloniche di FOS e del pane EcoProlive sono state eseguite utilizzando MICODE (Multi-Unit Colon Model) sviluppato con i reattori Minibio (Applikon Biotechnology BV, Delft, NL) e controllato dal software dedicato Lucullus PIMS (Applikon Biotechnology BV, NL). I bioreattori sono stati autoclavati a 121°C e -1 bar per 15 minuti e una volta raffreddati asetticamente sono stati riempiti con 90 mL di mezzo nutritivo basale pre-sterilizzato anaerobico, secondo le precedenti pubblicazioni (*Sanchez-Patan et al. 2012; Connolly et al., 2012*).

Il contenuto per litro del mezzo basale (BM) è il seguente: 2 g di peptone, 2 g di estratto di lievito, 0.1 g di NaCl, 0.04 g di K_2HPO_4 , 0.04 g di KH_2PO_4 , 0.01 g di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g di $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 g di $NaHCO_3$, 2 ml di Tween 80, 0.05 g di Hemin sciolto in 1 ml di 4 M-NaOH, 10 ml di vitamina K, 0.5 g di L-cisteina HCl e 0.5 g di sali biliari (glicolato di sodio e taurocolato di sodio). Il mezzo è stato regolato a pH 7.0 prima della sterilizzazione in autoclave ed in seguito, una volta raffreddato il supporto, sono stati aggiunti 2 ml di soluzione

di resazurina 0.025% (p/v). I vessel di fermentazione sono stati riempiti asetticamente con 90 ml di BM e alle teste dei bioreattori sono stati collegati i sensori precedentemente sterilizzati e calibrati, cioè sensori di pH e DO₂ (Ossigeno disciolto). In ogni bioreattore la condizione di anaerobiosi (0.0% p/v di DO₂) è stata costantemente mantenuta durante l'esperimento ed è stata ottenuta in circa 30 minuti di lavaggio con N₂ filtrato senza O₂ attraverso lo sparger montato nei reattori Minibio (Applikon Biotechnology BV, NL).

La temperatura è stata impostata a 37°C e si è mescolato a 300 giri/min, mentre il pH è stato regolato a 5.75 e mantenuto per tutto l'esperimento con l'aggiunta automatica di NaOH filtrato o HCl (0.5 M), per imitare le condizioni che si verificano nella regione prossimale dell'intestino crasso umano. Una volta raggiunte le esatte impostazioni ambientali, ciascuno dei 4 recipienti è stato iniettato asetticamente con 10 mL di inoculo fecale (10% p/v di feci umane) fino ad una concentrazione finale dell'1% (p/v) e successivamente con 1 g del substrato/trattamento appropriato (FOS, pane Eco4% e pane Eco0% digeriti) per una concentrazione finale dell'1% (p/v) (*Kutsos et al., 2017*). Il quarto vessel è stato liberato dal substrato.

Campioni fecali umani freschi sono stati raccolti in un barattolo anaerobico, mantenuti a 4 °C e lavorati entro 1 h. Lo slurry è stato preparato omogeneizzando le feci in soluzione salina tamponata con fosfato pre-ridotto (PBS) (*Wang et al., 2020*).

Le colture batch sono state eseguite in queste condizioni controllate per un periodo di 24 ore durante le quali i campioni sono stati raccolti in 4 punti di tempo (0, 6, 18 e 24 h) per qPCR e SPME GC/MS o a 24 ore per il 16S-rDNA MiSeq. Il campionamento è stato effettuato con un sistema dedicato di filtro a doppia siringa collegato ad un galleggiante posizionato sul fondo dei vessel che non genera perturbazioni o interagisce con l'ecosistema del bioreattore. L'estrazione del DNA microbico è stata condotta subito dopo il campionamento. Campioni di DNA e campioni GC/MS sono stati quindi conservati a -80 °C. Le fermentazioni sono state controllate e monitorate con il software Lucillus PIMS (Applikon Biotechnology BV, NL), mantenendo la stabilità di tutti i parametri e monitorando l'esperimento.

Le fermentazioni sono state condotte in duplici esperimenti indipendenti, utilizzando per ciascuno un nuovo pool di feci degli stessi tre donatori sani.

4.6 Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA

Il DNA è stato estratto da ogni campione alla linea di base ed al punto finale, utilizzando il Purelink Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, USA). La procedura è stata effettuata interamente a temperatura ambiente (20-25 °C). Nella prima fase, che consiste nella preparazione del lisato batterico, vengono inseriti in una provetta con microsfere, il campione biologico e 600 µL di Lysis buffer. La miscela è stata vortexata assicurandosi che il campione sia adeguatamente disperso nel liquido. Si aggiungono 100 µL di Lysis Enhancer ed una volta chiusa la provetta si vortexa brevemente. La miscela viene incubata a 65 °C per 10 minuti, omogeneizza con il vortex per 10 minuti alla massima velocità, e successivamente si impiegano l'adattatore a mani libere e l'agitazione orizzontale. Si centrifuga a 14000 x g per 5 minuti, e si trasferiscono fino a 400 µL di surnatante in una provetta da micro-centrifuga pulita, facendo attenzione a non prelevare eventuali detriti presenti sulle microsfere. Si aggiungono 250 µL di Cleanup Buffer e si vortexa subito. Si centrifuga a 14000 g per 2 minuti e si trasferisce fino a 500 µL di surnatante per ripulire le provette da micro-centrifuga, evitando il trasferimento di microsfere e detriti. Nella seconda fase di estrazione, in cui il DNA viene legato ad una colonnina porosa per purificazione (Cleanup Column), si procede aggiungendo 900 µL di Binding Buffer e si vortexa brevemente, si caricano 700 µL della miscela contenente il campione in una provetta assemblata ad una Cleanup Column e si centrifuga a 14000 g per 1 minuto. Si scarta il liquido percolato attraverso la colonnina, si ripete la fase di aggiunta di 700 µL della stessa miscela con campione e si ricentrifuga nelle medesime condizioni. È importante assicurarsi che l'intera miscela di campione sia passata alla provetta di raccolta. Se, ispezionando la colonnina, si nota che del campione è rimasto aderente ad essa, si centrifuga a 14000 g per un altro minuto. La terza fase di estrazione consiste nel lavaggio ed eluizione del DNA. Dunque, si procede con l'introduzione della Cleanup Column in una provetta di raccolta pulita, si aggiungono 500 µL di Wash Buffer e si centrifugano Cleanup Column e provetta assemblate a 14000 g per 1 minuto. Una volta che il liquido percolato è stato scartato, si ricentrifuga la colonnina assemblata alla provetta di raccolta a 14000 g per 30 secondi. Lo scopo della seconda centrifuga è quello di ottimizzare la rimozione del Wash Buffer, il quale potrebbe interferire con le successive operazioni di downstream. Nell'ultima fase si inserisce la Cleanup Column in una eppendorf e si aggiungono 100 µL di Elution Buffer, dopodiché si lascia ad incubare a

temperatura ambiente per 1 minuto. Si centrifuga a 14000 g per 1 minuto e si scarta la Clean-up Column. Si ottiene così il DNA batterico purificato all'interno dell'eppendorf.

La purezza dell'acido nucleico è stata testata su BioDrop Spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). La diversità batterica è stata ottenuta dalla preparazione della libreria e dal sequenziamento del gene 16S rDNA con MiSeq con lunghezza di lettura di 300-bp (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

4.7 Analisi dei dati di sequenza

Le reads sono state de-multiplexate in base al sistema di indicizzazione Illumina. Le sequenze sono state analizzate utilizzando QIIME 1.5.0 (Caporaso et al., 2010). Dopo il filtraggio basato sulla qualità e la lunghezza di lettura (qualità minima = 25 e lunghezza minima = 200), le unità tassonomiche operative (OTUs) definite da un 97% di somiglianza sono state scelte utilizzando il metodo Uclust v1.2.22q (Edgar, 2013) e le sequenze rappresentative sono state sottoposte al classificatore RDP (Wang et al., 2007) per ottenere l'assegnazione tassonomica e l'abbondanza relativa di ogni OTU utilizzando il database genico Greengenes 16S rRNA (McDonald et al., 2012). L'analisi della diversità alfa e beta è stata eseguita utilizzando QIIME 1.5.0 (Caporaso et al., 2010).

4.8 Enumerazione dei Gruppi Batterici tramite qPCR

I cambiamenti nel regno degli *Eubatteri*, nell'ordine delle *Lactobacillales*, nelle famiglie delle *Bifidobacteriaceae*, delle *Enterobacteriaceae* e delle *Clostridiaceae*, e quelli avvenuti all'interno della specie *Escherichia coli*, sono stati valutati anche con SYBR Green qPCR (Tanner et al., 2014). I target genici sono piccoli frammenti di monocopie o geni multicopie attraverso coppie di primer degenerate (Tabella 1) o specifiche e DNA polimerasi ad alta fedeltà (Invitrogen Platinum SuperFi II DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA). L'estrazione del DNA batterico è stata ottenuta con Pure Link Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Le analisi qPCR sono state eseguite utilizzando un RotorGene 6000 (Qiagen, Hilden, Germania) con la chimica SYBR

Green I. Gli standard genetici sono stati preparati da relativi ampliconi PCR delle specie batteriche target, utilizzando il kit di purificazione del DNA genomico GeneJet (Thermo Fischer Scientific, USA) come descritto in precedenza Nissen e collaboratori (2019 e 2020). Generalmente, per ciascuno dei microrganismi target le reazioni qPCR sono state impostate come segue: una fase di tenuta a 98°C per 6 minuti ed una fase ciclistica a 95°C per 20 secondi e a 60°C per 60 secondi, ripetute per 45 volte, seguite da un'analisi delle curve di melting. Le quantificazioni sono state effettuate separatamente con uno standard in cinque punti dell'amplicone dato. Le reazioni sono state preparate con 1 ng di DNA, 2x Power up SYBR Green (Thermo Scientific, USA) e 250 nM di ogni primer (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germania). Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi di tre ripetizioni ottenuti da due esperimenti indipendenti.

Tabella 1. Coppie di primer utilizzate per la quantificazione tramite qPCR.

Group	Target	Sequence 3'-5'	Bp	Reference
<i>Eubacteria</i>	V3-V4 16 S	Eub518R: ATTACCGCGGCTGCTGG Eub338R: ACTCCTACGGGAGGCAG	147	Lane <i>et al</i> , 1991
<i>Enterobacteriaceae</i>	V3-V4 16 S	Enterobac-f: TGCCGTA ACTTCGGGAG Enterobac-r: TCAAGGACCAGTGTTTCAG	450	Bartosh <i>et al</i> , 2004
<i>Lactobacillales</i>	V3-V4 16 S	F-Lac: GCAGCAGTAGGGAATCT R-Lac: GCATTYCACCGCTACACA	340	Walter <i>et al</i> , 2001
<i>Bifidobacteriaceae</i>	RecA	RecAf: CGTYTCBCAGCCGGAYA RecAr: CCARVGCRCGGTCATC	220	Masco <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i>	FtsZ	EcFtsZf: GGTATCCTGACCGTTGCT EcFtsZr: ATACCTCGGCCAGAACT	250	Zhou e Helmstetter, 1994
<i>Clostridiaceae</i>	V3-V4 16 S	ClosIV-f: TTAACACAATAAGTWATC ClosIV-r: ACCTTCCTCCGTTTTGTC	400	Goldberg <i>et al.</i> , 2013

4.9 Analisi del Volatiloma con SPME GC-MS.

La valutazione dei composti organici volatili (VOCs) è stata effettuata utilizzando un gascromatografo Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent Technologies 5975 che opera in modalità di impatto elettronico (energia di ionizzazione di 70 eV) dotato di una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB (lunghezza 50 m, ID 0.32 mm) (Chrompack, Middelburg, Paesi Bassi). Il protocollo SPME-GC-MS (Solid Phase Micro-Extraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry) e l'identificazione di composti volatili sono stati eseguiti come indicato in precedenti rapporti, con piccole modifiche (*Taneyo-Saa, et al 2014; Nissen et al., 2020*). Brevemente: 3 ml del contenuto del vessel o dello slurry sono stati collocati in flaconcini di vetro da 10 ml e sono stati aggiunti 10 µL di 4-metil-2-pentanololo (concentrazione finale, 4 mg/L), come standard interno. I campioni sono stati quindi equilibrati per 10 min a 45°C. La fibra SPME rivestita con carboxen-polidimetilsiloxano (85 µm) è stata esposta a ciascun campione per 40 minuti. Le fasi di pre-condizionamento, assorbimento e desorbimento dell'analisi SPME-GC e tutte le procedure di elaborazione dei dati sono state condotte secondo precedenti pubblicazioni (*Taneyo-Saa et al., 2014*). In breve, prima di ogni campionamento dello spazio di testa, la fibra è stata esposta all'ingresso del Gascromatografo per 10 minuti per il desorbimento termico a 250 °C in un campione vuoto. I campioni sono stati poi equilibrati per 10 min a 40 °C. La fibra SPME è stata esposta ad ogni campione per 40 min ed infine è stata inserita nella porta di iniezione del Gascromatografo per un desorbimento del campione di 10 minuti. Il programma di temperatura è stato: 50°C per 1 min, successivamente programmato a 1.5°C/min fino a 65 °C, ed infine a 3.5°C/min fino a 220 °C, temperatura che è stata mantenuta per 25 minuti. Le temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250, 250 e 230°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless e l'elio (3 mL/min) è stato utilizzato come gas vettore. L'identificazione delle molecole è stata effettuata ricercando spettri di massa nei database disponibili (NIST versione 2005 e Wiley versione 1996). Ogni VOCs è stato quantificato relativamente in percentuale. Alla linea di base, invece, i principali metaboliti microbici legati all'attività prebiotica sono stati quantificati assolutamente in mg/kg. Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi normalizzati ottenuti da due esperimenti indipendenti ripetuti 2 volte.

4.10 Analisi statistica

Per l'analisi dei dati di sequenziamento, è stata utilizzata la pipeline QIIME versione 1.5.0 (Caporaso *et al.*, 2010). La diversità all'interno della comunità (diversità alfa) è stata calcolata utilizzando gli OTUs osservati e gli indici di copertura Chao1, Shannon, Simpson e di Good con 10 ripetizioni di campionamento a ciascuna profondità di campionamento. Per confrontare gli ultimi valori di sequenza/campione di diversi trattamenti attraverso un indice, è stato applicato il test t di student. Per determinare le differenze statistiche tra i campioni (diversità beta) sono stati utilizzati l'analisi della somiglianza (ANOSIM) e il test ADONIS seguendo lo script QIIME `compare_categories.py` e utilizzando matrici di distanza filogenetiche ponderate e non ponderate UniFrac. I grafici PCoA (Principal Coordinate Analysis) sono stati generati utilizzando il flusso di lavoro QIIME `beta diversity plots`. Per il resto dell'analisi dei dati è stata utilizzata Statistica version 8.0 (Tibco Inc., Palo Alto, CA, USA).

Per il microbiota, l'analisi qPCR ed il volatiloma, per determinare le differenze tra i trattamenti di fermentazione (controllo in bianco, FOS, Eco0% ed Eco4%) in un momento analogo (0, 5, 10 o 24 h), sono stati utilizzati one-way ANOVA seguita dal test post hoc HSD (Honestly Significant Difference) di Tukey.

Per evidenziare le differenze delle comunità attraverso i trattamenti è stato utilizzato il Principal Component Analysis (PCA) ed applicato a un set di dati normalizzato di specie batteriche significative (test Bonferroni $P < 0.05$). PCA e MANOVA (Multi variate ANOVA), invece, sono stati applicati a set di dati super normalizzati di classi chimiche del volatiloma. Infine, è stato generato un set di dati tramite correlazione di rango Spearman, il quale accoppia due set di dati indipendenti normalizzati di quantificazioni relative dei principali metaboliti legati all'attività prebiotica e del microbiota a livello di specie, quindi espresso come una mappa termica di giunzione a doppio senso con dendrogrammi di Pearson.

Quando presentati come shift, i risultati sono stati considerati rispetto ad una linea di base di valori che è stata ottenuta dalle analisi del liquame fecale diluito in PBS e nel BM con l'integrazione del campione da testare (FOS, Eco0% ed Eco4%).

5. Risultati e discussione

5.1 Controlli di qualità per la convalida di MICODE

Per convalidare MICODE, il modello in vitro del colon umano prossimale nella versione di batch fecali, come controlli di qualità sono stati monitorati alcuni parametri, diversi dai trend delle condizioni sperimentali che Lucullus 3.1 (PIMS, Delft, NL) ha tracciato durante gli esperimenti. I parametri indicatori di qualità erano in relazione sia ai metaboliti che ai microbi, controllati alla fine delle fermentazioni ed alla linea di base.

Ad esempio, per la loro sensibilità agli stress ambientali, la presenza di *Archea* (come *Methanobrevibacter smithii*) è stata utilizzata come controllo di qualità. La loro presenza nelle feci è stata mantenuta ad ogni ripetizione in ciascun vessel durante l'esperimento.

Altri controlli di qualità erano correlati agli indici di diversità alfa del microbiota: il Good's rarity index ed il richness index. Il primo, che è stato mantenuto simile, con $P < 0.05$, ha evidenziato la capacità di MICODE di supportare specie rare ed esigenti; il secondo invece, ha segnato circa 400 OTUs all'endpoint.

Poiché quando FOS è stato fermentato nel MICODE sono stati registrati un massiccio aumento dei microrganismi probiotici, un minimo esaurimento degli enteropatogeni e la produzione di SCFAs, il paradigma dei prebiotici è stato confermato. Considerando l'analisi GC/MS sono stati misurati alcuni composti derivanti dalle feci onnipresenti, che si riscontrano nell'intero cromatogramma e sono stati adsorbiti allo stesso tempo di ritenzione in qualsiasi campione testato, come l'urea, l'1-Propanolo ed il Butilato-idrossi-toluene.

5.2 Cambiamenti delle diversità alfa e beta nei batteri fecali

Per valutare la diversità del microbiota intestinale all'interno di una comunità sono stati impiegati indici di diversità alfa, come:

- ✓ il numero di OTUs osservate per la ricchezza;
- ✓ lo stimatore Chao1 per l'abbondanza;
- ✓ l'entropia di Shannon per l'uniformità;
- ✓ l'indice di Simpson per il dominio;

✓ la misura di Good per la rarità.

Per considerare le differenze tra i campioni, invece, è stata valutata la diversità beta tramite la Bray-Curtis analysis e l'ANOSIM.

Per qualsiasi indice di diversità alfa rispetto alla linea di base, all'endpoint c'erano differenze tra i trattamenti. Benché l'Eco 0% e l'Eco 4% non differissero l'uno dall'altro, tutti gli indici sono diminuiti rispetto alla linea di base ($P < 0.05$).

FOS è stato il trattamento che ha ridotto al massimo tutti gli indici. La diminuzione della ricchezza e dell'uniformità, ad esempio, è spiegabile dall'andamento del dominio il quale indica che alcune unità tassonomiche operative hanno travolto le altre, riducendo sia la ricchezza che la distribuzione uniforme dei batteri. Questo effetto è dovuto alla capacità di FOS di promuovere la crescita solamente di alcune specie, ad esempio i probiotici, rendendoli dominanti sul microbiota e riducendo così la diversità alfa complessiva.

Eco 4% ha avuto un effetto mitigato nella riduzione della diversità, ad esempio: considerando l'indice di OTUs osservato alla linea di base, FOS lo ha ridotto di 2,2 volte ($P < 0.05$) mentre Eco 4% di appena 1,6 volte ($P < 0.05$); analizzando l'indice di Shannon, quello di FOS era 1,8 volte inferiore rispetto alla linea di base mentre quello di Eco 4% solo 1,4 ($P < 0.05$). La capacità di Eco 4% di ridurre tali indici meno rispetto a FOS è un attributo positivo, poiché ha permesso a questo trattamento di avere una gamma più ampia di bioattività per più target batterici.

Poiché l'indice di diversità di Good è rimasto invariato dalla linea di base durante tutte le fermentazioni, possiamo affermare che il sistema di modello in vitro MICODE ha mantenuto una condizione ecologica stabile e selettiva anche per le specie batteriche rare.

Per quanto riguarda l'analisi della diversità batterica tra i campioni, cioè la diversità beta, il clustering dell'analisi della somiglianza (ANOSIM) è stato mostrato su base temporale, raggruppando i casi dei donatori lungo la linea di base e separatamente dai casi finali, come dimostrato con l'analisi delle coordinate principali (PCoA) basata su una matrice non ponderata (qualitativa) di distanza filogenetica UniFrac. Inoltre, la diversità beta PCoA includeva, vicine tra loro, le repliche dei casi, indicando scarse variazioni sperimentali e ANOSIM significativi ($P < 0.01$).

5.3 Abbondanza batterica fecale relativa a livello di Phylum

Le OTUs totali utilizzate in questo studio sono state classificate in dieci phyla, come mostrato nella Tabella 1. In ognuno dei casi testati, il core microbico era rappresentato da cinque phyla principali, che in ordine proporzionale decrescente sono: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, e *Verrucomicrobia*. Questi phyla insieme al sottorappresentato *Euryarcheota* hanno subito, rispetto alla linea di base, cambiamenti significativi durante la fermentazione colonica ($P < 0.05$).

Al fine di evidenziare il potenziale prebiotico del nostro alimento innovativo, è importante analizzare la tendenza nel tempo del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B). Questo rapporto, infatti, è un importante indicatore dello stato del microbiota: attesta un eubiosi quando è intorno ad 1.5 ed una disbiosi quando è superiore a 2, portando a sindromi intestinali (Zhou et al., 2017). Alla linea di base i campioni in analisi hanno registrato un rapporto F/B intorno ad 1.6, indicando una condizione sana degli ospiti. Questo rapporto è stato mantenuto simile, senza variazioni significative, sia dopo la fermentazione di FOS (1.7) che dopo quella di Eco 4% (1.3). La fermentazione di Eco 0%, invece, ha generato un significativo aumento del rapporto F/B, pari a 2,3 volte ($P < 0.05$).

Tabella 2. Variazioni nei phyla batterici (abbondanza relativa (%)) durante 24 ore di fermentazione in vitro della coltura batch, inoculate con feci umane (n = 3 donatori sani) ed amministrate con FOS, Eco 4% ed Eco 0% come substrati (trattamenti). I campioni sono stati analizzati a 0 ore (linea di base) e 24 ore. I valori sono medi (%) con SD. Le differenze significative all'interno di una riga sono espresse da lettere diverse ($P < 0.05$, test HSD di Tuckey). ¹F/B = Firmicutes/Bacteroidetes.

<i>Phylum</i>	Baseline		Endpoint					
			<i>FosT3</i>		<i>eco0T3</i>		<i>eco4T3</i>	
<i>Firmicutes</i>	54.005	± 0.635 ^a	41.997	± 1.111 ^b	63.470	± 0.651 ^c	41.509	± 0.596 ^b
<i>Bacteroidetes</i>	33.997	± 0.741 ^a	23.957	± 0.870 ^b	17.418	± 0.422 ^c	33.264	± 0.529 ^a
<i>Actinobacteria</i>	7.537	± 0.613 ^a	27.832	± 1.232 ^b	6.338	± 0.738 ^a	16.696	± 1.058 ^c
<i>Proteobacteria</i>	1.762	± 0.193 ^a	3.577	± 0.544 ^b	11.628	± 1.344 ^c	5.571	± 0.798 ^b
<i>Verrucomicrobia</i>	1.775	± 0.218 ^a	1.175	± 0.128 ^b	0.207	± 0.065 ^c	1.910	± 0.478 ^a
<i>Euryarchaeota</i>	0.145	± 0.023 ^a	0.010	± 0.002 ^c	0.076	± 0.006 ^b	0.030	± 0.004 ^c
<i>Fusobacteria</i>	0.009	± 0.001 ^a	0.001	± 0.000 ^a	0.001	± 0.000 ^a	0.084	± 0.014 ^b
<i>Synergistetes</i>	0.011	± 0.002 ^a	0.001	± 0.000 ^b	0.007	± 0.002 ^a	0.001	± 0.000 ^a
<i>Tenericutes</i>	0.009	± 0.001 ^a	> 0.001	± 0.000 ^a	0.001	± 0.000 ^a	> 0.001	± 0.000 ^a
<i>Crenarchaeota</i>	0.0001	± 0.000 ^a	> 0.001	± 0.000 ^a	> 0.001	± 0.000 ^a	0.001	± 0.000 ^a
<i>Bacteria; Other</i>	0.637	± 0.098 ^a	0.038	± 0.009 ^c	0.071	± 0.012 ^b	0.107	± 0.021 ^b
<i>Archaea; Other</i>	0.004	± 0.001 ^a	0.001	± 0.000 ^a	0.002	± 0.000 ^a	0.001	± 0.000 ^a
Unclassified	0.0301	± 0.005 ^a	0.005	± 0.001 ^b	0.017	± 0.005 ^a	0.018	± 0.006 ^a
F/B	1.589	± 0.053 [*]	1.753	± 0.017 [*]	3.644	± 0.051 [§]	1.247	± 0.012 [*]

5.4 Popolazioni del microbiota discriminate a livello di specie

Al livello tassonomico più basso, sono state costruite ed assegnate 189 ± 7 OTUs batteriche distinte (cutoffs 0.03%). Di queste, 97 ± 5 sono state identificate alla baseline, mentre quelle individuate al termine della fermentazione dei tre substrati testati sono state: 54 ± 3 nel caso di FOS; 72 ± 4 di Eco 4% e 78 ± 5 di Eco0%.

Le specie relativamente abbondanti alla base ed agli endpoints di ogni trattamento di fermentazione sono presentate nella tabella sottostante.

Tabella 3. Quantificazione relativa (%) di specie significative ($P < 0,05$) (cutoff = 0,001).

Lettere diverse all'interno di una riga indicano la significatività statistica dal test t-student ($P < 0,05$).

Assigned OTUs	Baseline	FOS 24 h	Eco0% 24 h	Eco4% 24 h
<i>Acidaminococcus</i> ;s__	0.0119 ^a	0.0000	17.0160 ^b	0.0000
<i>Adlercreutzia</i> ;s__	0.0727 ^a	0.0165 ^b	0.0262 ^b	0.0259 ^b
<i>Akkermansia</i> ;s__ <i>muciniphila</i>	1.7751 ^a	2.6454 ^a	0.2026 ^b	1.8068 ^a
<i>Anaerofilum</i> ;s__ <i>pentosovorans</i>	0.0705 ^a	0.1974 ^b	0.2436 ^b	0.3538 ^{bc}
<i>Anaerostipes</i> ;s__	0.2257 ^a	0.0000	0.0865 ^b	0.0155 ^b
<i>Bacteroides</i> ;Other	1.2065 ^a	2.0981 ^a	7.3804 ^b	2.6273 ^a
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>acidifaciens</i>	0.1052 ^a	0.1691 ^a	0.4007 ^{bc}	0.7826 ^c
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>caccae</i>	0.6217	0.5140	0.6421	0.4564
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>cellulosilyticus</i>	0.2279 ^a	0.1487 ^a	7.2420 ^b	0.6635 ^a
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>eggerthii</i>	0.7270 ^a	0.2040 ^b	0.0228 ^c	0.0181 ^c
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>fragilis</i>	0.0250 ^a	1.0766 ^b	0.1252 ^a	1.2640 ^b
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>massiliensis</i>	0.4731 ^a	0.3567 ^a	0.3017 ^a	3.6914 ^b
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>thetaitotaomicron</i>	0.2702 ^a	0.2363 ^a	1.6632 ^b	2.5583
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>uniformis</i>	1.7512 ^a	0.3685 ^b	1.1851 ^a	3.8950 ^c
<i>Bacteroides</i> ;s__ <i>vulgatus</i>	8.1140 ^a	2.1840 ^b	2.9667 ^b	3.9648 ^b
<i>Bifidobacterium</i> ;s__ <i>adolescentis</i>	3.0067 ^a	32.1257 ^b	2.1716 ^a	6.8630 ^c
<i>Bifidobacterium</i> ;s__ <i>bifidum</i>	0.7877 ^a	3.8160 ^b	0.7821 ^a	0.6489 ^a
<i>Bifidobacterium</i> ;s__ <i>longum</i>	1.3093 ^a	4.2386 ^b	2.2097 ^b	4.8900 ^b
<i>Bilophila</i> ;s__ <i>wadsworthia</i>	0.7862 ^a	0.0562 ^b	0.9735 ^a	0.3262 ^a

Assigned OTUs	Baseline	FOS 24 h	Eco0% 24 h	Eco4% 24 h
<i>Blautia</i> ;s__	8.2039 ^a	0.1336 ^b	0.3358 ^b	0.1734 ^b
<i>Blautia</i> ;s__ <i>obeum</i>	2.5856 ^a	0.0526 ^b	0.2004 ^b	0.0742 ^b
<i>Blautia</i> ;s__ <i>producta</i>	0.2886 ^a	0.0000	0.0250 ^b	0.1363 ^a
<i>Butyricimonas</i> ;s__	0.1562 ^a	0.0125 ^b	0.2163 ^a	0.1199 ^a
<i>Citrobacter</i> ;s__ <i>freundii</i>	0.7191 ^a	0.0010 ^b	0.0050 ^b	0.0289 ^b
<i>Coprobacillaceae</i> ;Other	0.2203 ^a	0.0099 ^b	0.0387 ^b	0.0242 ^b
<i>Coprobacillus</i> ;s__ <i>cateniformis</i>	0.0380 ^a	0.0138 ^a	0.5043 ^b	0.3727 ^b
<i>Coprococcus</i> ;s__	6.9756 ^a	0.0270 ^b	0.2561 ^b	0.2563 ^b
<i>Coriobacteriaceae</i> ;Other	1.0774 ^a	0.0592 ^b	0.2846 ^b	0.1484 ^b
<i>Desulfovibrio</i> ;s__	0.5121 ^a	0.1053 ^a	0.8387 ^b	0.1631 ^a
<i>Dialister</i> ;s__ <i>invisus</i>	2.8362 ^a	0.0000	1.1813 ^b	0.9025 ^b
<i>Dorea</i> ;s__ <i>formicigenerans</i>	0.6478 ^a	0.3949 ^a	6.7692 ^b	1.3503 ^a
<i>Enterococcus</i> ;s__ <i>durans</i>	0.0174 ^a	5.4146 ^b	2.9246 ^b	7.5645 ^b
<i>Escherichia</i> ;s__	0.4752 ^a	6.3164 ^b	9.6857 ^b	4.0286 ^b
<i>Escherichia</i> ;s__ <i>albertii</i>	0.6330 ^a	0.0230 ^b	1.0889 ^a	0.1430 ^a
<i>Faecalibacterium</i> ;s__ <i>prausnitzii</i>	8.7735 ^a	3.1281 ^b	0.0455 ^c	4.8725 ^b
<i>Faecalibacterium</i> ;s__	0.2289 ^a	0.4607 ^a	0.1662 ^a	0.0216 ^b
<i>Klebsiella</i> ;s__ <i>variicola</i>	0.0043 ^a	0.0000	0.0057 ^a	0.0052 ^a
<i>Lachnospira</i> ;s__	0.9570 ^a	0.7226 ^a	0.1366 ^b	0.1070 ^b
<i>Lachnospira</i> ;s__ <i>pectinoschiza</i>	0.1628 ^a	2.4107 ^b	0.0205 ^c	0.0069 ^c
<i>Lachnospiraceae</i> ;Other	0.2919 ^a	0.0046 ^b	0.1617 ^a	0.6911 ^a
<i>Lactobacillus</i> ;s__ <i>plantarum</i>	0.0000	2.2958 ^a	0.0091 ^b	4.1990 ^a
<i>Lactococcus</i> ;s__ <i>lactis</i>	0.2930 ^a	1.1955 ^a	0.0023 ^b	0.0035 ^b
<i>Megasphaera</i> ;s__ <i>elsdenii</i>	1.8218 ^a	12.3391 ^b	9.0260 ^b	16.2232 ^b
<i>Methanobrevibacter</i> ;s__ <i>smithii</i>	0.6879 ^a	0.0526 ^b	0.2172 ^a	0.2502 ^a
<i>Oscillospira</i> ;s__	2.1646 ^a	0.3225 ^b	0.8800 ^b	0.3857 ^b
<i>Parabacteroides</i> ;s__	0.3917 ^a	0.0816 ^a	3.8454 ^b	2.2278 ^b
<i>Parabacteroides</i> ;s__ <i>distasonis</i>	4.4106 ^a	0.5278 ^b	3.0544 ^a	13.2508 ^c

Assigned OTUs	Baseline	FOS 24 h	Eco0% 24 h	Eco4% 24 h
<i>Parabacteroides;s__merdae</i>	0.1345	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Phascolarctobacterium;s__</i>	0.0998 ^a	0.0224 ^b	0.0603 ^a	0.1415 ^a
<i>Porphyromonadaceae;Other;Other</i>	0.0000	0.0724 ^a	0.6887 ^b	0.3201 ^b
<i>Rikenella;s__microfusus</i>	2.7842 ^a	0.1856 ^b	0.8504 ^b	1.2468 ^b
<i>Roseburia;s__</i>	2.6909 ^a	0.1316 ^b	0.0273 ^b	0.0544 ^b
<i>Roseburia;s__faecis</i>	0.1367 ^a	2.3558 ^b	0.0137 ^c	0.0017 ^d
<i>Ruminococcus;s__</i>	2.8015 ^a	0.2896 ^b	2.2461 ^a	0.4823 ^b
<i>Ruminococcus;s__callidus</i>	1.0102 ^a	0.0000	0.0011 ^b	0.0035 ^b
<i>Ruminococcus;s__gnavus</i>	3.1470 ^a	0.1777 ^b	0.1776 ^b	0.2457 ^b
<i>Ruminococcus;s__torques</i>	0.7009 ^a	0.0000	0.0091 ^b	0.0052 ^b
<i>Slackia;s__isoflavoniconvertens</i>	0.2040 ^a	0.0243 ^b	0.3700 ^a	0.1320 ^a
<i>Sutterella;s__</i>	0.4720 ^a	0.6199 ^a	1.1236 ^b	0.3702 ^a
<i>Tepidibacter;s__</i>	1.4843 ^a	0.0816 ^b	0.1685 ^b	0.0682 ^b

Per eseguire analisi multivariate non target da PCA è stato generato, dopo ANOVA ($P > 0.05$), un set di dati di 62 unità tassonomiche operative batteriche significative. La discriminazione delle variabili tra i casi si è basata in primo luogo su un trend temporale; successivamente quando le variabili di base sono state implementate dal set di dati è stato possibile discriminare i diversi casi in base ai trattamenti, distinguendo così i principali descrittori di FOS, Eco 4% ed Eco 0%. Come mostrato in figura 22, la realizzazione di una PCA con due fattori del 36,15% e del 30,80% ha permesso di distribuire i casi Eco 4% nel quadrante I, i casi FOS nel quadrante II ed i casi Eco 0% nel III.

Dunque, riportando l'abbondanza relativa media per ogni specie, al termine della fermentazione possiamo osservare che i casi FOS sono stati descritti in modo maggiore da:

- *Lachnospira pectinoschiza* = 41%
- *Bifidobacterium adolescentis* = 32.12%
- *Escherichia commensali* = 6.32%
- *Bif. longum* = 3.32%
- *Bif. bifidum* = 2.81%

- *Akkermanisa muciniphila* = 2.64%
- *Roseburia faecis* = 1.35%
- *Collinsella aerofaciens* = 1.29%

Tra queste, le specie che hanno registrato il più alto aumento dell'abbondanza relativa rispetto allo scenario di base sono state:

- *Bif. adolescentis* = + 29.31%
- *Lach. Pectinoschiza* = +4.16%
- *Bif. longum* = +2.12%

D'altra parte, le variabili che hanno subito la massima riduzione significativa ($P < 0.05$) dell'abbondanza relativa rispetto alla linea di base sono state:

- *B. vulgatus* = -9.93%
- *F. prausnitzii* = -8.73%
- *Ruminococcus gnavus* = -3.13%
- *Citrobacter freundii* = -2.19%
- *Bil. wadsworthia* = -0.73%
- *E. albertii* = -0.61%

Per quanto riguarda, invece, i principali descrittori rilevati al termine della fermentazione di Eco 4% riportiamo:

- *Megasphaera elsdenii* = 16.22%
- *Parabacteroides distasonis* = 13.25%
- *Enterococcus durans* = 6.56%
- *Bif. longum* = 4.89%
- *Faecalibacterium prausnitzii* = 4.87%
- *Lactobacillus plantarum* = 4.20%
- *B. massiliensis* = 3.69%
- *B. uniformis* = 2.50%

In questo caso, le specie che hanno registrato il più alto aumento dell'abbondanza relativa rispetto allo scenario di base sono state:

- *Enterococcus durans* = +11.23%
- *Megasphaera elsdenii* = +7.18%

- *Bif. longum* = +4.41%
- *Parabacteroides distansonis* = +3.7%
- *Bif. adolescentis* = +3.49%
- *Lactobacillus plantarum* = 3.2%
- *B. massiliensis* = +2.12%

Mentre le variabili che hanno subito la massima riduzione significativa ($P < 0.05$) dell'abbondanza relativa rispetto alla linea di base sono state:

- *B. vulgatus* = -8.22%
- *F. prausnitzii* = -4.01%
- *Ruminococcus gnavus* = -2.98%
- *Citrobacter freundii* = -1.82%
- *E. albertii* = -0.42%
- *Bil. wadsworthia* = -0.45%

Infine, i principali descrittori di Eco0% riscontrati al termine della fermentazione sono stati:

- *Bacteroides cellulosyliticus* = 7.24%
- *Dorea formicigerans* = 6.77%
- *Dialister invisus* = 1.18%
- *E. albertii* = 1.08%
- *Bilophila wadsworthia* = 0.93%

Dunque, da questi risultati, è possibile evidenziare il potere prebiotico di Eco 4% anche a livello di specie. Questo substrato, infatti, allo stesso modo di FOS, ha favorito la crescita di: batteri probiotici come *Bif. adolescentis*, *Bif. longum* o *Bif. bifidum* (Gibson et al., 2017); batteri benefici come *Megasphaera elsdenii* (produttore di SCFAs) (Louis et al., 2014), *B. massiliensis* (produttore di MCFAs e sfingolipidi) (Hiippala et al., 2020); *Parabacteroides distansonis* (produttore di succinato) (Wang et al., 2018); e Lactobacillales come *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus durans* (produttori di batteriocine) (Heeney et al., 2019). Inoltre, all'endpoint, in relazione agli altri casi e non considerando lo shift, Eco 4% ha riscontrato i carichi più alti di *Faecalibacterium prausnitzii* (produttore di SCFAs) (Dewulf et al., 2013) e *B. caccae* (degradatore di fibre) (Nakajima et al., 2020).

Infine, in linea con il concetto di prebiotico, Eco 4% è stato in grado di limitare e contrastare la crescita di specie dannose per l'ospite come: *Citrobacter freundii* (specie opportunistica) (Ganji et al., 2016); *Escherichia albertii* (patogeno) (Brandall et al., 2015); *Ruminococcus gnavus* (specie legata agli enterotipi della sindrome metabolica) (Ruan et al., 2020) e *Bilophila wadsworthia* (solfato-produttore) (Natividad et al., 2018).

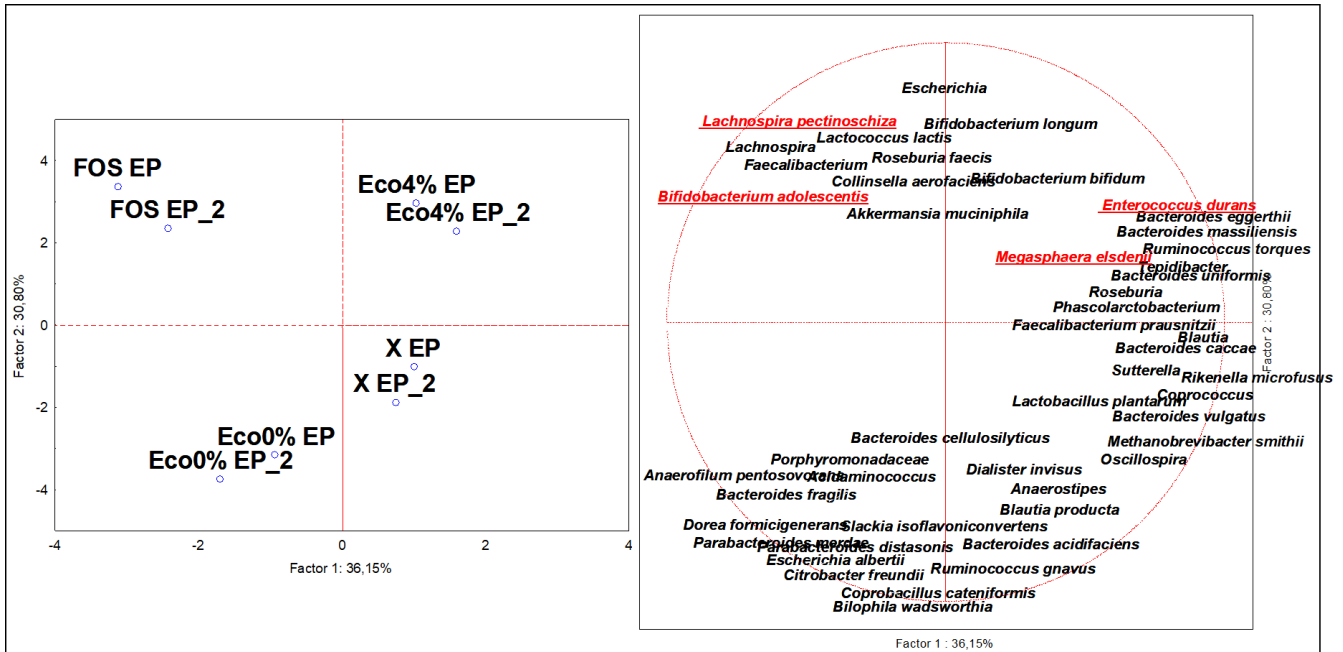


Figura 22. PCA di abbondanza relativa % OTUs significative (ANOVA $P < 0,05$) a livello di specie, dopo 24 ore (EP = Endpoint) di fermentazione in vitro di coltura batch inoculate con feci umane ($n = 3$ donatori sani) e amministrata con FOS, Eco 4% ed Eco 0% come substrati (trattamenti) ed un controllo in bianco (X). Le variabili in caratteri rossi sono i principali descrittori dei casi Eco4% o FOS.

5.5 Cambiamenti nelle popolazioni batteriche fecali selezionate con qPCR

I cambiamenti nel regno degli *Eubacteria*, nell'ordine dei *Lactobacillales*, nelle famiglie delle *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, e *Clostridiaceae* e nella specie *Escherichia coli*, sono stati valutati anche da qPCR, i cui target sono piccoli frammenti di monocopie o geni multicopie attraverso coppie di primer degeneri o specifiche e DNA polimerasi ad alta fedeltà (Invitrogen Platinum SuperFi II DNA Polymerase, Thermo Fischer Scientific, USA).

Al punto equivalente a 6 ore, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi tra tutti i casi ed i target batterici ($P < 0,05$).

Al tempo intermedio, cioè a 18 ore, si è registrato un aumento di alcuni microrganismi. Per quanto riguarda FOS è stato riscontrato ($P < 0,05$):

- Aumento di 0,95 Log_{10} cellule/ml di *Lactobacillales*
- Aumento di 0,71 Log_{10} cellule/ml di *Bifidobacteriaceae*.

Analizzando Eco 4% si è evidenziato ($P < 0,05$):

- Aumento di 0,97 Log_{10} cellule/ml di *Bifidobacteriaceae*
- Aumento di 0,74 Log_{10} cellule/ml di *Lactobacillales*.

Passando ad Eco 0% è stato registrato ($P < 0,05$):

- Aumento di 0,84 Log_{10} cellule/ml di *Clostridiaceae*.

All'endpoint, invece, quasi tutti i target batterici sono cambiati in abbondanza ($P < 0,05$). Ad esempio, per FOS si è verificato:

- Aumento di 2,04 Log_{10} cellule/ml di *Bifidobacteriaceae*
- Aumento di 1,43 Log_{10} cellule/ml di *Lactobacillales*
- Aumento di 0,93 Log_{10} cellule/ml di *Eubatteri* totali.

Nel caso di Eco4%:

- Aumento di 1,78 Log_{10} cellule/ml di *Bifidobacteriaceae*
- Aumento di 1,56 Log_{10} cellule/ml di *Lactobacillales*
- Aumento di 1,01 Log_{10} cellule/ml di *Eubatteri* totali
- Aumento di 1 Log_{10} cellule/ml di *Clostridiaceae*
- Riduzione di 0,41 Log_{10} cellule/ml di *E. coli*.

Per Eco 0% è stato riscontrato:

- Aumento di 1,13 Log_{10} cellule/ml di *E. coli*
- Aumento di 0,99 Log_{10} cellule/ml di *Clostridiaceae*
- Aumento di 0,73 Log_{10} cellule/ml di *Enterobacteriaceae*.

Dunque, i risultati di FOS ed Eco 4% sono rigorosamente in linea con il concetto di prebiotico, per il quale il composto in oggetto deve favorire la crescita di batteri benefici e probiotici (come *Bifidobacteriaceae* e *Lactobacillales*) e simultaneamente ridurre quello di batteri opportunistici e patogeni (come *Enterobacteriaceae* e *E. coli*).

L'unica differenza che si evidenzia tra FOS ed Eco 4% è lo shift dissimile registrato all'endpoint per quanto riguarda le *Clostridiaceae*. Analogamente al controllo Eco 0%, infatti, i membri di questa famiglia durante la fermentazione colonica sono aumentati.

Tabella 4. Variazioni delle popolazioni batteriche misurate da qPCR su un RotorGene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) con la chimica SYBER Green I, espresse come valori medi in Log10/ml. Lettere diverse tra i target batterici indicano la significatività dal test HSD di Tuckey ($P < 0.05$)

	Time (h)	Eubacteria	Bifidobacteriaceae	Lactobacillales	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Clostridiaceae
FOS	0	9.16 ± 0.16 ^a	6.77 ± 0.11 ^a	7.36 ± 0.09 ^a	8.60 ± 0.07 ^b	4.08 ± 0.03 ^{ab}	7.15 ± 0.11 ^a
	6	9.32 ± 0.10 ^a	6.99 ± 0.12 ^{ab}	7.76 ± 0.10 ^{ab}	8.62 ± 0.13 ^b	4.40 ± 0.10 ^b	7.22 ± 0.04 ^a
	18	9.77 ± 0.09 ^{ab}	7.48 ± 0.09 ^b	8.31 ± 0.09 ^b	8.51 ± 0.02 ^{ab}	4.62 ± 0.07 ^b	7.67 ± 0.03 ^{ab}
	24	10.09 ± 0.28 ^b	8.81 ± 0.23 ^c	8.79 ± 0.11 ^b	8.05 ± 0.06 ^a	3.62 ± 0.07 ^a	7.34 ± 0.30 ^a
Eco0%	0	9.12 ± 0.25 ^a	6.47 ± 0.08 ^a	7.11 ± 0.09 ^a	8.71 ± 0.08 ^b	4.00 ± 0.07 ^{ab}	7.11 ± 0.11 ^a
	6	9.00 ± 0.11 ^a	6.71 ± 0.09 ^a	7.65 ± 0.11 ^{ab}	8.91 ± 0.12 ^{bc}	4.40 ± 0.08 ^b	7.35 ± 0.11 ^a
	18	9.41 ± 0.26 ^a	6.68 ± 0.09 ^a	7.90 ± 0.14 ^{ab}	9.14 ± 0.11 ^{bc}	4.92 ± 0.11 ^{bc}	7.95 ± 0.21 ^b
	24	9.57 ± 0.07 ^{ab}	6.27 ± 0.08 ^a	7.71 ± 0.11 ^{ab}	9.44 ± 0.23 ^c	5.13 ± 0.21 ^c	8.10 ± 0.10 ^b
Eco4%	0	9.02 ± 0.12 ^a	6.77 ± 0.10 ^a	7.24 ± 0.10 ^a	8.40 ± 0.06 ^{ab}	4.31 ± 0.07 ^b	7.01 ± 0.10 ^a
	6	9.22 ± 0.08 ^a	7.10 ± 0.10 ^{ab}	7.36 ± 0.11 ^a	8.62 ± 0.11 ^b	4.17 ± 0.17 ^{ab}	7.23 ± 0.20 ^a
	18	9.70 ± 0.09 ^{ab}	7.74 ± 0.09 ^b	7.98 ± 0.21 ^b	8.70 ± 0.08 ^b	4.22 ± 0.16 ^{ab}	7.47 ± 0.10 ^{ab}
	24	10.03 ± 0.20 ^b	8.55 ± 0.15 ^c	8.80 ± 0.14 ^b	9.16 ± 0.19 ^{bc}	3.92 ± 0.11 ^a	8.01 ± 0.19 ^a

5.6 Analisi del volatiloma attraverso SPME GC/MS

Tramite SPME GC-MS in 24 casi duplicati ($n = 48$) sono state identificate, con oltre l'80% di somiglianza, 161 molecole, avvalendosi della libreria NIST 11 MSMS e del programma NIST MS Search program 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Mediamente 92 sono state quantificate relativamente alla linea di base, mentre 120 in diversi punti di tempo durante le 24 ore degli esperimenti. Per una descrizione più chiara del volatiloma, è stato generato un set di dati di 49 molecole significative (ANOVA a $P < 0,05$). Queste, dunque, sono state ordinate e super normalizzate in classi chimiche di VOCs, cioè: acidi organici, aldeidi, chetoni, alcoli ed indolo. Essendo i principali metaboliti legati all'attività prebiotica, gli acidi organici e gli indoli verranno discussi nel paragrafo successivo. Per quanto riguarda ciascun set di dati delle altre classi, sono state aggiunte analisi multivariate, come PCA non target e MANOVA target ($P < 0.01$) per analizzare il contributo specifico alla produzione di VOCs da parte delle variabili indipendenti. La super normalizzazione del set di dati è essenziale per svelare l'effetto di quei composti che sono meno volatili di altri e potrebbero risultare sottorappresentati, oltre a non confondere una classe chimica con un'altra (Nissen *et al.*, 2020).

Analizziamo, dunque, le classi chimiche di composti organici volatili delle aldeidi, dei chetoni e degli alcoli.

Le aldeidi si originano dalla fermentazione microbica e dall'ossidazione lipidica, nonché dalla trasformazione dell'etanolo. Alcune, come l'indolo-3-aldeide, contribuendo positivamente all'omeostasi cellulare ed all'eubiosi, sono promotrici della salute; altre come l'acetaldeide o la benzaldeide sono citotossiche a bassa soglia. La PCA di 10 aldeidi statisticamente significative ha distribuito i casi sul plot, separando la fermentazione di FOS e di Eco4% l'una dall'altra e dalla linea di base (come mostrato in figura 23 A).

Il campione di controllo non ha contribuito alla produzione di aldeidi.

Per quanto riguarda, invece, i descrittori della fermentazione di FOS, questi sono stati:

- Esanale,
- Butanale 2-metile

Il butanale 2-metile è stato prodotto per il 50,4% di tutti i casi da FOS, e per il 61,2% nei punti di tempo 14 e 24 h (MANOVA $P < 0.01$)

Passando alle aldeidi che descrivono la fermentazione di Eco 4% queste sono state:

- Benzeneacetaldeide,
- Nonanale,
- 2-Nonenale

La 2-Nonenale è stata prodotta per il 77,7% di tutti i casi dalla fermentazione di questo substrato e per il 78,5% all'endpoint (24 h) (MANOVA $P < 0,01$). Questo composto è il risultato della degradazione degli acidi palmitoleici o dei lipidi secreti dalla pelle prodotti dalle perossidasi batteriche umane; si trova in campioni fecali umani e nella pelle (*Haze et al., 2001; Mitro et al., 2012*). Poiché è in grado di bloccare la crescita di diversi agenti patogeni intestinali, sia indigeni che di origine alimentare, potrebbe avere un ruolo prebiotico (*Cho et al., 2004*).

Durante la fermentazione colonica, vengono prodotti molti chetoni. Considerando i loro attributi bioattivi, alcuni, come i corpi chetonici, sono desiderabili, mentre altri, come l'acetone sono indesiderati poiché possono risultare tossici per l'ospite. La PCA di 13 chetoni statisticamente significativi ha distribuito i casi sul plot, separando i trattamenti uno dall'altro e dalla linea di base (figura 23 B)

Il descrittore principale della fermentazione di Eco0% è stato l'acetone, prodotto per il 43,5% (MANOVA $P < 0,01$) da questo substrato, non significativamente distribuito tra le quattro categorie di tempo.

Per quanto riguarda FOS, i suoi principali descrittori sono stati:

- 2-Eptanone,
- Butanedione,
- 2,4-Pentanedione,
- 2-Butanone, 4-idrossi

In tutti i casi, quest'ultimo chetone è stato prodotto da FOS per il 46,2% e per il 74,3% nei punti di tempo intermedi cioè a 6 e 18 ore (MANOVA $P < 0,01$).

Analizzando i principali descrittori della fermentazione di Eco 4% invece si riscontrano:

- Esanone-5-metile,
- 2-Butanone,
- Acetofenone

L'acetofenone ha caratterizzato il 60,7% di tutti i casi ed è stato prodotto per il 54,9% all'endpoint (MANOVA $P < 0,01$). Oltre ad essere presente in molti animali e piante, questa molecola si trova nelle feci umane, come dimostrato da studi nutrizionali in cui si somministrava una supplementazione probiotica (Vitali *et al.*, 2011). Inoltre, i suoi derivati N-sostituiti sono stati proposti come approccio terapeutico nel diabete (Taslimi *et al.*, 2020). Dai risultati di questo studio, la maggior parte dell'acetofenone prodotto dovrebbe derivare dalla deconiugazione batterica dei polifenoli, dei quali il campione Eco4% è più ricco.

Dalla fermentazione dei polisaccaridi alimentari condotta dal microbiota del colon, si originano anche alcoli. La PCA di 13 alcoli statisticamente significativi ha distribuito casi sul plot, separando la fermentazione con FOS ed Eco 4% l'una dall'altra e dalla linea di base (figura 23 C).

Il contributo alla produzione di alcoli del campione di controllo è rimasto indiscriminato.

Per quanto riguarda FOS, dal PCA il suo principale descrittore risulta essere l'alcol etilico, che per il 65,0% di tutti i casi è stato prodotto da FOS, e per il 65,6% questo substrato lo ha prodotto in punti di tempo diversi rispetto alla linea di base (MANOVA $P < 0.01$).

Infine, considerando la fermentazione di Eco 4%, i principali alcoli prodotti sono stati:

- Alcol fenilico
- 1-esanolo
- 1-pentanolo

Quest'ultimo è stato descritto da Eco4% per il 58,7% di tutti i casi e per il 58,9% è stato prodotto nei punti di tempo pari a 18 e 24 ore (MANOVA $P < 0,01$). L'1-pentanolo è stato riscontrato nelle feci di volontari sottoposti ad una dieta nella quale erano presenti prodotti a base di grani antichi, che presentano attività antiinfiammatoria e controazione dello stress ossidativo (Tanayo-Saa *et al.*, 2014).

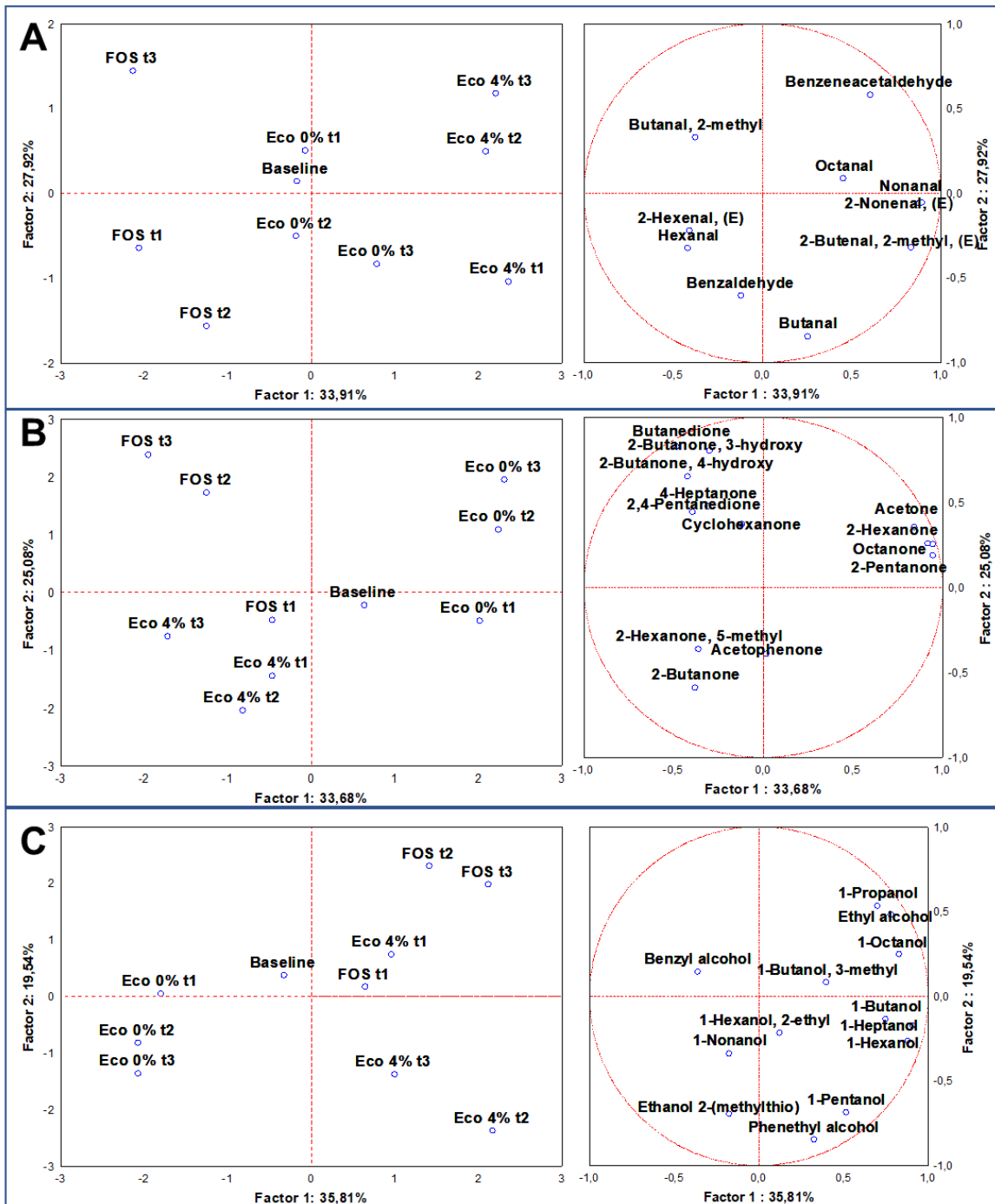


Figura 23. PCA del volatiloma di VOCs significativi, ordinati per classi chimiche (ANOVA $P < 0,05$), inclusa la linea di base e tre diversi punti di tempo ($t1 = 6$ h; $t2 = 18$ h; $t3 = 24$ h).

A = aldeidi, B = chetoni, C = alcoli.

I diagrammi sul lato sinistro sono per i PCA dei casi, mentre i diagrammi sul lato destro sono per i PCA delle variabili.

5.7 Cambiamenti nei principali metaboliti microbici legati al potenziale prebiotico

Sono stati selezionati 13 VOCs con rinomata bioattività nell'ospite (SCFAs, MCFAs, BCFAs, indolo e scatolo) di cui è stata considerata la variazione del carico dalla linea di base all'endpoint di fermentazione. Ogni singolo composto è stato normalizzato (mean centering method) all'interno del suo set di dati che include casi di diverso tipo di campione ed un punto di tempo. Il dataset di base è stato quindi sottratto al dataset dell'endpoint. L'analisi post hoc è stata fatta per confrontare tra loro le produzioni dei campioni di una singola molecola (HSD di Tuckey, $P < 0,05$) e per non confrontare una molecola con un'altra. Vediamo, dunque, i risultati riguardanti questi metaboliti.

Gli acidi grassi a corta catena contribuiscono all'omeostasi cellulare (*Sun et al., 2018*), alla regolazione ormonale nel flusso sanguigno (*Larraufie et al., 2018*), alla difesa nei confronti di batteri patogeni ed opportunistici (*Lamas et al., 2019*), ed alla promozione dello sviluppo dei probiotici e dei batteri benefici (*Sanders et al., 2019*). Sono, dunque, composti essenziali per l'ospite, la mucosa, ed il microbiota del colon.

Dai risultati di questo studio (presentati nella figura 24 A) si evidenzia che nel caso di Eco0% non sono stati registrati aumenti di SCFAs, bensì una riduzione dei quantitativi di acido acetico e propanoico. La fermentazione di FOS ed Eco 4%, invece, ha determinato incrementi di SCFAs. Inoltre, FOS ha dimostrato di avere la capacità di produrre SCFAs tre volte in più rispetto ad Eco4%. In particolare, FOS ha prodotto 2,1 volte in più di acido acetico; 2,6 volte in più di acido propanoico e 5,5 volte in più di acido butanoico rispetto ad Eco4% ($P < 0,05$). D'altra parte, la fermentazione di Eco4% è stata in grado di produrre una quantità maggiore di SCFAs rispetto ad Eco0%, come 6,2 volte in più di acido butanoico ($P < 0,05$). L'attività prebiotica di Eco4%, quindi, in modo simile all'azione di FOS, deriva dalla capacità di favorire quei batteri che sono in grado di deconstituire la fibra e liberare gli acidi grassi a corta catena nel colon.

Passando ai MCFAs, questi sono acidi grassi insaturi con un numero di C che va da 6 a 12, prodotti dal microbiota del colon durante l'allungamento della catena dei prodotti intermedi di fermentazione delle fibre o dalla degradazione diretta delle fibre eseguita dalle *Bifidobacteriaceae*. Anche in questo caso, sono noti i loro effetti benefici sull'ospite: ad esempio, favoriscono l'omeostasi del glucosio durante la sovralimentazione ad alto contenuto di grassi ed hanno effetti protettivi contro la resistenza all'insulina (*Lundsgaard et al., 2020*).

Come evidenziato da Kaiya et al. (2012), uno dei possibili meccanismi alla base dell'interazione tra microbiota e metabolismo dell'ospite è attraverso ormoni che regolano l'appetito. Nel caso della grelina, l'unica modifica acilica subita è attribuita ai MCFAs. Inoltre, i livelli di MCFAs sono importanti biomarcatori metabolici dei cambiamenti correlati alla malattia intestinale (IBD). Allo stato attuale delle conoscenze, una riduzione del loro contenuto dovrebbe essere collegata ad una disbiosi del microbiota intestinale.

I risultati di questo studio (figura 24 B) mostrano che i MCFAs, rispetto alla quantificazione riscontrata alla linea di base, sono aumentati solamente durante le fermentazioni di FOS o Eco4%.

Nel caso di Eco0%, infatti, sono stati osservati leggeri cambiamenti solo per tre acidi grassi a media catena su sei. Questo significa che nessun effetto deriva dal controllo, dunque ciò che è stato trovato dopo la fermentazione di Eco4% è relativo al microbiota del colon.

La fermentazione di FOS è stata quella che ha prodotto i carichi più elevati di tutti i MCFAs testati, ad eccezione dell'acido ottanoico (prodotto per la maggior parte dalla fermentazione di Eco4%). In particolare, FOS ha prodotto: tutto l'acido pentanoico determinato; 4,5 volte in più di acido esanoico; 1,4 volte in più di acido eptanoico; 4,4 volte in più di acido nonanoico e 1,7 volte in più di acido n-decanoico ($P < 0,05$) rispetto ad Eco4%.

Eco4%, ha prodotto rispetto a FOS 5,7 volte in più di acido ottanoico ($P < 0,05$). Rispetto al suo controllo negativo Eco0%, invece, ha prodotto: acido ottanoico; acido nonanoico; acido n-decanoico e 5,2 volte in più di acido esanoico e 8,9 volte in più di acido eptanoico ($P < 0,05$). Dunque, l'aumento dell'abbondanza di MCFAs che è stato registrato, indicando che Eco4% è in grado di promuovere quei microrganismi produttori di acidi grassi a media catena come le *Enterobacteriaceae* e *Bacteroides* spp., ne conferma l'attività prebiotica.

Passiamo, quindi, all'analisi dei BCFAs. Gli acidi grassi a catena ramificata, come l'acido 2-metil propanoico; l'acido 3-metil butirrico e l'acido 3-metil pentanoico, derivano dalla fermentazione microbica nel colon delle proteine, che produce anche NH_3 , fenolo ed ammine solforate. I BCFAs sono spesso utilizzati come biomarcatori del catabolismo proteico, tuttavia, poco si sa del loro impatto sulla salute dell'ospite. Sono, invece, indiscusse le conseguenze negative dei composti pro-infiammatori e citotossici prodotti dagli amminoacidi basici ed aromatici contenenti zolfo (*Olyphant and Allen-Vercoe, 2019*).

I risultati di questo studio mostrano che i BCFAs sono aumentati solo nella fermentazione di Eco0% (figura 24 C).

Per quanto riguarda FOS sono stati registrati modesti incrementi di acido 2-metil propanoico (Prop2M); mentre nel caso di Eco4% piccoli aumenti di acido 3-metil pentanoico (Penta3M). Questi due substrati, quindi, sono in grado di ridurre allo stesso modo l'acido 3-metil butirrico. Rispetto all'impennata vista per i tre BCFAs in seguito alla fermentazione di Eco0%, una riduzione o un piccolo aumento guidato da Eco4%, potrebbero testimoniare che il prodotto testato sta plasmando il microbiota, favorendo maggiormente la crescita di quel core microbico di base specializzato nella fermentazione delle fibre, piuttosto che di quello specializzato nella fermentazione proteica. Poiché questa situazione si verifica anche quando viene fermentato FOS, possiamo aggiungere un'altra prova a favore del reale potenziale prebiotico di Eco4%. Infine, ci soffermiamo sulla produzione di indolo e scatolo a seguito della fermentazione dei nostri substrati. Questi due composti derivano dal catabolismo del triptofano, derivante dalla degradazione della porzione proteica del cibo o della dieta.

Diversi batteri commensali, come *Clostridium* spp ed *Escherichia* spp, utilizzando la triptofanasi, trasformano il triptofano in indolo. Poiché altera la permeabilità e l'omeostasi della mucosa, l'accumulo di questo catabolita è tossico per l'ospite ed una volta metabolizzato in solfato indossilico nel fegato, può portare a malattie renali croniche e malattie vascolari (Wang et al., 2020; Hendrix and Schanbl, 2019).

Invece lo scatolo (indolo 3-metile) si origina dalla decarbossilazione batterica del triptofano, eseguita da *Clostridium* spp e *Bacteroides* spp. Questa molecola è dannosa perché porta alla produzione di citochine infiammatorie (Roager and Licht, 2018). Come affermato da Hendrix and Schanbl (2019), la modulazione del metabolismo del triptofano e del metabolismo proteico può giovare all'intestino dell'ospite, soprattutto quando è coinvolta una disbiosi.

I risultati di questo studio (figura 24 D) mostrano che per quanto riguarda il data set della linea di base, gli shift registrati in seguito alle fermentazioni di FOS ed Eco4% hanno indicato una riduzione della quantità sia di indolo che di scatolo. Entrambi i substrati sono stati in grado di ridurre allo stesso modo il contenuto di indolo ($P > 0,05$), mentre quello di scatolo è stato ridotto quasi due volte in più da FOS rispetto ad Eco4% ($P < 0,05$).

Per quanto riguarda Eco0%, invece, si è registrato un aumento di entrambi i composti.

Anche da questi risultati, dunque, analogamente a quanto accaduto per i BCFAs, possiamo sostenere che Eco4% sta plasmando il microbiota a vantaggio di quei gruppi batterici specializzati nella fermentazione delle fibre più che in quella delle proteine, caratterizzandone il potenziale prebiotico.

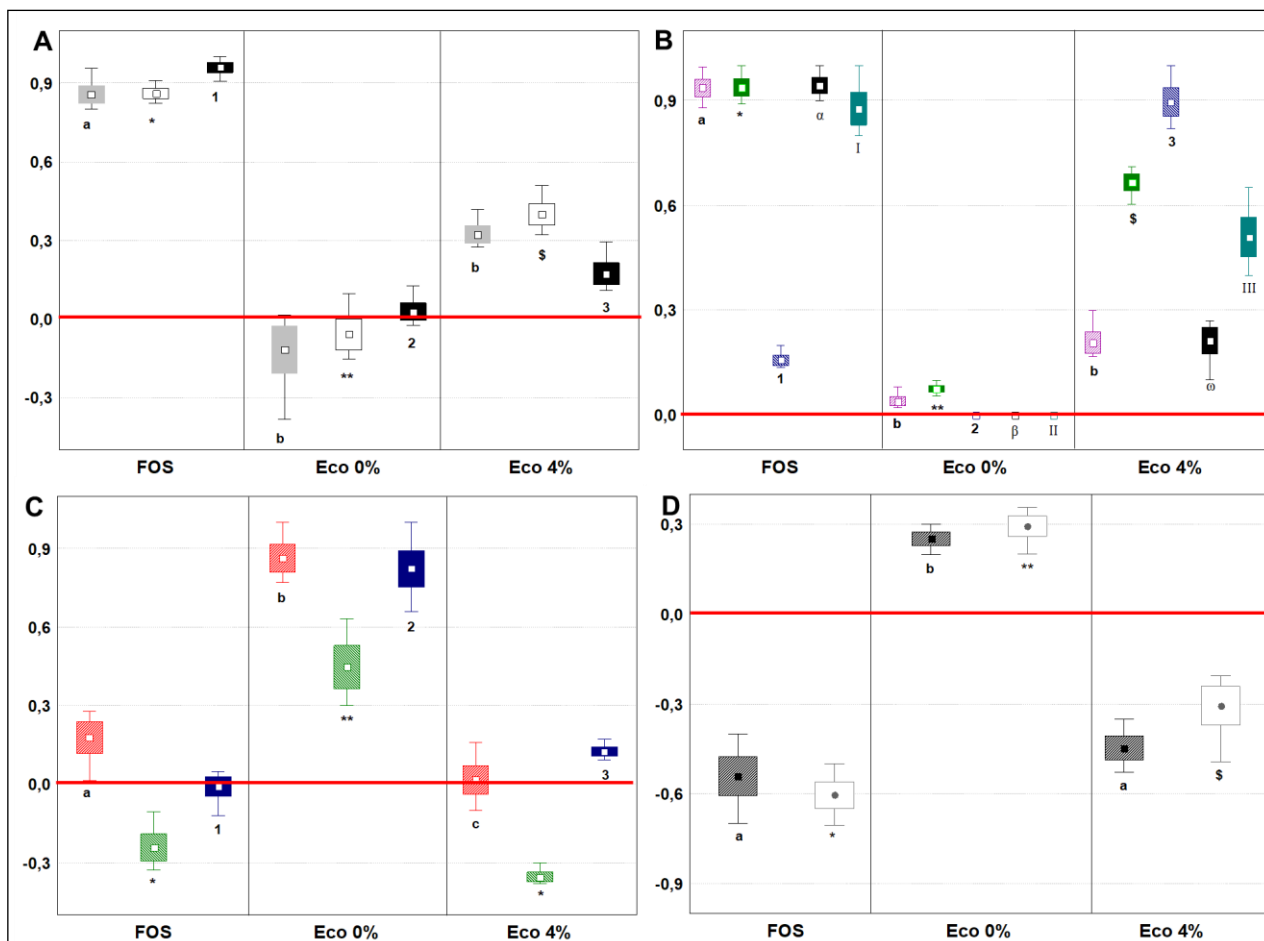


Figura 24. Cambiamenti all'endpoint dei principali metaboliti microbici correlati all'attività prebiotica espressa come scala normalizzata dell'abbondanza relativa rispetto alla linea di base (linea rossa).

Le variazioni sono state registrate dopo 24 ore di fermentazione coloniche batch in vitro inoculate con feci umane ($n = 3$ donatori sani) ed amministrare con FOS, Eco 4% ed Eco0%. I campioni sono stati analizzati in duplice copia da due esperimenti indipendenti ($n = 4$). Box = media; Rettangoli = media * S.D.; Baffi = valori minimo e massimo. I casi con lettere o numeri o simboli diversi tra una singola variabile indipendente sono significativamente diversi per il test HSD di Tuckey ($P < 0.05$). A) SCFAs: plot grigio = acido acetico; plot bianco = acido propanoico; plot nero = acido butanoico. B) MCFAs: plot fucsia = acido esanoico; plot verde = acido eptanoico; plot a strisce blu = acido ottanoico; plot nero = acido nonanoico; plot blu pallido = acido n-decanoico. C) BCFAs: plot rosso = acido 3-metil propanoico; plot verde = acido 2-metil butanoico; plot blu = acido 3 metil pentanoico. D) Indoli: plot grigio = indolo; plot bianco = scatolo.

5.8 Correlazioni multi-omiche relative al potenziale prebiotico

Dal confronto di due diversi set di dati normalizzati, ciascuno derivato da valori di quantificazione relativa (OTUs e VOCs), sono state eseguite le correlazioni di rango Spearman ($P < 0.05$), le mappe di calore a due direzioni, e l'analisi dei cluster di Pearson (figura 25). Dai dendrogrammi di Pearson sono stati identificati 3 cluster: i primi due potrebbero rafforzare gli outputs sul potenziale prebiotico finora presentati attraverso le fermentazioni di Eco4%, mentre il terzo include gli OTUs meno abbondanti e presumibilmente meno metabolicamente attive in Eco 4%.

Il primo cluster includeva *Colinsella aerofaciens*, *Bif. adolescentis*, *M. elsdenii*, e *Lach. pectinoshiza*. *Colinsella aerofaciens* si è scoperto essere positivamente correlato ai valori elevati di SCFAs e MCFAs (con ogni VOCs che aveva un $P < 0,05$) ed inversamente correlato all'acido 3-metil pentanoico ed allo scatolo (entrambi con $P < 0,05$). Per quanto riguarda *M. elsdenii*, è noto che produce a partire dall'acetato o dal lattato sintetizzati da *Bif. adolescentis* (Moens et al., 2019). Il lattato, che non è uno SCFAs, è prodotto anche come risultato della fermentazione ma non si accumula nel colon perché viene utilizzato da diversi batteri produttori di SCFAs, come *Lach. pectinoshiza* e *Colinsella aerofaciens* (Louis et al., 2014).

Un'altra correlazione esplicativa si trova nel cluster 2, dove la riduzione del contenuto di indolo e BCFAs dopo la fermentazione di Eco4% potrebbe essere dovuta agli elevati carichi registrati di *E. durans*, che in questo set di dati risulta positivamente correlato allo scatolo. Quest'ultima situazione potrebbe risultare in divergenza con i risultati visti precedentemente, i quali indicavano che Eco4% era in grado di ridurre il contenuto di scatolo. Altre correlazioni viste in questo cluster possono aiutarci a fare chiarezza: ad esempio, altre OTUs ben rappresentate nelle fermentazioni di Eco4%, come *F. prausnitzii* e *A. muciniphila* (1.81%), rappresentano una correlazione negativa che contrasta con il dannoso scatolo. Inoltre, queste tre specie, insieme a *P. distasonis* (cluster 1), sono state positivamente correlate con l'acido ottanoico che è stato trovato più abbondante in seguito alle fermentazioni di Eco4% rispetto a quelle di FOS. L'aumento di MCFAs che è stato registrato in seguito alle fermentazioni di questi due substrati, ha indicato che Eco4% è in grado di promuovere quei commensali, come le *Enterobacteriaceae*, che allungano i MCFAs da quegli acidi organici prodotti da altri batteri o dalla degradazione diretta delle fibre operata da *Bif. longum* e *Bif. bifidum* (Scarborough et al., 2019). Eco4% e FOS sono stati addirittura in grado di diminuire la popolazione di

Enterobacteriaceae opportunistiche e *Desulfovibrioanceae*; così come i livelli di indolo e BCFA. È stata trovata, infatti, una correlazione positiva tra *Cit. freundii*, *E. albertii* e *Bil. wadsworthia* (cluster 3) con la produzione di tali composti nocivi.

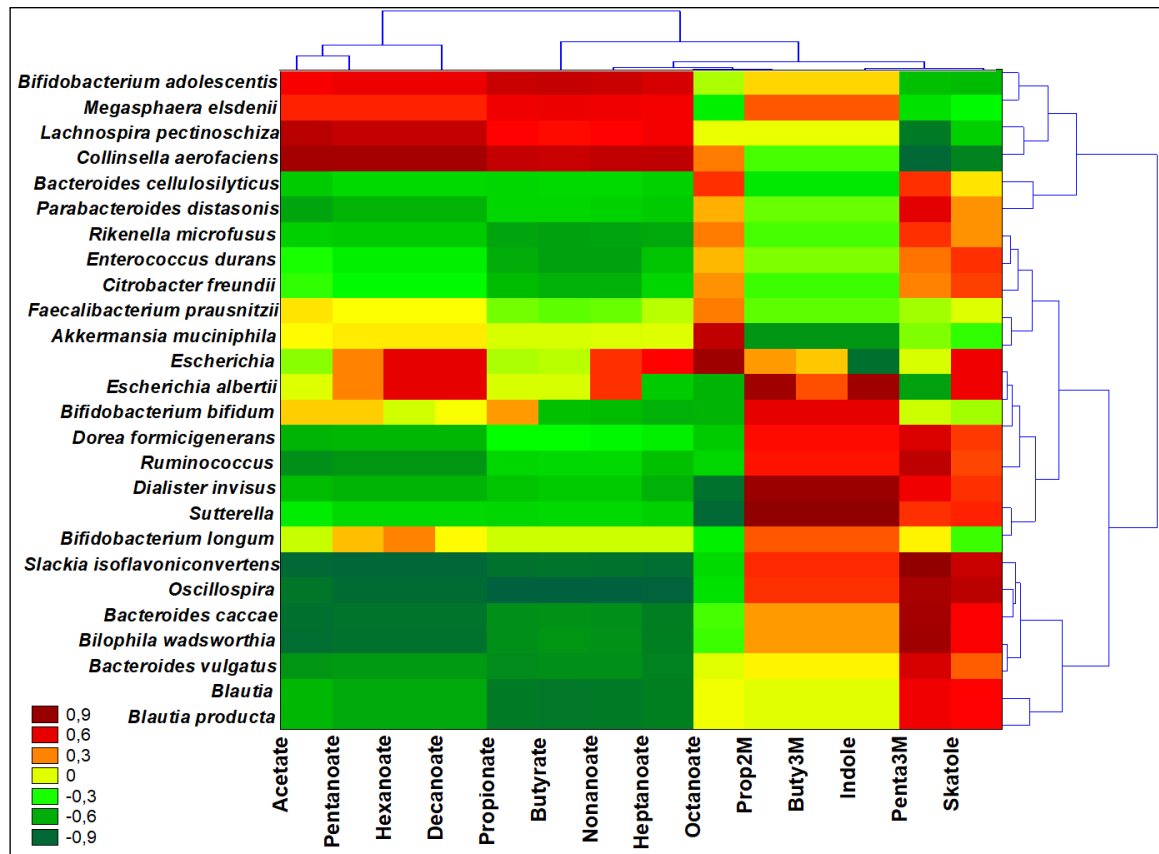


Figura 25. Correlazioni di rango Spearman tra i principali metaboliti microbici del volatiloma e le specie OTUs del microbiota, ANOVA significativa ($P < 0.05$). Prop 2M = acido 2-metil propanoico, Buty3M = acido 3-metil butanoico, Penta3M = acido 3-metil pentanoico. Il dendrogramma del lato sinistro è stato identificato mediante l'analisi di Pearson di tre grandi cluster diversi tra le specie batteriche.

6. Conclusioni

In conclusione, dai risultati di questo studio è possibile affermare che il prototipo di pane arricchito con il 4% di sansa di oliva sgrassata (Eco4%) possiede un potenziale prebiotico più debole rispetto ai frutto-oligosaccaridi dell'inulina, ma più forte del suo pane di controllo privo di polifenoli aggiunti.

L'affermazione prebiotica di questo prodotto si basa sui risultati positivi ottenuti da diversi indicatori prebiotici.

Eco4%, infatti, durante il periodo di fermentazione, mantenendo un rapporto F/B equilibrato, ed una simile diversità alfa nella composizione del microbiota, non ha influenzato l'eubiosi e non ha indotto la disbiosi. Inoltre, l'incremento registrato dell'abbondanza di specie probiotiche o benefiche, come *Lactobacillales* e *Bifidobacteriaceae* (tramite qPCR) e *L. plantarum*, *Bif. adolescentis*, *Bif. longum*, e *Bif. bifidum* (dall'analisi del 16S-rDNA MiSeq) e la parallela diminuzione di specie opportunistiche o patogene, come *E. coli* (tramite qPCR), *E. albertii* e *Citrobacter freundii* (dall'analisi del 16S-rDNA MiSeq), rappresentano un altro indicatore che conferma l'attività prebiotica di Eco4%.

Considerando i metaboliti, grazie all'analisi del volatiloma, è stata riscontrata la produzione di composti bioattivi liberati durante la fermentazione colonica di Eco4%, come l'acetofenone, il 2-nonenale e l'1-pentanololo. I composti organici volatili trovati presentavano attività antimicrobica rispetto agli agenti patogeni intestinali, capacità antiossidante nei biotest ed azione sul rafforzamento della permeabilità epiteliale. Un altro indicatore che Eco4% ha rispettato, è stata la capacità di favorire quella parte del microbiota coinvolta nella degradazione delle fibre vegetali, piuttosto che quella specializzata nella fermentazione proteolitica. A dimostrazione di questo, è stata riscontrata da un lato, la limitata produzione di acidi grassi a catena ramificata e cataboliti del triptofano (indolo e scatolo), dall'altro la sintesi di acidi grassi a corta e media catena.

Questi risultati sono supportati da un chiaro e logico approccio statistico multivariato, in grado di combinare dati di genomica e di metabolomica microbica, in una vetrina interomica; il tutto a dimostrazione della visibile relazione causa-effetto generata da una certa fibra che possiede un potenziale prebiotico.

Come è ormai noto, l'azione di un prebiotico per quanto riguarda il microbiota del colon è più ampia di quanto ci si aspetti. Dunque, per la sua valutazione è necessario uno strumento in grado di studiare la complessa ecologia microbica sottostante. I modelli di intestino in vitro sono la soluzione giusta, poiché possono spiegare l'impatto dei prebiotici sul microbiota intestinale umano. Questi strumenti, infatti, focalizzandosi sullo shift dei gruppi microbici principali e su quello di specie selezionate e dei loro metaboliti, permettono di studiare la diversità, la ricchezza, la composizione e l'abbondanza della comunità nel tempo, in un ambiente che riproduce il colon umano.

In questo studio è stato utilizzato MICODE (Multi-Unit In vitro Colon Model), la cui validazione è stata confermata da alcuni parametri: la permanenza, durante tutto il periodo di fermentazione, delle specie *Archea*; la capacità di FOS di promuovere i probiotici; il mantenimento nel sistema di OTUs osservate simili e delle specie rare (tramite Good's index). Considerando il volatiloma, invece, sono stati rilevati composti derivanti dalle feci mantenuti allo stesso tempo di ritenzione su qualsiasi campione.

Grazie a questi risultati, dunque, è possibile affermare che MICODE si è rivelato un modello in vitro a fermentazione fecale in batch robusto ed affidabile.

7. Bibliografia

- Abdulkadir, B. et al. Routine use of probiotics in preterm infants: longitudinal impact on the microbiome and metabolome. *Neonatology* 109, (239–247) (2016).
- Abrams, S. A., Griffin, I. J. & Hawthorne, K. M. Young adolescents who respond to an inulin- type fructan substantially increase total absorbed calcium and Whisner, C. M. et al. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double- blind cross- over trial. *Br. J. Nutr.* 110, 1292–1303 (2013).
- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M. & Ellis, K. J. Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *J. Pediatr.* 151, 293–298 (2007).
- Aguirre M, Jonkers DM, Troost FJ et al. In vitro characterization of the impact of different substrates on metabolite production, energy extraction and composition of gut microbiota from lean and obese subjects. *PLoS One* 2014;9:e113864.
- Agus A.; Planchais, J.; Sokol, H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe*. 2018, 23, 716–24.
- Akbari, P. et al. Characterizing microbiota- independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size: structure activity relationships of non-digestible oligosaccharides. *Eur. J. Nutr.* 56, 1919–1930 (2017).
- Alexeev, E.E, Lanis, J.M., Kao D. J., Campbell, E.L., Kelly C.J., Battista, K.D., Gerich, M.E., Jenkins, B.R., Walk, S.T., Kominsky, D.J., Colgan S.P. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *The American Journal of Pathology*, 2018, 188, 1183-1194.
- Aoudia, N. et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiol.* 53, 51–59 (2016).
- Arslanoglu, S. et al. Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26, 49–59 (2012).
- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B. & Kennedy, J. F. Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 817–834 (2016).

Bansal, T.; Alaniz, R.C.; Wood, T.K.; Jayaraman, A. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107 (1) 228-233. <https://doi:10.1073/pnas.0906112107>

Barroso E, Cueva C, Peláez C et al. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *LWT- Food Sci Technol* 2015;61:283–89.

Becker N, Kunath J, Loh G et al. Human intestinal microbiota: characterization of a simplified and stable gnotobiotic rat model. *Gut Microbes* 2011;2:25–33.

Belzer C, de Vos WM. Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia. *ISME J* 2012;68:1449–458.

Beserra, B. T. et al. A systematic review and metaanalysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. *Clin. Nutr.* 34, 845–858 (2015).

Bhatia, S. et al. Galacto- oligosaccharides may directly enhance intestinal barrier function through the modulation of goblet cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 566–573 (2015).

Bolognini, D. et al. Chemogenetics defines receptor-mediated functions of short chain free fatty acids. *Nat. Chem. Biol.* 15, 489–498 (2019).

Bonder, M.J.; Tigchelaar, E.F.; Cai, X.; Trynka, G.; Cenit, M.C.; Hrdlickova, B.; Zhong, H.; Vatanen, T.; Gevers, D.; Wijmenga, C.; et al. The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Med.* 2016, 8, 45.

Boubaker, M., Omri, A. E., Blecker, C., & Bouzouita, N. (2016). Fibre concentrate from artichoke (*Cynara scolymus* L.) stem by-products: Characterization and application as a bakery product ingredient. *Food Science and Technology International*, 22(8), 759–768. <https://doi.org/10.1177/1082013216654598>

Bourassa, M.W.; Alim, I.; Bultman, S.J.; Ratan, R.R. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neuroscience Letters*, 2016, 625, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.009>

Cândido, F.G.; Valente, F.X.; Grzeńskowiak, Ł.M.; Moreira, A.P.B.; Rocha, D.M.U.P.; Alfenas, R.C.G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr.* 2018, 69, 125–143.

Canfora, E. E., Jocken, J. W. & Blaak, E. E. Short- chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 577–591 (2015).

Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh, P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010, 7(5), 335-6.

Capurso Lucio. *Recenti Prog Med* 2016; 107: 257-266

Chambers, E. S., Morrison, D. J. & Frost, G. Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proc. Nutr. Soc.* 74, 328–336 (2015).

Chassaing, B.; Koren, O.; Goodrich, J.K.; Poole, A.C.; Srinivasan, S.; Ley, R.E.; Gewirtz, A.T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 2015, 519, 92–96.

Chen, T. et al. Fiber- utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides- dominated gut microbiota. *Sci. Rep.* 7, 2594 (2017).

Childs, C. E. et al. Xylo- oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double- blind, placebo- controlled, randomised, factorial cross- over study. *Br. J. Nutr.* 111, 1945–1956 (2014).

Chiu, L. et al. Protective microbiota: from localized to long- reaching co- immunity. *Front. Immunol.* 8, 1678 (2017).

Cho M. J.; Buescher R.W.; Johnson M.; Janes M. Inactivation of Pathogenic Bacteria by Cucumber Volatiles (E,Z)-2,6-Nonadienal and (E)-2-Nonenal. *J Food Prot*, 2004, 67 (5): 1014–1016.

Chong PP, Chin VK, Looi CY et al. The microbiome and irritable bowel syndrome—a review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Front Microbiol* 2019;10:1136.

Cieplak T, Wiese M, Nielsen S et al. The smallest intestine (TSI)— a low volume in vitro model of the small intestine with increased throughput. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365:1–8.

Clarke, G. et al. Gut reactions: breaking down xenobiotic- microbiome interactions. *Pharmacol. Rev.* 71, 198–224 (2019).

Collins, S. L. et al. Promising prebiotic candidate established by evaluation of lactitol, lactulose, raffinose, and oligofructose for maintenance of a *Lactobacillus*- dominated vaginal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02200-17 (2018).

Constante, M.; Fragoso, G.; Lupien-Meilleur, J.; Calvé, A.; Santos, M.M. Iron supplements modulate colon microbiota composition and potentiate the protective effects of probiotics in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2017, 23, 753–766.

Costabile A, Walton GE, Tzortzis G et al. Effects of orange juice formulation on prebiotic functionality using an in vitro colonic model system. *PLoS One* 2015;10:e0121955.

Costabile, A. et al. An in vivo assessment of the cholesterol- lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults. *PLOS ONE* 12, e0187964 (2017).

Cueva C, Jimé'nez-Giro'n A, Muñoz-Gonza'lez I et al. Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Res Int* 2015;72:149–59.

David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014, 505, 559–563.

De Filippis, F.; Pellegrini, N.; Vannini, L.; Je ry, I.B.; La Storia, A.; Laghi, L.; Serrazanetti, D.I.; Di Cagno, R.; Ferrocino, I.; Lazzi, C.; et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* 2016, 65, 1812–1821.

De Palma, G.; Nadal, I.; Collado, M.C.; Sanz, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br. J. Nutr.* 2009, 102, 1154–1160.

De Roy K, Marzorati M, Van den Abbeele P et al. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ Microbiol* 2014;16:1472–481.

Del Piano, M. et al. The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double- blind, randomized, placebo-controlled study. *J. Clin. Gastroenterol.* 44 (Suppl. 1), S30–S34 (2010).

Den Hartigh, L.J. Conjugated linoleic acid effects on cancer, obesity, and atherosclerosis: A review of pre-clinical and human trials with current perspectives. *Nutrients* 2019, 11, 370.

Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:1469–476.

Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM et al. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006; 21:517–23.

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman D. An ecological and evolutionary perspective on human microbe mutualism and disease. *Nature* 2007; 449:811–18.

Di Cagno, R.; De Angelis, M.; De Pasquale, I.; Ndagijimana, M.; Vernocchi, P.; Ricciuti, P.; Gagliardi, F.; Laghi, L.; Crecchio, C.; Guerzoni, M.E.; et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: Molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011, 11, 219.

Di Nunzio, M.; Picone, G.; Pasini, F.; Chiarello, E.; Caboni, M.F.; Capozzi, F.; Gianotti, A.; Bordoni, A. Olive oil by-product as functional ingredient in bakery products. Influence of processing and evaluation of biological effects. *Food Res Intern.* 2020, 131.

Do, M.H.; Lee, E.; Oh, M.J.; Kim, Y.; Park, H.Y. High-glucose or -fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients* 2018, 10, 761.

Doo EH, Chassard C, Schwab C et al. Effect of dietary nucleosides and yeast extracts on composition and metabolic activity of infant gut microbiota in PolyFermS colonic fermentation models. *FEMS Microbiol Ecol* 2017;93.

Dostal A, Fehlbaum S, Chassard C et al. Low iron availability in continuous in vitro colonic fermentations induces strong dysbiosis of the child gut microbial consortium and a decrease in main metabolites. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;83:161–75.

Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G et al. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1073–078.

Dustin D. Heeney, Zhengyuan Zhai, Zach Bendiks, Javad Barouei, Alice Martinic, Carolyn Slupsky & Maria L. Marco. *Lactobacillus plantarum* bacteriocin is associated with intestinal and systemic improvements in diet-induced obese mice and maintains epithelial barrier integrity in vitro. *Gut Microbes*, 2019, 3, 382-397.

Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010, 26: 2460– 2461.

Emanuele Rinninella, Marco Cintoni, Pauline Raoul, Loris Riccardo Lopetuso, Franco Scaldaferri, Gabriele Pulcini, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, and Maria Cristina Mele. Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients* 2019, 11, 2393.

Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol.* 2013;218:R37–R47

Falony, G. et al. In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin- type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 454–461 (2009).

Fang, H. R., Zhang, G. Q., Cheng, J. Y. & Li, Z. Y. Efficacy of *Lactobacillus*- supplemented triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in children: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Pediatr.* 178, 7–16 (2019).

Fehlbaum S, Chassard C, Haug MC et al. Design and investigation of Polyferms in vitro continuous fermentation models inoculated with immobilized fecal microbiota mimicking the elderly colon. *PLoS One* 2015;10:e0142793.

Flint, H. J., Duncan, S. H. & Louis, P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 59–65 (2017).

Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P. & Louis, P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 74, 13–22 (2015).

Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P. & Forano, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306 (2012).

Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> (2001).

Fooks, L. J. & Gibson, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 67–75 (2002).

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun.* 2010;24:9–16

Frank DN St, Amand AL, Feldman RA et al. Molecular phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13780–785.

Frost, G. et al. The short- chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.* 5, 3611 (2014).

Ganji L, Alebouyeh M, Shirazi MH, Eshraghi SS, Mirshafiey A, Ebrahimi Daryani N, Zali MR. Dysbiosis of fecal microbiota and high frequency of *Citrobacter*, *Klebsiella* spp., and *Actinomyces* in patients with irritable bowel syndrome and gastroenteritis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2016, 9(4), 325-330.

Garcia-Mantrana, I.; Selma-Royo, M.; Alcantara, C.; Collado, M.C. Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 890.

Gerard Clarke, Roman M. Stilling, Paul J. Kennedy, Catherine Stanton, John F. Cryan, and Timothy G. Dinan. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology* 28: 1221–1238, 2014.

Gibson GR and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota– introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401–412.

Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT. Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microb* 1988;54:2750–755.

Gibson, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 491–502 (2017).

Giuliani C, Marzorati M, Daghighi M et al. Effects of olive and pomegranate by-products on human microbiota: a study using the SHIME R® in vitro simulator. *Molecules* 2019;24:3791.

Giuliani C, Marzorati M, Innocenti M et al. Dietary supplement based on stilbenes: a gutmicrobial metabolism by the in vitro simulator M-SHIME R®. *Food Funct* 2016;7:4564–575.

Goss, S. L., Lemons, K. A., Kerstetter, J. E. & Bogner, R. H. Determination of calcium salt solubility with changes in pH and P(CO₂), simulating varying gastrointestinal environments. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1485–1492 (2007).

Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotech* 2012;30:591–600.

Guzman-Rodriguez M, McDonald JAK, Hyde R et al. Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. *Methods* 2018;14:931–41.

Ha, C. W., Lam, Y. Y. & Holmes, A. J. Mechanistic links between gut microbial community dynamics, microbial functions and metabolic health. *World J. Gastroenterol.* 20, 16498–16517 (2014).

Hager, A.-S. et al. Influence of the soluble fibres inulin and oat β -glucan on quality of dough and bread. *Eur. Food Res. Technol.* 232, 405–413 (2011).

Halmos, E.P.; Power, V.A.; Shepherd, S.J.; Gibson, P.R.; Muir, J.G. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2014, 146, 67–75.

Hamaker, B. R. & Tuncil, Y. E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. *J. Mol. Biol.* 426, 3838–3850 (2014).

Harmsen HJM, Raangs GC, He T et al. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microb* 2002;68:2982–990.

Havenaar, R. & Huis In't Veld, J. M. J. in *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease Vol. 1* (ed. Wood, B. J. B.) 151–170 (Elsevier Applied Science Publishers, 1992).

Haze S, Gozu Y, Nakamura S, Kohno Y, Sawano K, et al. 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J Invest Dermatol*, 2001, 116: 520–524.

Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C. & Cotter, P. D. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Res.* 5, 2587 (2016).

Hendriks, T.; Schnabl, B. Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation. *J Intern Med.* 2019, 286(1), 32-40.

Hiippala, K.; Kainulainen, V.; Suutarinen, M.; Heini, T.; Bowers, J.R.; Jasso-Selles, D.; Lemmer, D.; Valentine, M.; Barnes, R.; Engelthaler, D.M.; Satokari, R. Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing Bacteroides and Parabacteroides Spp. From A Healthy Fecal Donor. *Nutrients*, 2020, 12, 935.

Hill, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514 (2014).

Hobden M, Martin-Morales A, Gu´erin-Deremaux L et al. In vitro fermentation of NUTRIOSE R soluble fibre in a continuous culture human colonic model system. *Proc Nutr Soc* 2013;8:e77128.

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268–273.

Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. Propionate as a health- promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutr. Rev.* 69, 245–258 (2011).

Hurst, N. R., Kendig, D. M., Murthy, K. S. & Grider, J. R. The short chain fatty acids, butyrate and propionate, have differential effects on the motility of the guinea pig colon. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 1586–1596 (2014).

Ivakhnenko, O. S. & Nyankovskyy, S. L. Effect of the specific infant formula mixture of oligosaccharides on local immunity and development of allergic and infectious disease in young children: randomized study. *Pediatr. Pol.* 88, 398–404 (2013).

Janik, R. et al. Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus* promotion of increases in brain GABA, N- acetyl aspartate and glutamate. *Neuroimage* 125, 988–995 (2016).

Jantchou, P.; Morois, S.; Clavel-Chapelon, F.; Boutron-Ruault, M.C.; Carbonnel, F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: the E3N prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* 2010, 105, 2195–2201.

Kanauchi, O., Andoh, A. & Mitsuyama, K. Effects of the modulation of microbiota on the gastrointestinal immune system and bowel function. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9977–9983 (2013).

Kau A, Ahern P, Griffin N et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 2011;474:327–36.

Kellow, N. J., Coughlan, M. T. & Reid, C. M. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: a systematic review of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.* 111, 1147–1161 (2014).

Kim, N., Yun, M., Oh, Y. J. & Choi, H. J. Mind- altering with the gut: modulation of the gut- brain axis with probiotics. *J. Microbiol.* 56, 172–182 (2018).

Klaenhammer, T. R., Kleerebezem, M., Kopp, M. V. & Rescigno, M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 728–734 (2012).

Klampfer, L.; Huang, J.; Sasazuki, T.; Shirasawa, S.; Augenlicht, L. Inhibition of interferon gamma signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol. Cancer Res.* 2003, 1, 855–862.

Korpela, K. et al. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic- treated and in caesarean- born infants. *Microbiome* 6, 182 (2018).

Kortman Guus AM, Dutilh Bas E, Maathuis Annet JH et al. Microbial metabolism shifts towards an adverse profile with supplementary iron in the TIM-2 i n vitro model of the human colon. *Front Microbiol* 2016;6:1481.

Kotz, C. M., Furne, J. K., Savaiano, D. A. & Levitt, M. D. Factors affecting the ability of a high beta-galactosidase yogurt to enhance lactose absorption. *J. Dairy Sci.* 77, 3538–3544 (1994).

Koutsos A, Lima M, Conterno L et al. Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an in vitro colonic model. *Nutrients* 2017;9:533.

La Fata, G., Weber, P. & Mohajeri, M. H. Probiotics and the gut immune system: indirect regulation. *Probiot. Antimicrob. Proteins* 10, 11–21 (2018).

Lamas, A.; Regal, P.; Vázquez, B.; Cepeda, A.; Franco, C.M. Short Chain Fatty Acids Commonly Produced by Gut Microbiota Influence *Salmonella enterica* Motility, Biofilm Formation, and Gene Expression. *Antibiotics* 2019, 8, 265.

Lamsal, B. P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2020–2028 (2012).

Larraufie, P., Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N. et al. SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep*, 2018, 8, 74.

Lattermann C, Bu`chs J. Microscale and miniscale fermentation and screening. *Curr Opin Biotechnol* 2015;35:1–6.

Lay C, Rigottier-Gois L, HolmstrømK et al. Colonicmicrobiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4153–155.

Le Blay G, Chassard C, Baltzer S et al. Set up of a new in vitro model to study dietary fructans fermentation in formula-fed babies. *Br J Nutr* 2010;103:403–11.

Lederberg J. Infectious history. *Science* 2000;288:287–93. Levi CS, Lesmes U. Bi-compartmental elderly or adult dynamic digestion models applied to interrogate protein digestibility. *Food Funct* 2014;5:2402–409.

Li, D., Wang, P., Wang, P., Hu, X. & Chen, F. The gut microbiota: a treasure for human health. *Biotechnol. Adv.* 34, 1210–1224 (2016). 68. Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura,

A. & Kimura, I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* 7, 2839–2849 (2015).

Liang, S. et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* 310, 561–577 (2015).

Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:315–37.

Lindfeldt, M.; Eng, A.; Darban, H.; Bjerkner, A.; Zetterström, C.K.; Allander, T.; Andersson, B.; Borenstein, E.; Dahlin, M.; Prast-Nielsen, S. The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2019, 5, 5.

Liu Y, Gibson GR, Walton GE. An in vitro approach to study effects of prebiotics and probiotics on the faecal microbiota and selected immune parameters relevant to the elderly. *PLoS One* 2016;11:e0162604.

Liu, F., Prabhakar, M., Ju, J., Long, H. & Zhou, H. W. Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* 71, 9–20 (2017).

Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014, 12(10), 661-72.

Louis, P. & Flint, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8 (2009).

Lundsgaard A.M., Fritzen A.M., Sjøberg K.A., Kleinert M., Richter E.A., Kiens B. Small Amounts of Dietary Medium-Chain Fatty Acids Protect Against Insulin Resistance During Caloric Excess in Humans. *Diabetes*, 2020.

Lyte M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med Hypotheses.* 2010;74:634 – 638.

Maldonado-Gomez, M. X. et al. Stable engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the human gut depends on individualized features of the resident microbiome. *Cell Host Microbe* 20, 515–526 (2016).

Matijašič, B.B.; Obermajer, T.; Lipoglavšek, L.; Grabnar, I.; Avguštin, G.; Rogelj, I. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur. J. Nutr.* 2014, 53, 1051–1064.

Maukonen, J.; Saarela, M. Human gut microbiota: Does diet matter? *Proc. Nutr. Soc.* 2015, 74, 23–36.

McDonald, D., Price, M., Goodrich, J. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012, 6, 610–618.

Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Balance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D.J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C.N.; Singh, R.P.; Vegarud, G.E.; Wickham, M.S.; Weitschies, W.; Brodkorb, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.* 2014, 5(6), 1113-24.

Mithieux, G. Metabolic effects of portal vein sensing. *Diabetes Obes. Metab.* 16 (Suppl. 1), 56–60 (2014).

Mitro S, Gordon AR, Olsson MJ, Lundström JN. The Smell of Age: Perception and Discrimination of Body Odors of Different Ages. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e38110.

Mitsou, E.K.; Kakali, A.; Antonopoulou, S.; Mountzouris, K.C.; Yannakoulia, M.; Panagiotakos, D.B.; Kyriacou, A. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br. J. Nutr.* 2017, 117, 1645–1655.

Mokoena, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini- review. *Molecules* 22, E1255 (2017).

Moro, G. et al. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Arch. Dis. Child.* 91, 814–819 (2006).

Moya, A. & Ferrer, M. Functional redundancy- induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. *Trends Microbiol.* 24, 402–413 (2016).

Mujagic, Z. et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double- blind placebo controlled trial. *Sci. Rep.* 7, 40128 (2017).

Murphy, R. et al. Eczema- protective probiotic alters infant gut microbiome functional capacity but not composition: sub- sample analysis from a RCT. *Benef. Microbes* 10, 5–17 (2019).

Nakajima A., Sasaki T, Itoh K, Kitahara T, Takema Y, Hiramatsu K, Ishikawa D, Shibuya T, Kobayashi O, Osada T, Watanabe S, and Nagahara A. A soluble fiber diet increases *Bacteroides fragilis* group and IgA production in the gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020.

Natividad, J.M., Lamas, B., Pham, H.P. et al. *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat Commun*, 2018, 9, 2802.

Neyrinck, A. M. et al. Intestinal sucrase as a novel target contributing to the regulation of glycemia by prebiotics. *PLOS ONE* 11, e0160488 (2016).

Nissen, L., di Carlo, E., Gianotti, A. Prebiotic potential of hemp blended drinks fermented by probiotics. *Food Research International*, 2020, 131.

Nissen, L., Casciano, F., Gianotti, A. Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367, 12.

Nissen, L.; Rollini, M.; Picozzi, C.; Musatti, A.; Foschino, R.; Gianotti, A. Yeast-Free Doughs by *Zymomonas mobilis*: Evaluation of Technological and Fermentation Performances by Using a Metabolomic Approach. *Microorganisms* 2020, 8, 792.

Ng, S. C. et al. Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1286–1298 (2010).

Oliphant, K., Allen-Vercoe, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 2019, 7, 91.

Ozdam, T.; Sela, D.; Xiao, J.; Boyacioglu, D.; Chen, F.; Capanoglu, E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* 2016, 8, 78.

Palmnäs, M.S.; Cowan, T.E.; Bomhof, M.R.; Su, J.; Reimer, R.A.; Vogel, H.J.; Hittel, D.S.; Shearer, J. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS ONE* 2014, 9, e109841.

Parker, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29, 4–8 (1974).

- Petrova, M. I. et al. Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. *Front. Microbiol.* 9, 1278 (2018).
- Przemska- Kosicka, A. et al. Effect of a synbiotic on the response to seasonal influenza vaccination is strongly influenced by degree of immunosenescence. *Immun. Ageing* 13, 6 (2016).
- Qin, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65 (2010).
- Reddy, B.S.; Weisburger, J.H.; Wynder, E.L. Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. *J. Nutr.* 1975, 105, 878–884.
- Reid, G. Disentangling what we know about microbes and mental health. *Front. Endocrinol.* 10, 81 (2019).
- Riccio P. e Rossano R. The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. *FEBS Letters* 594 (2020) 3262–3271
- Rios- Covian, D. et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* 7, 185 (2016).
- Riviere, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P. & De Vuyst, L. Complementary mechanisms for degradation of inulin- type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02893-17 (2018).
- Roager, H.M., Licht, T.R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun*, 2018, 9, 3294.
- S'wia ętecka, D.; Dominika, S'; Narbad, A.; Ridgway, K.P.; Kostyra, H. The study on the impact of glycated pea proteins on human intestinal bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 2011, 145, 267–272.
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J. & Klaenhammer, T. R. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 207–216 (2018).
- Sanders, M. E.; Merenstein, D. J.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019, 16, 605-616.
- Sanna, S. et al. Causal relationships among the gut microbiome, short- chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat. Genet.* 51, 600–605 (2019).

Sanz, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes* 2010, 1, 135–137.

Stefan, N., Fritsche, A., Schick, F. & Haring, H. U. Phenotypes of prediabetes and stratification of cardiometabolic risk. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 4, 789–798 (2016).

Stoddart, L. A., Smith, N. J. & Milligan, G. International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol. Rev.* 60, 405–417 (2008).

Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C.A.; Maza, O.; Israeli, D.; Zmora, N.; Gilad, S.; Weinberger, A.; et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 2014, 514, 181–186.

Sun, M., Wu, W., Chen, L. et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat Commun*, 2018, 9, 3555.

Tagliabue, A.; Ferraris, C.; Uggeri, F.; Trentani, C.; Bertoli, S.; de Giorgis, V.; Veggiotti, P.; Elli, M. Short-term impact of a classical ketogenic diet on gut microbiota in GLUT1 deficiency syndrome: A 3-month prospective observational study. *Clin. Nutr. ESPEN* 2017, 17, 33–37.

Tânia Bragança Ribeiro, Célia Maria Costa, Teresa Bonifacio - Lopes, Sara Silva, Mariana Veiga, Ana Rita Monforte, João Nunes, Antonio A. Vicente, Manuela Pintado. Prebiotic effects of olive pomace powders in the gut: In vitro evaluation of the inhibition of adhesion of pathogens, prebiotic and antioxidant effects. *Food Hydrocolloids* 112 (2021) 106312.

Tanner SA, Chassard C, Zihler Berner A et al. Synergistic effects of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and selected prebiotics on inhibition of *Salmonella* colonization in the swine proximal colon PolyFermS model. *Gut Pathog* 2014;6:44.

Tanner SA, Zihler Berner A, Rigozzi E, Grattepanche F, Chassard C, Lacroix C (2014) In Vitro Continuous Fermentation Model (PolyFermS) of the Swine Proximal Colon for Simultaneous Testing on the Same Gut Microbiota. *PLoS ONE* 9(4): e94123

Taslimi P., Sujayev A., Karaman M., Maharramova G., Sadeghian N., Osmanova S., Sardarova S., Nargiz Majdi N., Ozel H.U., Gulcin I. N-Substituted pyrimidinethione and acetophenone derivatives as a new therapeutic approach in diabetes. *Arch Pharm* , 2020, 353, 9: 2000075.

Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 2017, 474, 1823–1836.

Tsukahara, T.; Iwasaki, Y.; Nakayama, K.; Ushida, K. Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2003, 49, 414–421.

Tzortzis, G., Baillon, M. L., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. *J. Appl. Microbiol.* 96, 552–559 (2004).

Van Baarlen, P., Wells, J. M. & Kleerebezem, M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol.* 34, 208–215 (2013).

Verbeke, K. A. et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 28, 42–66 (2015).

Vitali B., Ndagijimana M., Maccaferri S., Biagi E., Guerzoni M.E., Patrizia Brigidi P. An in vitro evaluation of the effect of probiotics and prebiotics on the metabolic profile of human microbiota. *Anaerobe*, 2012, 18, 4, 386-391.

Vitetta, L., Saltzman, E. T., Thomsen, M., Nikov, T. & Hall, S. Adjuvant probiotics and the intestinal microbiome: enhancing vaccines and immunotherapy outcomes. *Vaccines (Basel)* 5, (E50) (2017).

Vulevic, J. et al. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabolomics in elderly persons. *Br. J. Nutr.* 114, 586–595 (2015).

Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G. & Gibson, G. R. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel transgalactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1438–1446 (2008).

Wang, X.; Gibson, G.R.; Sailer, M.; Theis, S.; Rastall, R.A. Prebiotics inhibit proteolysis by gut bacteria in a host diet-dependent manner: a three-stage continuous in vitro gut model experiment. *Appl Environ Microbiol.* 2020, 86, 02730-19.

Wenly Ruan, Melinda A. Engevik, Jennifer K. Spinler & James Versalovic . Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration *Digestive Diseases and Sciences*, 2020, 65, 695–705.

Wolters, M.; Ahrens, J.; Romání-Pérez, M.; Watkins, C.; Sanz, Y.; Benítez-Páez, A.; Stanton, C.; Günther, K. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health—A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clin. Nutr.* 2018.

- Wu, Q. et al. Fermentation properties of isomaltooligosaccharides are affected by human fecal enterotypes. *Anaerobe* 48, 206–214 (2017).
- Yan, F. et al. A *Lactobacillus rhamnosus* GG- derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 30742–30751 (2013).
- Z. et al. Effects of inulin on the plasma lipid profile of normolipidemic and hyperlipidemic subjects: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Clin. Lipidol* 7, 215–222 (2012).
- Zackular, J.P.; Moore, J.L.; Jordan, A.T.; Juttukonda, L.J.; Noto, M.J.; Nicholson, M.R.; Crews, J.D.; Semler, M.W.; Zhang, Y.; Ware, L.B.; et al. Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to *Clostridium difficile* infection. *Nat. Med.* 2016, 22, 1330–1334.
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P. & Flint, H. J. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543 (2012).
- Zhou S, Wang, Y. Jacoby J J, Jiang Y, Zhang Y, and Yu LL. Effects of Medium- and Long-Chain Triacylglycerols on Lipid Metabolism and Gut Microbiota Composition in C57BL/6J. Mice *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65 (31), 6599-6607.
- Zimmer, J.; Lange, B.; Frick, J.S.; Sauer, H.; Zimmermann, K.; Schwiertz, A.; Rusch, K.; Klosterhalfen, S.; Enck, P. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012, 66, 53–60.

8. Ringraziamenti

Porgo i miei più sinceri ringraziamenti al Professor Andrea Gianotti e al Dottor Lorenzo Nissen, per la gentilezza e la disponibilità con cui mi hanno seguita, rendendo lo sviluppo di questa tesi un'esperienza estremamente positiva e stimolante.

Ringrazio la mia famiglia ed in particolare la mamma, il pilastro della mia vita. Tutto l'amore che ho.

Ringrazio Emmina, sorella abruzzese incontrata a Cesena, per essere semplicemente quello che è: la mia anima gemella.

Ringrazio le mie amiche Beatrice, Carlotta, Cristina, Francesca ed Irene, per essere insostituibili compagne di vita, sempre vicine anche quando siamo lontane.

Ringrazio il mio Angelo, che ha continuato a credere in noi nonostante tutte le difficoltà.