## Parete cellulare di lievito

Micotossine binding&

Immunomodulazione

# In cosa consiste una parete cellulare di lievito (YCW)?

- La parete cellulare di lievito (o frazione parietale di lievito) si ottiene dalla cellula di lievito dopo estrazione del citoplasma come estratto di lievito.
- La parete cellulare rimane come parte insolubile.

## Come si produce una Parete Cellulare di lievito?

- ✓ Deriva da cellule di lievito vivo durante il processo di Produzione dell'estratto di lievito
- ✓ L'estratto di lievito è normalmente il target della produzione
- La parete cellulare è normalmente considerate un derivato
- ✓ È soggetta ad una grande variazione nella composizione in relazione al tipo di processo produttivo e ai diversi ceppi di lievito utilizzati.
- ✓ Le proprietà della parete cellulare sono legate alla loro composizione (mannani e betaglucani)

# Come si produce la parete cellulare (schema produttivo)

Ciclo di Produzione di Safmannan, attualmente l'unica parete cellulare di lievito (YCW) ottenuta con un metodo standardizzato di produzione

Tutto il processo produttivo è controllato (Ph-lac).

composizione variabile. Un

tipico standard per pareti

cellulari commerciali

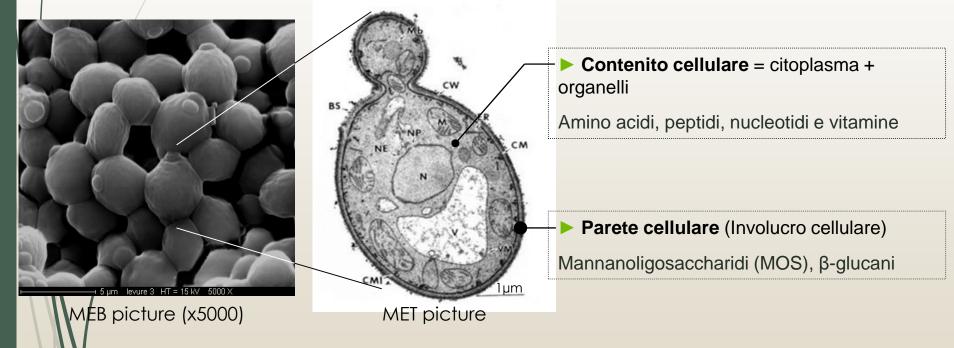


how industriale.

### Parliamo di lievito Saccharomyces cerevisiae?

Saccharomyces cerevisiae è un organismo unicellulare, eucariota.

Costituenti la cellula di Saccharomyces cerevisiae:

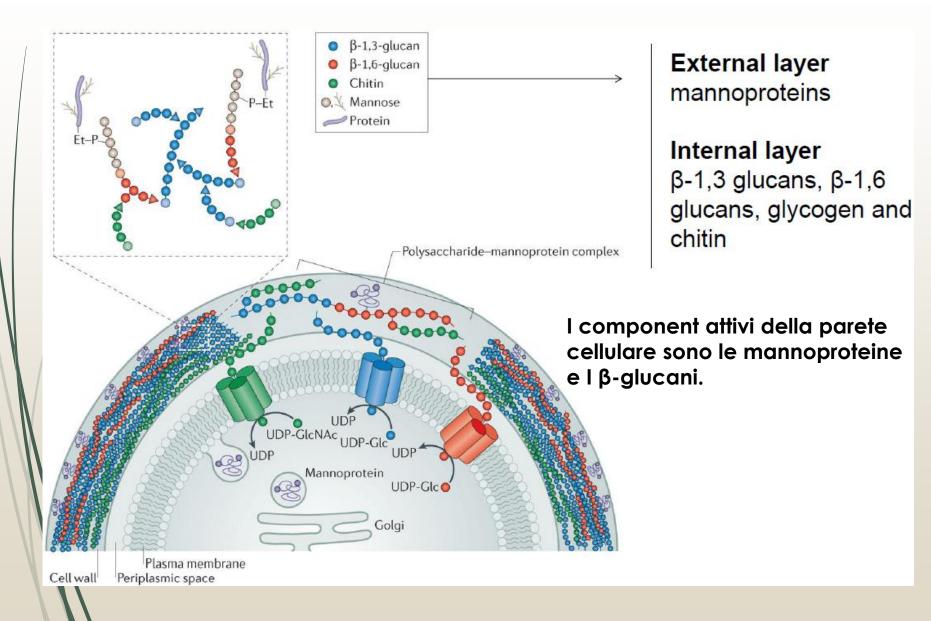


(Lesaffre property)

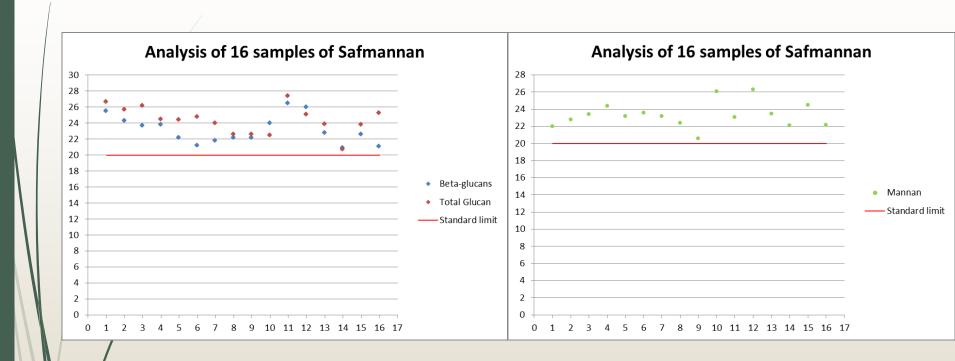


Il lievito Saccharomyces cerevisiae è un organismo complesso e versatile.

## Struttura della parete cellulare



## Analisi di Pareti cellulari (YCW) purificate





L'efficacia di YCW deriva dal bilanciamento del contenuto in beta-glucani e mannani che dovrebbe essere costantemente oltre il 20%.

# La parete cellulare può avere diverse composizioni

La composizione è in relazione al tipo di lievito, al substrato colturale ed alle condizioni di lavorazione.

TABLE 1. Composition of the eight yeast-based products

Product code	Origin	Dry matter (g/100 g)	Proteins (g/100 g)	Lipids (g/100 g)	Mannans (g/100 g)	Glucans (g/100 g)
<b>Y</b> 1	YCWa from brewer's yeast	94.8	31.0	3.3	15.4	20.6
Y2	YCW from brewer's yeast	96.8	30.9	4.19	13.9	42.7
Y3	Inactivated baker's yeast	95.7	58.5	6.39	8.7	13.1
Y4	YCW from baker's yeast	97.1	22.9	17.2	21.3	23.7
Y5	Inactivated baker's yeast	96.7	59.9	4.83	11.6	13.1
Y6	YCW from baker's yeast	95.5	22.3	15.5	25.5	27
Y7	YCW from brewer's yeast	90.6	22.4	7.67	7.5	29.8
Y8	Alcohol yeast	93.1	43.7	2.47	13.7	25.9

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> YCW, yeast cell wall.

(Faucet-Marquis et al, 2013)

(Kapteyn et al, 1999)



La composizione di YCW dipende dal tipo di lievto (lievito di birra o lievito per panificazione), e dal processo industriale.

# Benefici derivanti dall'impiego di YCW nell'alimentazione degli animali

- 1. Legame/sequestro di micotossine
  - YCW ha la capacità di legare alcuni tipi di micotossine
- 2. Binding batteri
  - YCW ha dimostrato la capacità di legare batteri gram negativi
- 3. Immunomodulazione
  - YCW ha di mostrato un significativo effetto di stimolazione dell'immunità innata

## 1. YCW- capacità di legame con micotossine

#### Trials in vivo

- Metodo utilizzato:

Isotherm method

- Obiettivo

Selezionare il miglior binder organico per micotossine, indipendentemente dal livello di micotossine presenti nel mangime: comparazione fra diversi tipi di YCW

**Joannis-Cassan at al., 2011.** Binding of Zearalenon, Aflatoxin B1, and Ochratoxin A by yeast-based products: A method for quantification of adsorption performance. Journal of food protection; 74; 1175-1185.

### Il metodo Isotherm

- ✓ Questo metodo consente di misurare l'efficienza di un prodotto organico nei confronti di 3 specifiche e comuni micotossine (Zea, Ocra, Afla)
- Il metodo consente di stabilire il criterio di legame per ogni ingrediente testato e li classifica in modo relativo all'interno del panel
- Il criterio di valutazione per singola micotossina è la relativa **affinità** (legame con basso livello di micotossine) e la relative **capacità** di legame con elevato livello di micotossine.

#### Il metodo Isotherm

- **Obiettivo:** legare la micotossina prima dell'assorbimento intestinale.
- Dunque la YCW deve legare le micotossine rapidamente, nello stomaco o all'inizio del piccolo intestine, quindi a pH 3 o pH 5:
  - ➤ Zea e Afla sono assorbite per diffusione passive nella parte superior dell'intestino
  - Ocra è assorbita per diffusione passive quando il pH è basso e per trasporto attivo quando il pH è più elevato
  - Ciò spiega il motivo per il quale l'efficienza di legame con le micotossine è stata testata a due diversi valori di pH (3 e 5)

## Screening con metodo Isotherm

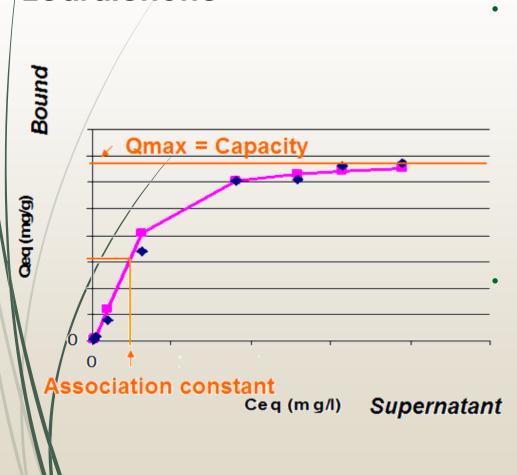
#### Efficienza di YCW per il legame con Zearalenone e Ocratossina A

- 29 diversi tipi di YCW sono stati testato per il legame con 2 micotossine: Ocratossina & Zearalenone.
- Cøncentrazione delle micotossine testate:
  - Zearalenone: da 1 a 50 µg/mL
  - Ocratossina: da 0.05 a 7 μg/mL

YCW ha limitata capacità di legame per Aflatossina

#### Il metodo Isotherm

Esempio di una curva: modello di Hill utilizzato per Zearalenone



## Capacità (Qmax): <u>Quantità massima</u> <u>assorbita/quantità di binder</u>

- ⇒ Evidenzia la massima capacità del binder di legare le micotossine con <u>alto livello di</u> <u>micotossine presenti</u>
- ⇒ Valore più elevate di Qmax, esprimono miglior valore del binder

#### Affinità (Costante Associazione): Capacità della micotossina ad essere legata da un adsorbente

- ⇒ Evidenzia l'affinità del legante per la micotossina al <u>livello più</u> <u>basso</u> di micotossina presente
- ⇒ Il valore più basso dell'affinità esprime il miglior valore del binder

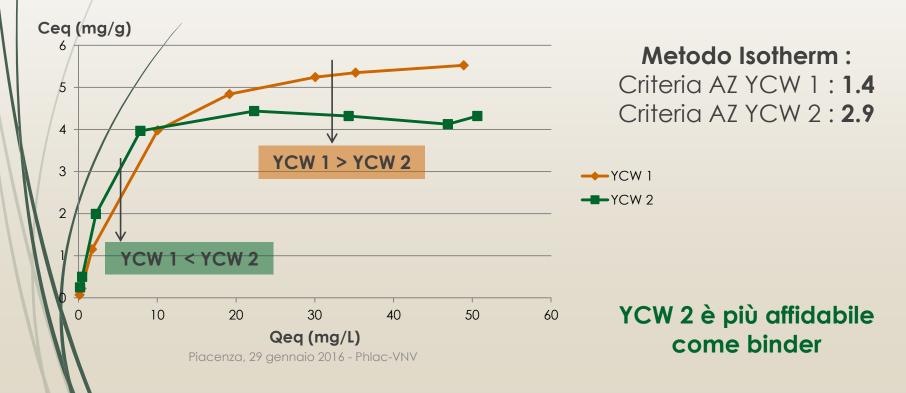
#### Il metodo Isotherm

15

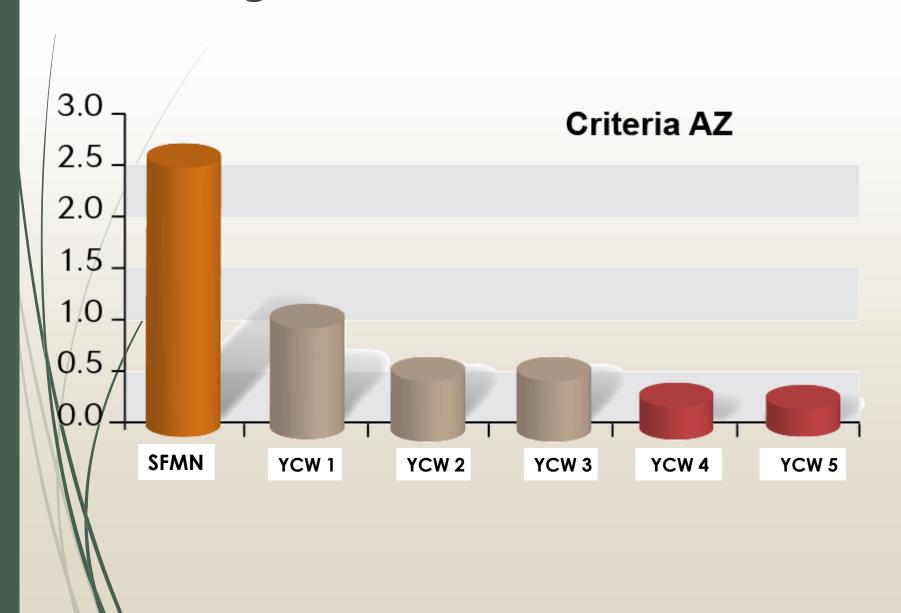
#### Perchè il metodo Isotherm è più affidabile?

Il metodo Isotherm considera la capacità del binder di legare micotossine indipendentemente dal livello di presenza nel mangime

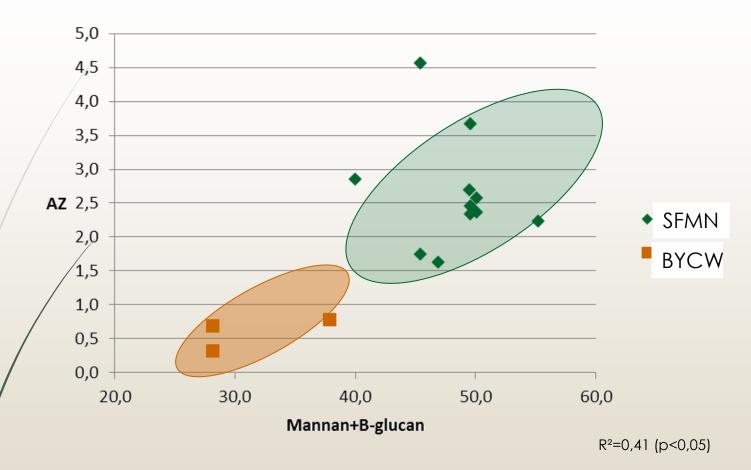
Comparazione fra il metodo a dose singola e il metodo Isotherm



## Legame con Zearalenone



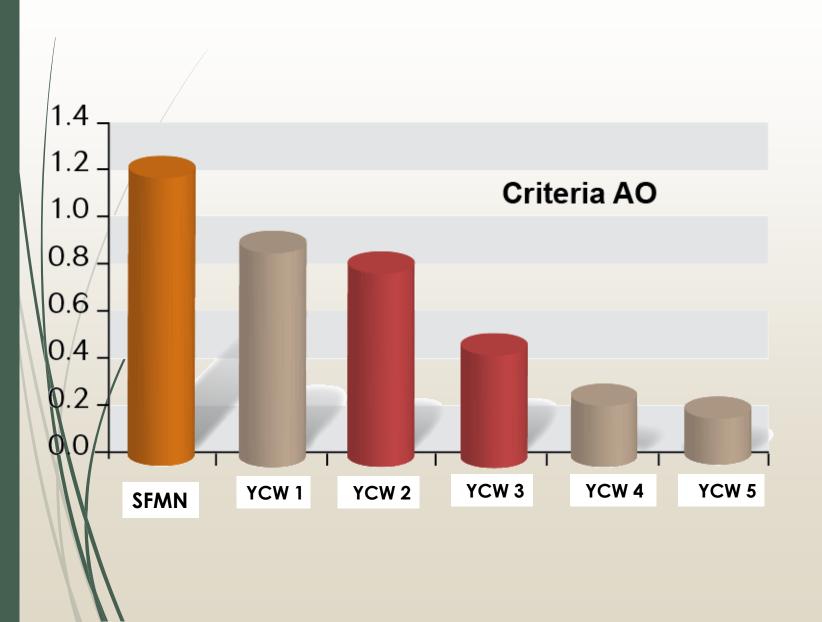
### Assorbimento di Zearalenone



Mannani+β-Glucani: è **uno dei** parametri che spiega l'efficienza di YCW nel legare

Analoghi risultati in bibliografia: Zearalenone binding more efficient when MOS+β-glucan content higher than 50 % (Fruhauf et al., 2012)

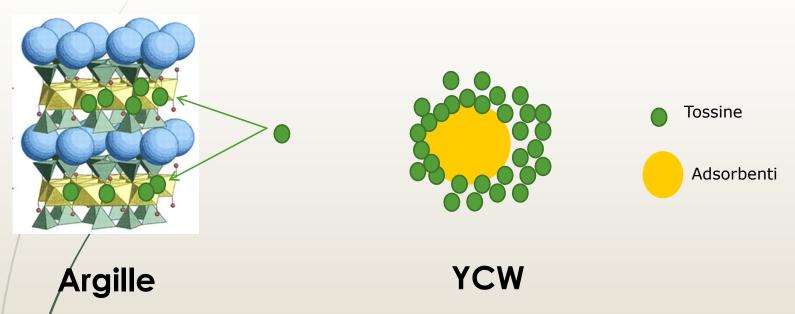
### **Assorbimento Ocratossina**



## Conclusioni – Binding Micotossine

- Una YCW standardizzata seguendone l'intero ciclo produttivo è in grado di legare Zearalenone circa 2 o 3 volte rispetto alle normali YCW non standardizzate
- Una YCW standardizzata seguendone l'intero ciclo produttivo è in grado di legare valori di Ocratossina doppi rispetto alle normali YCW non standardizzate
- La réale possibilità di limitare l'assorbimento di micotossine (ZEA/Ocra)si concretizza quindi a valle di un lungo processo di controllo e standardizzazione della materia prima (YCW)che trae origine dalla possibilità di modulazione di ogni singola fase produttiva.

# YCW: Meccanismo d'azione legame con ZEA



Attrazione delle tossine sulla superfice, tipo "magnete"

Bloccaggio delle tossine fra gli strati

Grazie alla specificità per alcune micotossine, **YCW** può essere complemento ad altri toxin binders

# Riduzione di Zearalenone e metaboliti di ZEA, in vacche da latte

Trial in vivo – somministrazione alle vacche di ZEA 1000 mg/kg

Trattamento	No. Vacche	ZEA mg/kg	g/capo/giorno SFMN
Controllo	6	0	0
Controllo +	6	1000	0
Zea 10	6	1000	10
Zea 20	6	1000	20

Controllo: gruppo controllo negative, senza intossicazione da ZEA

Controllo+: gruppo controllo positive con somministrazione di ZEA comer per I gruppi trattati

**ZEA 10:** integrazione con YCW SFMN a 10 g/h/d **ZEA 20:** integrazione con YCW SFMN a 20 g/h/d

## YCW: detossificazione di Zearalenone nei Ruminanti...

Trattamento	Zearalenone Log	a-zeranol Log	B-zeranol Log
Controllo -	.76°	.62ª	.39ª
Controllo +	1.35b	1.35c	1.11c
Zea 10	.97ª	1.02b	.83b
Zea 20	1.09ab	1.02b	.89bc

YCW standardizzata (SFMN) a 10g/c/g è la dose efficiente massima con differenze non significative rispetto al controllo negative. Aumentando ulteriormente il dosaggio, non si registra ulteriore migliormento dell'effetto

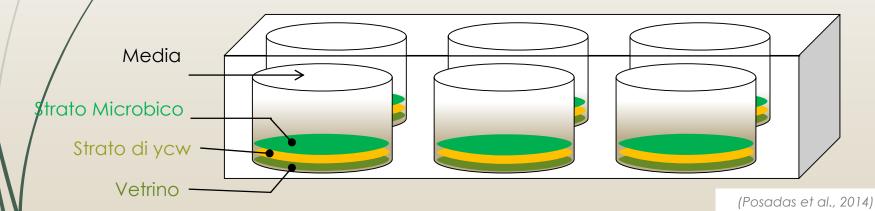
## 2. YCW – Bacteria Binding

YCW ha dimostrato una forte capacità di legame con l batteri gram negativi.

# YCW standardizzata (SFMN) e capacità di legame con batteri patogeni

- La Mississippi State University ha sviluppato una metodologia per valutare l'adesione di batteri (gram+ o gram-) ai componenti della parete cellulare di lievito.
- Metodologia:
- 1- Un vetrino è posto in ogni pozetto.
- 2- YCW è aggiunta ad ogni pozzetto.
- 3- Ingubazione.
- 4/Lavaggio 3 volte.

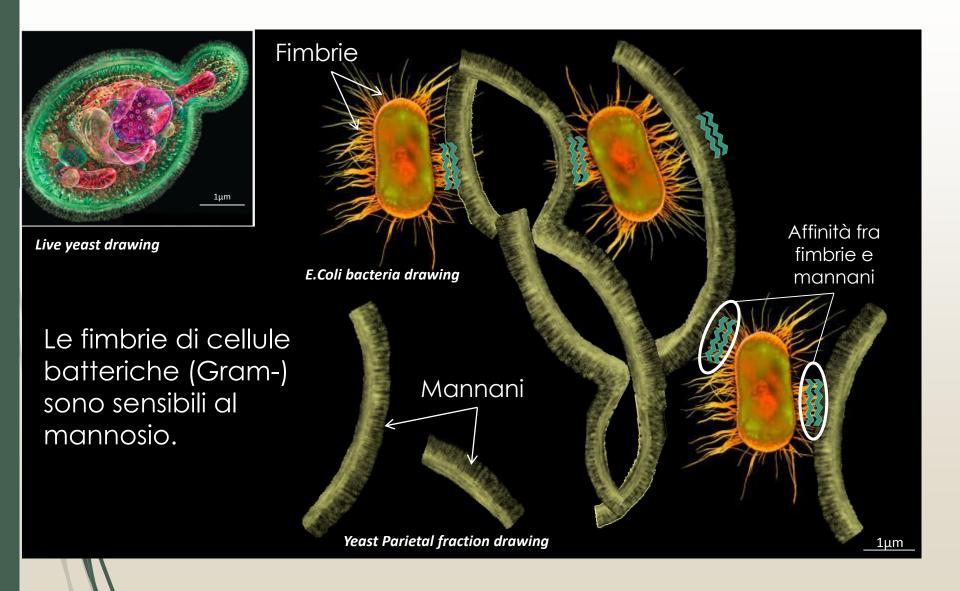
- 5- Batteri aggiunti ad ogni pozzetto.
- 6- Incubazione.
- 7- Lavaggio minimo 3 volte.
- 8- Campioni analizzati.





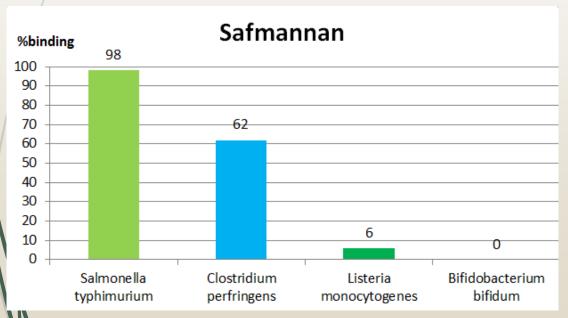
Una nuova metodologia in vitro per la valutazione della capacità di legame di YCW standardizzate (SFMN).

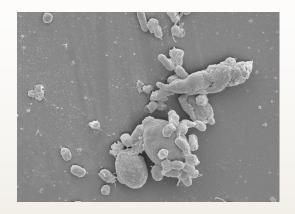
## YCW (SFMN) e Binding di E. coli



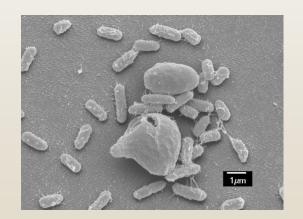
## Capacità di legame con i patogeni

 YCW standardizzata è testata con batteri Gram -(Salmonella typhimurium) e batteri Gram + (Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Bifidobacterium bifidum).





YCW (SFMN) legame con E. Coli

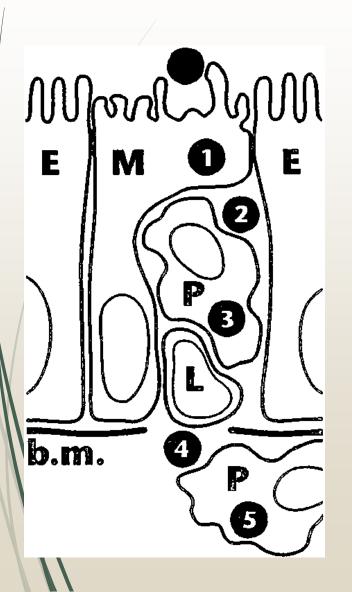


YCW (SFMN) lega cmeon Salmonella

## 3. YCW – modulazione del Sistema Immunitario

YCW, grazie alla composizione ed alla struttura ha forti proprietà immunomodulatorie

#### Come YCW Modula il Sistema Immunitario



Le cellule M trasportano il lievito e le frazioni di lievito dal lume intestinale alle cellule immunitarie (cellule dendritiche, macrofagi e T cells) attraverso la barriera epiteliale.

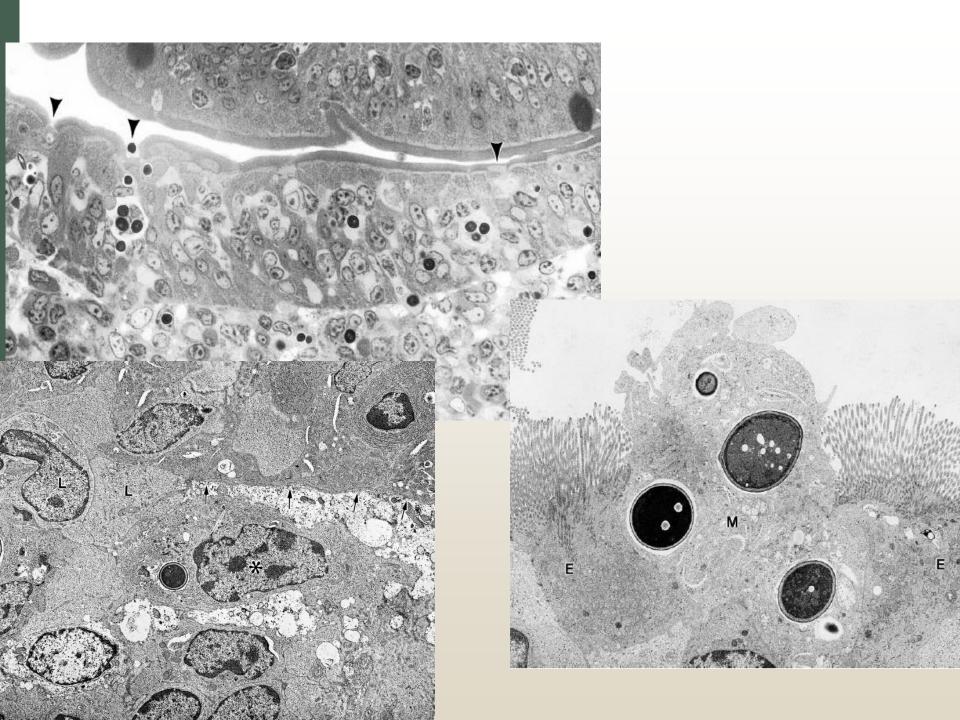
**E** - enterociti;

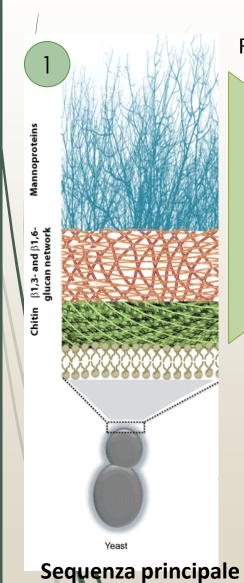
M - Mcell;

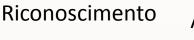
P - fagociti;

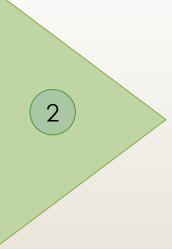
L - linfociti;

**b.m.** – membrana basale.

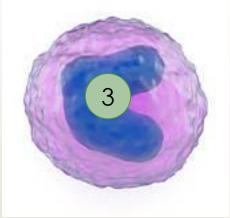








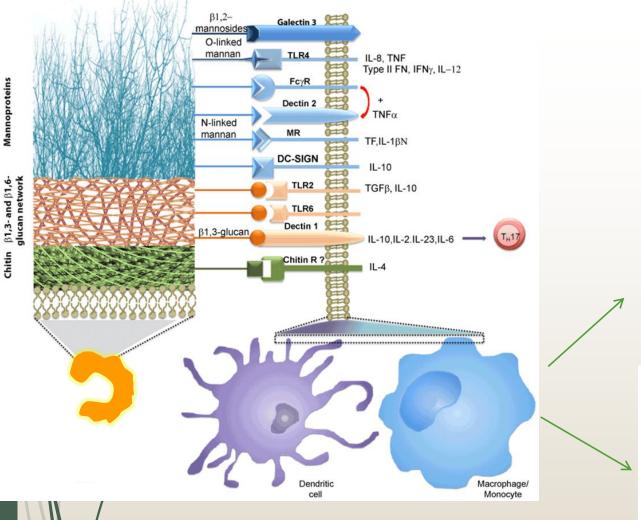
## Attivazione della cellula immunitaria



## Produzione di mediatori immunitari

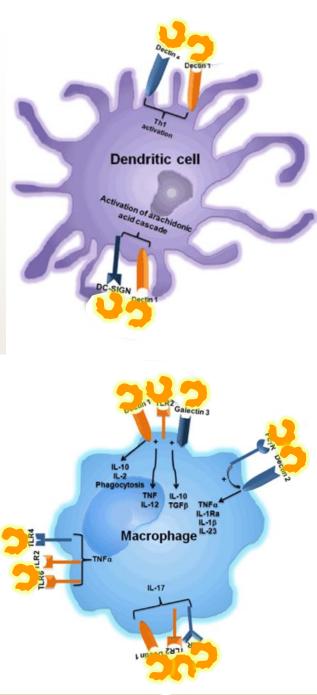
Citochine
Radicali liberi
Lipidi
Etc.

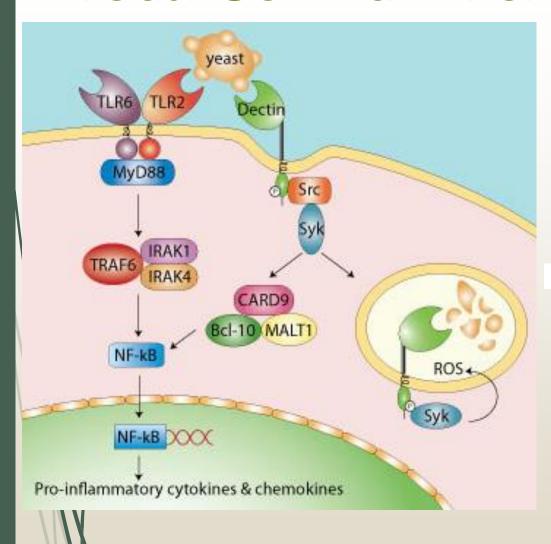
- 1. YCW è composta da varie molecole
- 2. Le strutture delle YCW sono riconosciute dai recettori immunitari speciifci
- 3. La combinazione ligando/recettore innesca una risposta immunitaria
- 4. Induzione della funzione immunitaria



La reticolazione di differenti recettori conduce a differenti risposte, Th1 o Th2

(Adapted from Luis Perez-Garcia et al., 2012)





Toll like receptor pathway

Dectin receptor pathway

NATURE | VOL 413 | 6 SEPTEMBER 2001 | www.nature.com

Immune recognition

## A new receptor for β-glucans

Gordon D. Brown, Siamon Gordon

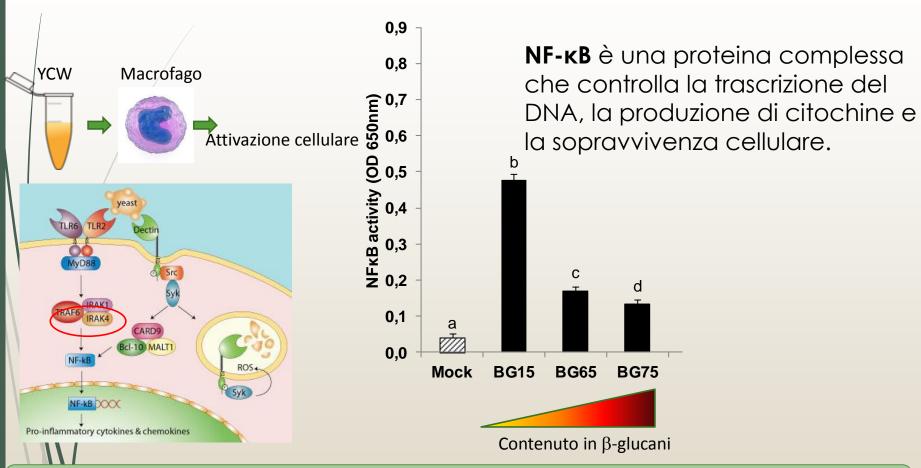
Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RE, UK e-mail: gbrown@molbiol.ox.ac.uk

NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 8 NUMBER 1 JANUARY 2007

Dectin-1 is required for β-glucan recognition and control of fungal infection

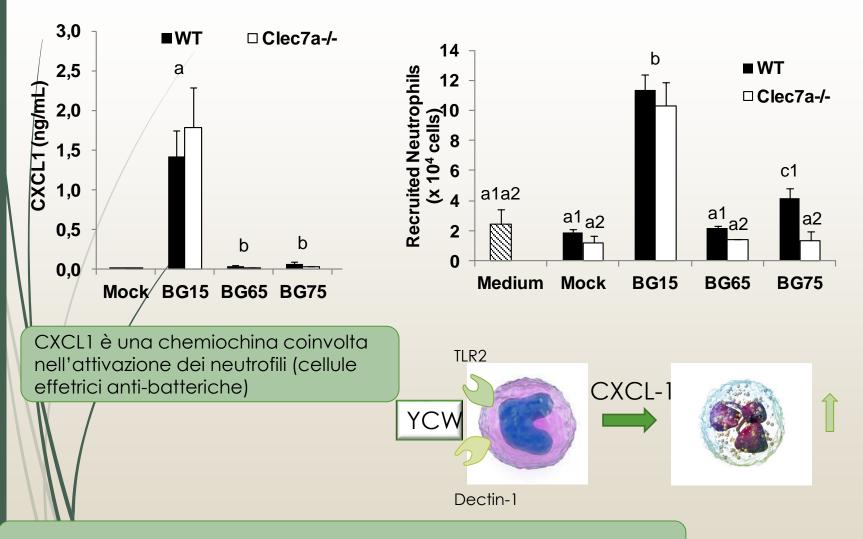
#### Dectin-1:

- riconosce i β-glucani
- promuove la fagocitosi
- induce la produzione di radicali liberi e citochine



- •La parete cellulare di lievito è un potente attivatore di NF-kB
- L'arricchimento in β-glucani è negativamente correlato con l'attivazione di NF-kB

NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)



•YCW innesca l'attivazione dei neutrofili

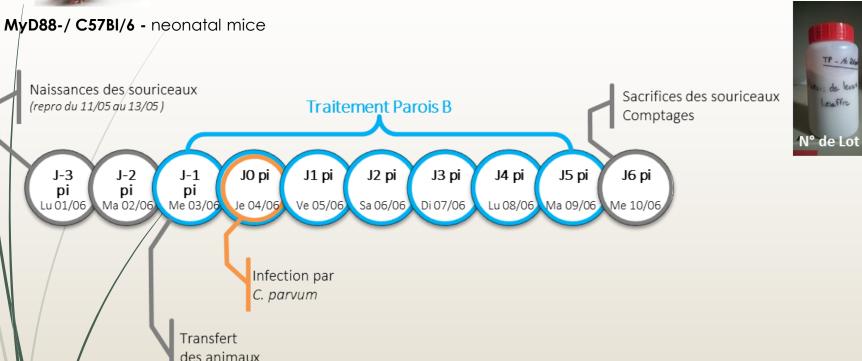
#### Conclusioni preliminari

- 1. YCW è un potente induttore di risposta infiammatoria attraverso la sinergia TLR2/dectin-1
- 2. YCW, l'effetto è immediato
- 3. YCW può essere utile per lo sviluppo e il recupero della risposta immunitaria innata in soggetti che si trovano in un periodo di immuno depressione (età giovanile, parto, malattie immunodepressive etc.)

#### Effetto protettivo di YCW su topi neonati infettati con C. parvum

36



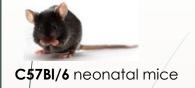


Protective effect of YCW-B on MyD88-/ and C57BI/6 - neonatal mice infected by C. parvum. Three day-old neonatal mice were orally inoculated with 5.10E5 oocysts of C. parvum. They daily received 500µg of B wall preparation from day -1 pi to 5 dpi to by oral route. They were killed at day 6pi for counting the number of parasite in the intestinal content of neonatal mice. Each point represents one neonate, colors indicate animals from the same litter and the black bar represents the median.

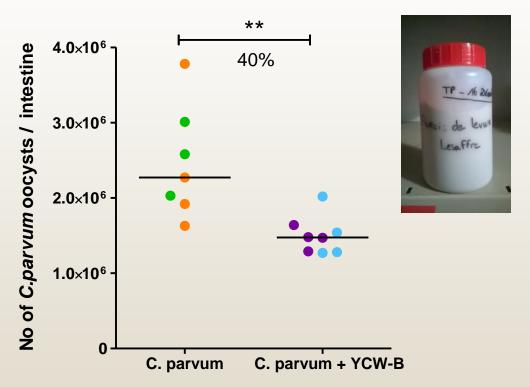
Piacenza, 29 gennaio 2016 - Phlac-VNV

en secteur 2

### In Vivo Test with Mice



Evaluation of the new YCW preparation (protection of neonatal mice against *C. pavum* infection)



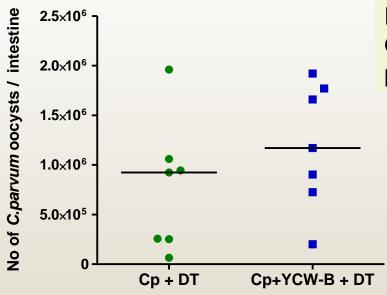
2 groups of mice from a same genetic line – genetically identical Group 1 no supplement; group 2 supplemented with purified YCW with high level of mannans and beta glucans. C. Parvum challenge.

### In Vivo Test with Mice





Evaluation of YCW-B protective effect when CD11c+ cells are depleted

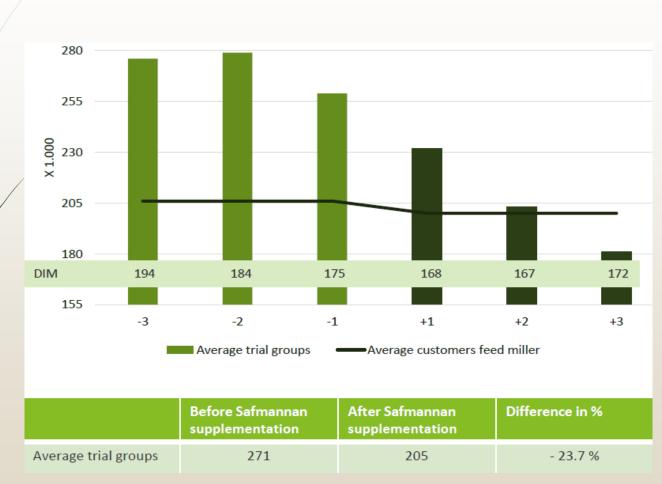


Requirement of CD11c+ cells for protection by YCW-B

Protective effect of YCW-B on CD11c-DTR neonatal mice infected by C. parvum. Three day-old neonatal mice were orally inoculated with 5.10E5 oocysts of C. parvum. They daily received 500µg of B wall preparation from day -1 pi to 5 dpi to by oral route. DT was administered at 4dpi. Neonates were killed at day 6pi for counting the number of parasite in the intestinal content of neonatal mice. Each point represents one neonate, colors indicate the cage and the black bar represents median.

CD11c+ cells seems to be essential for the protection induced by YCW-B

## Effetto di YCW standardizzata(SFMN) sulla conta di cellule somatiche (SCC) in vacche da latte



Prova di campo condotta in Olanda in 8 allevamenti utilizzatori di LY; l'inclusione anche di YCW standardizzata (SFMN) ha consentito la riduzione di SCC del 24%.

## YCW (SFMN) test in pecore

- Blocchi (melasso/minerali) contenenti ycw standardizzata (SFM) in comparazione con blocchi senza integrazione
- Selezione di 200 pecore con parto nel mese di maggio
- Trattamento e controllo: messa a disposizione dei blocchi 4 settimane prima del parto
- Dopo il parto, comparazione del livello di IgG fra I due gruppi

### Risultati

- Peso vivo iniziale per entrambi I gruppi era di 72 kg
- Effetti scarsamente visibili sulle pecore trattate per quanto riguarda performance o condizione corporea
- Aumento significativo (~25%) del contenuto di IgG nel colostro del gruppo trattato con YCW (p<0.05)</li>

	IgG Rep 1	IgG Rep2	Mean
Treated	236.5	220.5	228.5
Control	176.6	189.2	182.9
			(p<0.05)



## Grazie per la vostra attenzione!

