

## EVIDENZA DELLA CAPACITÀ DI CEPPI *LACTOBACILLUS PLANTARUM* E *LACTOBACILLUS PARACASEI* DI ORIGINE CASEARIA DI RIDURRE IL COLESTEROLO

Simona BELVISO<sup>1\*</sup>, Manuela GIORDANO<sup>1</sup>, Giuseppe ZEPPA<sup>1</sup>

### INTRODUZIONE

I prodotti lattiero-caseari hanno un ruolo di primaria importanza nella dieta dell'uomo per l'elevato valore nutrizionale che li contraddistingue, ma risultano altresì ricchi di lipidi, come il colesterolo, ritenuto da più parti una delle cause dell'insorgenza di numerose patologie cardiovascolari [1-3]. Negli ultimi anni sono state quindi effettuate numerose ricerche volte a ridurre il contenuto negli alimenti [4-6], anche in relazione alla richiesta, da parte del consumatore, di cibi sempre più salutari.

Alcuni autori avevano osservato che il consumo di prodotti fermentati con batteri lattici evidenziava effetti benefici sulla salute dell'uomo ed in particolare un effetto ipocolesterolizzante [7-10]; in seguito numerose ricerche hanno quindi indagato la capacità di tali microrganismi, ed in particolare di batteri con caratteristiche probiotiche già definite, di ridurre il contenuto in colesterolo, per lo più mediante sperimentazioni *in vitro*, su terreni di coltura contenenti sali biliari e condizioni di crescita anaerobiche per simulare l'ambiente intestinale [7, 11-16].

Poiché le sperimentazioni *in vivo* e con microrganismi di origine alimentare sono ancora scarse in letteratura, in questo lavoro sono stati esaminati 13 ceppi di batteri lattici isolati da Castelmagno DOP, al fine di definirne l'attività decolesterolizzante in terreno sintetico ed in latte.

### MATERIALI E METODI

Sono stati scelti 8 ceppi di *Lactobacillus plantarum* e 5 di *Lactobacillus paracasei*, appartenenti alla collezione DiVaPRA, isolati da Castelmagno DOP e geneticamente identificati [17]. È stato inoltre utilizzato un preparato commerciale contenente *Lactobacillus acidophilus* (Lb-5) come controllo positivo in quanto la sua attività decolesterolizzante è già stata evidenziata da numerosi autori [7, 11, 13, 14].

I ceppi sono stati studiati in due mezzi di coltura, MRS e latte intero UHT, contenenti rispettivamente 100 mg/L e 120 mg/L di colesterolo. L'aggiunta di

\* *Corrispondenza ed estratti:* simona.belviso@unito.it

<sup>1</sup> Microbiologia Agraria e Tecnologie Alimentari - Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali. Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

colesterolo al terreno liquido MRS è stata effettuata utilizzando una soluzione di colesterolo a 1000 mg/L, preparata giornalmente in condizioni sterili, in una miscela costituita da Tween 80 al 12% e da etanolo al 26,4%.

I ceppi sono stati inoculati, in triplicato, nei due terreni colturali al 2% (v/v) a partire da una sospensione madre avente una concentrazione di  $1 \times 10^9$  cell/mL ed incubati a 37°C.

Dopo il periodo d'incubazione le cellule sono state separate per centrifugazione, a 4200 x g per 10 minuti in MRS e a 2700 x g per 1 minuto in latte.

400 µL di surnatante sono stati quindi saponificati con 5 mL di una soluzione metanolica di KOH al 2,8% (p/v) alla temperatura di 65°C. Il colesterolo è stato estratto usando una miscela di esano/acqua deionizzata in rapporto volumetrico di 5:1 [18]. Il contenuto di colesterolo è stato determinato mediante analisi enzimatica (R-Biopharm, Milano).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1 sono riportati i valori percentuali medi di rimozione del colesterolo per i lattobacilli esaminati. Due ceppi di *L. plantarum* e tre di *L. paracasei* hanno evidenziato la capacità di ridurre il contenuto di colesterolo in MRS dopo 24 ore di crescita. La percentuale di riduzione è risultata compresa in media tra il 6,5 e il 20,5%. I ceppi di *L. plantarum* sono risultati più attivi dei ceppi *L. paracasei* nella rimozione del colesterolo ed Lb-5, utilizzato come controllo positivo, ha confermato la sua abilità di ridurre il contenuto di colesterolo, ma in percentuale minore rispetto ai ceppi *L. plantarum*.

L'attività di riduzione del colesterolo è stata ulteriormente studiata per i due ceppi più attivi, *L. plantarum* A106 e A110, dopo 8 e 24 ore di incubazione a 37°C in MRS. I ceppi *L. plantarum* hanno dimostrato di rimuovere attivamente il colesterolo dal mezzo di crescita già durante la fase di crescita logaritmica (Fig. 1). Questa capacità sembra aumentare nel tempo per il ceppo A110, mentre rimane costante tra le 8 e le 24 ore per A106.

I ceppi di *L. plantarum* che avevano fornito i migliori risultati nel test su terreno sintetico MRS sono stati infine valutati per l'attività decolesterolizzante anche in latte intero UHT. L'acidificazione del latte e la conseguente coagulazione dovuta all'attività fermentativa dei batteri è stata evitata mantenendo il pH intorno a un valore di circa 5,8 mediante l'aggiunta in automatico di NaOH 0,1 N.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i due ceppi in studio hanno mantenuto l'attività di riduzione del colesterolo anche nel latte con una percentuale media di rimozione compresa tra il 5,0 e l'8,2% dopo 24 ore di crescita a 37°C (Tab. 2). I due ceppi non hanno invece evidenziato attività decolesterolizzante in latte dopo 8 ore di incubazione.

#### CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata messa in evidenza per la prima volta la capacità di

Tabella 1 – Valori medi di rimozione del colesterolo (%) e relative deviazioni standard, in MRS dopo 24 ore a 37° C , per i batteri lattici isolati da formaggio Castelmagno DOP e per *L. acidophilus* (Lb-5), usato come controllo positivo, e valori medi di pH del substrato a fine incubazione. I valori contraddistinti da lettere diverse differiscono per  $P < 0,05$ ; NR: nessuna azione decolesterolizzante.

*Table 1 – Cholesterol reduction (%) and relative standard deviation, for each examined lactobacillus strain isolated from Castelmagno PDO cheese and for L. acidophilus (Lb-5), in MRS broth after 24 h of incubation at 37°C. Mean values with different letters differ for  $P < 0.05$ . NR; no cholesterol removal observed.*

	Rimozione del colesterolo (%)	pH
	<i>Cholesterol reduction (%)</i>	
Lb-5	14,5±3,4b	3.99
<i>L. plantarum</i> A101	NR	3.89
<i>L. plantarum</i> A102	NR	3.93
<i>L. plantarum</i> A103	NR	3.91
<i>L. plantarum</i> A104	NR	4.01
<i>L. plantarum</i> A106	18.4±0,9a	3.90
<i>L. plantarum</i> A110	20.5±1.9a	3.84
<i>L. plantarum</i> A1010	NR	3.90
<i>L. plantarum</i> B102	NR	3.90
<i>L. paracasei</i> 24	8.6±2.5c	3.84
<i>L. paracasei</i> 37	7.9±1.9c	3.89
<i>L. paracasei</i> 38	6.5±4.8c	3.86
<i>L. paracasei</i> 39	NR	3.93
<i>L. paracasei</i> 50	NR	3.84

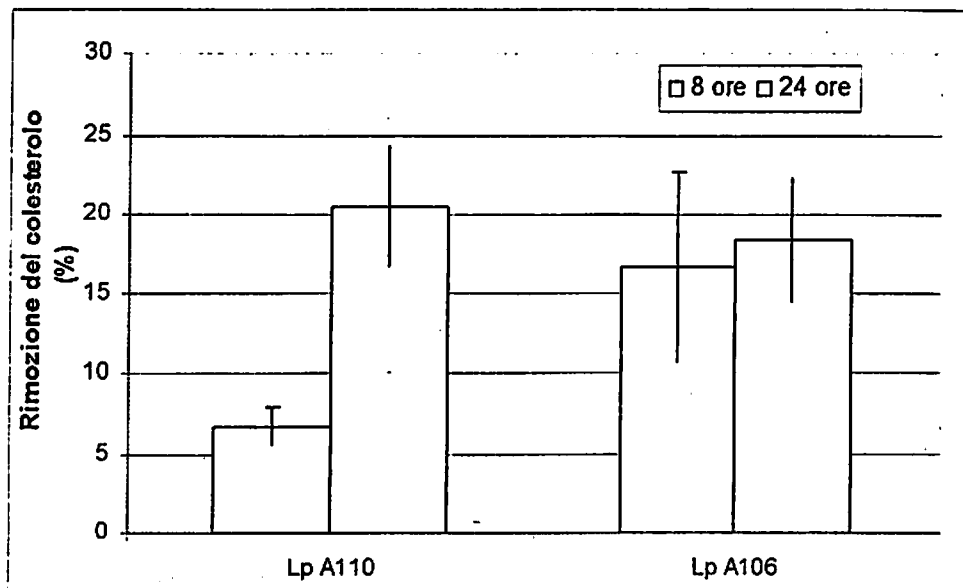


Figura 1 – Attività decolesterolizzante di *L. plantarum* A110 (Lp A110) e *L. plantarum* A106 (Lp A106) in MRS dopo 8 e 24 ore a 37°C.

Figure 1 – Comparison between cholesterol-lowering activity of *L. plantarum* A110 (Lp A110) and *L. plantarum* A106 (Lp A106) in MRS after 8 and 24 h at 37°C.

Tabella 2 – Valori medi di rimozione del colesterolo (%) e relative deviazioni standard in latte UHT dopo 24 ore di incubazione a 37°C, per i ceppi *L. plantarum* isolati da formaggio Castelmagno DOP e di *L. acidophilus* (Lb-5), usato come controllo positivo.

Table 2 – Cholesterol reduction (%) and relative standard deviation for each examined lactobacillus strain isolated from Castelmagno PDO cheese and for *L. acidophilus* (Lb-5), in milk after 24 h of incubation at 37°C.

	Rimozione del colesterolo (%)
	Cholesterol reduction (%)
Lb-5	9.4±1.8
<i>L. plantarum</i> A106	8.2±2.2
<i>L. plantarum</i> A110	5.0±3.5
Significatività	ns

ceppi di *L. plantarum* e *L. paracasei* di origine casearia, di ridurre il colesterolo in mezzo sintetico MRS. In particolare i ceppi di *L. plantarum* hanno dimostrato di mantenere questa capacità anche in latte.

L'utilizzo di questi ceppi per la produzione di latte a basso contenuto di colesterolo non sembra però possibile ad oggi a causa del tempo necessario ai ceppi per esercitare l'azione decolesterolizzante che porta inevitabilmente alla formazione del coagulo per effetto dell'acidificazione.

Sono quindi in corso ulteriori esperimenti per definire il meccanismo di rimozione del colesterolo e le altre caratteristiche funzionali di questi ceppi ai fini di un loro possibile utilizzo come probiotici nella produzione di yogurt e formaggi.

**RIASSUNTO** – Numerose patologie cardiovascolari sono provocate da un eccessivo contenuto di colesterolo negli alimenti. Negli ultimi venti anni sono stati quindi compiuti molti test *in vitro* per evidenziare la capacità di batteri lattici, per lo più isolati dall'intestino dell'uomo e con caratteristiche probiotiche definite, di ridurre il colesterolo. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di indagare la capacità di ridurre il colesterolo di alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* isolati da formaggio. I risultati hanno evidenziato che due ceppi di *L. plantarum* e tre di *L. paracasei* possiedono una capacità media di riduzione del colesterolo in mezzo sintetico del 19,4% e 7,7% rispettivamente. I ceppi più attivi su brodo colturale sintetico sono stati testati anche in latte, presentando una percentuale media di riduzione del colesterolo variabile dal 5,0 all'8,2%. I risultati hanno evidenziato che anche ceppi di origine casearia sono quindi in grado di ridurre il contenuto di colesterolo in mezzo sintetico e in latte. Sono attualmente in corso ulteriori studi per definirne il meccanismo di rimozione e valutare le caratteristiche probiotiche dei ceppi in esame, al fine di poterli utilizzare nella produzione di nuovi alimenti funzionali.

*Parole chiave:* *L. plantarum*, *L. paracasei*, colesterolo, latte

**SUMMARY** – *In vitro cholesterol-lowering action of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus paracasei isolated from cheese.* – Several heart diseases can be caused by an excessive consumption of food rich in lipids, especially saturated fatty acids and cholesterol. Over the past 20 years many *in vitro* assays were performed to reduce food cholesterol content, by using lactic acid bacteria mainly isolated from intestine and with already assessed probiotic characteristics. The aim of this work was to investigate the cholesterol-lowering action of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from Castelmagno PDO cheese. Among all tested strains, two *L. plantarum* and three *L. paracasei* strains gave rise to a significant reduction of the cholesterol level in MRS broth; in particular *L. plantarum* strains lowered the cholesterol content by an average of 19.4%, while *L. paracasei* strains by an average of 7.7%. The two *L. plantarum* strains possessing relatively high cholesterol-lowering activity in MRS broth were also tested in

UHT whole homogenized milk following the same procedure. Results showed that *L. plantarum* strains maintained this activity also in milk; in fact after 24 hours the decrease of the cholesterol ranged from about 5.0% to 8.2% without significant variations between the two strains. Work is in progress to understand the mechanism of cholesterol removal and to find other strain functional properties in order to use them for the production of probiotic food.

**Keywords:** *L. plantarum*, *L. paracasei*, cholesterol, milk

**Ringraziamenti:** Poster presentato al I Congresso Lattiero-Caseario AITeL. Bologna, 12 giugno 2008 "Acquisizioni scientifiche e valorizzazione del latte e dei derivati: aspetti genetici, ambientali e tecnologici".

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Grundy SM, Brheimer D, Blackburn H, Brown WV, Kwiterovich PO, Mattson F, Schonfeld G, Weidman WH (1982). *Rational of the diet-heart statement of the American heart association report of the nutrition committee*. Circulation, 65, 839A-854A.
- 2) Gurr M (1992). *Dietary lipids and coronary disease: old evidence, new perspective and progress*. Lipid Res., 31, 195-243.
- 3) Pyorala K (1987). *Dietary cholesterol in relation to plasma cholesterol and coronary heart disease*. Am. J. Clin. Nutr., 45, 1176-1184.
- 4) Han EM, Kim SH, Ahn J, Kwak HS (2007). *Optimizing cholesterol removal from cream using b-cyclodextrin cross-linked with adipic acid*. Int. J. Dairy Technol., 60, 31-36.
- 5) Larsen JE, Froning GW (1981). *Extraction and processing of various components from eggs yolk*. Poultry Sci., 60, 160-167.
- 6) Micich TJ (1990). *Behaviours of polymer supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil*. J. Agri. Food Chem., 38, 1839-1843.
- 7) Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C (1985). *Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 49, 377-381.
- 8) Hepner G, Fried SSJ, Fusetti L, Morin R (1979). *Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk*. Am. J. Clin. Nutr., 32, 19-24.
- 9) Mann GV, Sperry A (1974). *Studies of a surfactant and cholesteremia in the Masaai*. Am. J. Clin. Nutr., 27, 464-469.
- 10) Thakur CP, Jha AN (1981). *Influence of milk, yogurt and calcium on cholesterol induced atherosclerosis in rabbits*. Atherosclerosis, 89, 211-215.
- 11) Klaver FAM, Meer Van Der R (1993). *The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity*. Appl. Environ. Microbiol., 59, 1120-1124.
- 12) Lim HJ, Kim SY, Lee WK (2004). *Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use*. J. Vet. Sci., 5, 391-395.

- 13) Lin MY, Chen TW (2000). *Reduction of cholesterol by Lactobacillus acidophilus in culture broth*. J. Food Drug Anal., 8, 97-102.
- 14) Liong MT, Shah NP (2005). *Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains*. J. Dairy Sci., 88, 55-66.
- 15) Aloglu H, Öner Z (2006). *Assimilation of cholesterol in broth, cream and butter by probiotic bacteria*. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 108, 709-713.
- 16) Fletouris DJ, Botsoglou NA, Psomas IE, Mantis AI (1998). *Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography*. J. Dairy Sci., 81, 2833-2840.
- 17) Dolci P, Alessandria V, Rantsiou K, Rolle L, Zeppa G, Coccolin L (2008). *Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology*. Int. J. Food Microbiol., 122, 302-311.
- 18) Fletouris DJ, Botsoglou NA, Psomas IE, Mantis AI (1998). *Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography*. J. Dairy Sci., 81, 2833-2840.