

## PRODUZIONE DI ACIDI LINOLEICI CONIUGATI (CLA) DA BATTERI LATTICI ISOLATI DA FORMAGGI TIPICI PIEMONTESI

Barbara DAL BELLO<sup>1\*</sup>, Manuela GIORDANO<sup>1</sup>,  
Paola DOLCI<sup>1</sup>, Giuseppe ZEPPA<sup>1</sup>

### INTRODUZIONE

L'acido linoleico coniugato (CLA) è una miscela di isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico (C18:2) nel quale i doppi legami sono coniugati. Studi effettuati su animali hanno dimostrato che il consumo di CLA ed in particolare degli isomeri *cis-9, trans-11* (*c9t11-18:2*) e *trans-10, cis-12* (*t10c12-18:2*) inibisce l'iniziazione di carcinogenesi e tumorigenesi, riduce il grasso corporeo incrementando la massa muscolare, diminuisce l'incidenza di aterosclerosi e interviene nella regolazione dell'iperinsulinemia e rafforza il sistema immunitario [1]. I CLA sono prodotti attraverso l'isomerizzazione dell'acido linoleico o acido vaccenico nel metabolismo ruminale [2], ma diversi studi hanno evidenziato che essi possono anche essere sintetizzati dai microrganismi nel latte o in differenti substrati colturali.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di selezionare ceppi di batteri lattici capaci di sintetizzare CLA per poi essere utilizzati come starters o colture addizionabili nella produzione di yogurt e formaggi.

### MATERIALI E METODI

a) *Ceppi batterici e condizioni di crescita* - Cinquanta ceppi tra cui *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis* sono stati isolati da formaggi tradizionali piemontesi e identificati geneticamente come riportato da Fortina *et al.* [3].

I ceppi sono stati attivati in mezzo colturale di crescita MRS brodo per 12h a 37°C per poi essere nuovamente inoculati alla concentrazione di 10<sup>6</sup> UFC/mL in 10 mL di MRS brodo addizionato di 300 ppm di acido linoleico puro. L'acido linoleico è stato aggiunto in soluzione acquosa all'1% di Tween 80 per migliorarne la solubilità. Le colture sono state incubate per 24h a 37°C.

Successivamente è stata allestita una prova su latte crudo addizionato di una fonte alternativa di acido linoleico, l'olio di vinacciolo in quantità pari a 47 mg/L.

---

\* *Corrispondenza ed estratti:* barbara.dalbello@unito.it

<sup>1</sup> Sezione di 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).

b) *Estrazione e analisi degli acidi grassi* - I lipidi sono stati estratti mediante estrazione liquido/liquido con una soluzione di cloroformio/metanolo (2:1 v/v), saponificati come riportato da Lin *et al.* [4] e gli acidi grassi liberi metilati in ambiente acido seguendo la procedura indicata da Chin *et al.* [5] e Station *et al.* [6]. Un microlitro di estratto di acidi grassi metilati è stato analizzato con gascromatografo GC VARIAN 3400 (Varian Assoc. Inc., Walnut Creek, CA, USA) equipaggiato con detector FID e software Chrom Card (Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA).

I due principali fra i CLA, il *cis-9,trans-11* e il *trans-10,cis-12* sono stati identificati mediante comparazione con i tempi di ritenzione dei rispettivi standard metilici (Sigma-Aldrich, Italia). La concentrazione dei CLA è stata calcolata utilizzando come standard interno il *cis-cis 11,14* metil eicosadienoate.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 50 ceppi testati solamente quattro hanno dimostrato la capacità di produrre CLA su mezzo sintetico MRS brodo. In particolare il *Lactobacillus paracasei* 37-B8.7 e il *Lactobacillus plantarum* C110-9.10.2 hanno dato i migliori risultati in termini di produzione di CLA (Tab. 1). In particolare, il ceppo *L. plantarum* 110-9.10.2 testato su latte crudo addizionato di olio di vinacciolo ha confermato la capacità di produrre CLA (Tab. 2).

Tabella 1 – Incremento del contenuto in CLA (mg/L) in MRS brodo (pH 6,80) aggiunto di acido linoleico libero (300 ppm).

Table 1 – Increase of CLA (mg/L) by lactic acid cultures in MRS broth additioned with free linoleic acid (300 ppm).

Ceppi	c9, t11 (mg/L)	t10, c12 (mg/L)	CLA totali (mg/L)	pH
<i>Lactobacillus paracasei</i> 37-B8.7	+13,4	+13,6	+27,0	4,71
<i>Lactobacillus paracasei</i> 37-B8.7.2	+3,3	+3,9	+7,2	4,69
<i>Lactobacillus plantarum</i> 110-C9.10	+2,4	+4,5	+7,0	4,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> 110-C9.10.2	+6,3	+6,5	+12,8	3,87

Tabella 2 – Contenuto in CLA (mg/g grasso) di latte intero (pH 6,70) aggiunto di olio di vinacciolo pari a 300 ppm di acido linoleico e *Lactobacillus plantarum* 110-C.9.10.2 dopo incubazione per 24h a 37°C.

Table 2 – CLA content (mg/g fat) of whole milk (pH 6,70) added with pomace oil equal to 300 ppm and *Lactobacillus plantarum* 110-C.9.10.2 after incubation of 24h at 37°C.

	c9, t11 (mg/g)	t10, c12 (mg/g)	CLA totali (mg/g)	pH
Latte crudo + olio di vinacciolo	4,5	0,4	4,9	5,01
Latte crudo + <i>L. plantarum</i> 110-C9.10.2	4,6	0,3	4,9	4,08
Latte crudo + olio di vinacciolo + <i>L. plantarum</i> 110-C9.10.2	5,2	0,4	5,6	4,10

#### CONCLUSIONI

Dai risultati fino ad ora ottenuti si può rilevare che le stesse specie di batteri lattici possono dare incrementi differenti del contenuto in CLA e quindi la conversione dell'acido linoleico in CLA si può considerare un'attività ceppo-specifica e non specie-specifica.

I buoni risultati ottenuti per il ceppo *L. plantarum* 110-C9.10.2 fanno sì che lo si possa considerare un potenziale starter o co-starter nella produzione di yogurt e/o formaggi ad elevato valore nutrizionale.

**RIASSUNTO** – Lo scopo di questo lavoro è stato quello di selezionare ceppi di batteri lattici capaci di sintetizzare CLA da utilizzarsi come starter o colture addizionali nella produzione di yogurt e formaggi funzionali. Cinquanta ceppi di batteri lattici tra cui *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolati da formaggi tradizionali Piemontesi sono stati quindi inoculati in MRS brodo, addizionato di acido linoleico puro, al fine di testarne la capacità di produrre acidi linoleici coniugati (CLA). Successivamente è stata allestita una prova su latte crudo, addizionato di olio di vinacciolo, come fonte di acido linoleico. Dei ceppi testati, il *L. plantarum* 110-C9.10.2 e il *L. paracasei* 37-B8.7 hanno prodotto nel substrato sintetico, addizionato di acido linoleico, le più elevate quantità di CLA (rispettivamente 13 e 27 mg/L); inoltre il *L. plantarum* 110-C9.10.2 inoculato su latte crudo, addizionato di olio di vinacciolo, ha confermato la produzione di CLA con un incremento pari a 0,7 mg CLA/g grasso di latte. Dai risultati ottenuti si può quindi ipotizzare che il ceppo *L. plantarum* 110-C9.10.2 possa essere utilizzato quale ceppo

starter o co-starter nella produzione di yogurt e/o formaggi ad elevato valore nutrizionale.

*Parole chiave:* acidi linoleici coniugati, batteri lattici, latte

**SUMMARY - Production of Conjugated Linoleic Acid (CLA) by lactic acid bacteria isolated from Italian traditional cheeses.** - The aim of this work was to select lactic acid bacteria strains able to synthesize CLA and useful as starters or adjunct cultures for the development of yogurt and cheese with potential health or nutritional benefits. This research was performed with about fifty strains of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolated from traditional cheeses of Piedmont region (North-West, Italy). Among these strains, the *Lactobacillus plantarum* 110-C9.10.2 and the *Lactobacillus paracasei* 37-B8.7 have shown, on synthetic medium (MRS broth) added with free linoleic acid, the highest CLA production (13 and 27 mg/L of medium, respectively). Therefore *L. plantarum* 110-C9.10.2 inoculated in whole milk added with 47 mg/L of pomeace oil confirmed its capability to produce CLA (0.7 mg CLA/g fat). So it could be used as starter or co-starter in yogurt and/or cheese production.

*Keywords:* conjugated linoleic acid, lactic acid bacteria, 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) Ogawa J, Kishino S, Ando A, Sugimoto S, Mihara K, Shimizu S (2005). *Production of conjugated linoleic acid by acid lactic bacteria*. J. Biosc. Bioeng., 100, 355-364.
- 2) Kepler CR, Towe SB (1967). *Biohydrogenation of unsaturated fatty acid*. J. Biol. Chem., 242, 5686-5692.
- 3) Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL (2002). *Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese*. Food Micr., 20, 397-404.
- 4) Lin TY, Lin CW, Lee CH (1999). *Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic acid cultures and added linoleic acid*. Food Chem., 67, 1-5.
- 5) Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW (1992). *Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anti-carcinogens*. J. Food. Comp. Anal., 5, 185-197.
- 6) Station C, Lawless F, Kjellmer G, Harrington D, Devery R, Connolly JF, Murphy J (1997). *Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content*. J. Food. Sci, 62, 1083-1086.