

LISOSAN G: FERMENTATO DI GRANO CON CAPACITÀ PREBIOTICHE E ANTI-INFIAMMATORIE

Il processo di fermentazione di sfarinati di grano biologico porta allo sviluppo di un lisato di grano che si arricchisce di alcuni composti fenolici come l'acido gallico e l'acido vanillico, con un conseguente aumento dell'attività antiossidante totale. I risultati di questo studio evidenziano come questo lisato sia in grado di ridurre, a livello delle cellule del colon, l'infiammazione e lo stress ossidativo.

* V. Longo
* M. Gabriele
* L. Pucci

La fermentazione

La fermentazione dei cereali è un'antica tecnica utilizzata per migliorare la consistenza, la digeribilità e la conservabilità di diversi alimenti, riducendo al contempo diversi fattori anti-nutrizionali. Gli alimenti fermentati sono ampiamente utilizzati da anni nelle culture asiatiche e africane ma di recente si è assistito anche in Europa ad un crescente interesse per i cibi fermentati dovuto ai presunti benefici per la salute legati al loro consumo (1). La fermentazione dei cereali è considerata utile per il rilascio e la produzione di una maggiore quantità di composti, come polifenoli e altri antiossidanti, rispetto al prodotto di partenza. In particolare, nei cereali sono presenti molti composti fenolici che si possono trovare in forma libera o legata. Durante il processo di fermentazione, l'attività di idrolisi della componente microbica, da una parte potrebbe facilitare il rilascio dei fenoli legati rendendoli più accessibili all'assorbimento, dall'altra potrebbe, invece, portare alla sintesi di nuovi composti bioattivi (2-3).

La presenza di una maggiore quantità di molecole bioattive in seguito al processo fermentativo può avere un effetto benefico sulla composizione batterica intestinale. È oggi noto che il microbiota, ossia l'insieme delle popolazioni microbiche presenti nel nostro intestino, ha un ruolo importante nella salute umana e vi è un crescente interesse nell'utilizzare approcci dietetici per modularne la composizione e la funzione metabolica così da prevenire e/o controllare numerose patologie. Una strategia dietetica utile a mo-

dulare il microbiota intestinale è rappresentata da un regolare consumo di fibre alimentari e alimenti prebiotici che possono essere metabolizzati dai microorganismi residenti nel tratto gastrointestinale (4).

Il lisato di grano (Lisosan G)

Il processo di fermentazione sviluppato da Agrisan SRL (Larciano, PT), utilizzando sfarinati di grano biologico (*Triticum aestivum*), ha portato allo sviluppo di un lisato di grano, denominato Lisosan G, ricco in vitamine del gruppo B e tocoferoli, antiossidanti e oligoelementi, e acidi grassi polinsaturi (acido linoleico e acido linolenico) in quantità apprezzabili. Questo lisato presenta un alto potere antiossidante e può essere assunto da solo o in combinazione con altri prodotti alimentari come pane e pasta per migliorarne le proprietà nutritive. A oggi, numerosi studi sono stati pubblicati sull'effetto detossificante, antiossidante e anti-infiammatorio del lisato e su altri suoi aspetti salutistici (5-7).

I risultati delle ricerche effettuate su questo lisato evidenziano i meccanismi molecolari attraverso

so cui esso agisce sul sistema di difesa antiossidante del nostro organismo, costituito da enzimi e molecole in grado di mantenere a livelli fisiologici sostanze tossiche come i radicali liberi, che si formano all'interno dell'organismo. Il sistema antiossidante è controllato da un fattore di trascrizione nucleare, chiamato Nrf2, che in seguito ad attivazione trasloca dal citoplasma al nucleo attivando l'espressione di enzimi target. I risultati sperimentali dimostrano la capacità del lisato testato di attivare Nrf2 e, di conseguenza, indurre il sistema antiossidante presente nell'organismo. È stato visto, inoltre, che il lisato è in grado di inibire NFkB, un fattore di trascrizione coinvolto nell'attivazione della risposta infiammatoria (8). Recentemente sul lisato in esame è stata eseguita una caratterizzazione microbica che ha evidenziato tre principali generi di batteri presenti: *Lactobacillus* (45.4%), *Enterococcus* (28%) e *Pediococcus* (17%) che sono riconosciuti sicuri e con alta capacità fermentativa. Questi batteri possono contribuire al rilascio di composti bioattivi capaci di modulare positivamente il microbiota intestinale (9). Nello stesso



Foto di R. Longo

La fermentazione dei cereali è un'antica tecnica utilizzata per migliorare la consistenza, la digeribilità e la conservabilità di diversi alimenti



Foto di H. Toyama

Il lisato di grano è in grado di ridurre, a livello delle cellule del colon, l'infiammazione e lo stress ossidativo.

lavoro è stato visto che il lisato stimola la crescita del *Lactobacillus reuteri* di 6-7 volte; questo batterio è un importante componente del microbiota intestinale sia dell'uomo che degli animali ed è largamente utilizzato come probiotico per le sue proprietà salutistiche. L'azione positiva sulla crescita del *Lactobacillus reuteri* lascia ipotizzare che questo lisato abbia importanti proprietà prebiotiche.

In questo lavoro riassumiamo i risultati sulla caratterizzazione del profilo fenolico del lisato e del relativo prodotto non fermentato e gli effetti antiossidanti e anti-infiammatori osservati in un modello cellulare di colon umano (linea cellulare HT-29) esposto ad insulto infiammatorio.

Materiali e metodi

La farina di *Triticum aestivum* prima e dopo fermentazione è stata fornita da Agrisan SRL Larciano (PT) ed è stata risospesa in acqua e sottoposta a sonicazione (3 cicli per 10 secondi); in seguito a centrifugazione, il sovranatante è stato prelevato e conservato a 4°C per il trattamento sulle cellule.

Per l'analisi in HPLC-DAD (cromatografia liquida con rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi) del profilo fenolico, i campioni di grano fermentato e non fermentato sono stati estratti con 80% metanolo (v/v) a temperatura ambiente per 2 ore con uno shaker Unimax 2010 (Heidolph Instruments, GmbH, Germania). Gli estratti sono stati filtrati attraverso la carta Munktell No 390 (Mun-

ktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, Germania) e conservati in provette chiuse. Prima dell'analisi in HPLC-DAD l'estratto è stato filtrato attraverso il filtro a siringa QMax (0,22 µm, 25 mm, PVDF). Le analisi HPLC sono state eseguite su una fase inversa; la fase mobile consisteva in un gradiente di acetonitrile e acido fosforico allo 0,1% in H₂O distillata.

Trattamento delle HT-29

Le cellule sono state pretrattate con 0.08 and 0.4 mg/ml di farina di grano pre-fermentazione (FG) o di Lisosan G (LG) per un'ora e poi esposte per 24 ore a TNF-α (5 ng/ml), una citochina infiammatoria. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Risultati

I composti fenolici del lisato e della farina di grano pre-fermentazione (FG) sono mostrati nella Tabella 1.

Nel lisato si evidenzia una notevole quantità di acido gallico (419.4 mg/kg peso secco), che risulta essere il composto fenolico maggiormente presente, con livelli 17 volte più alti rispetto al prodotto non fermentato, FG. Nel lisato sono, inoltre, presenti l'acido benzoico e l'acido vanillico assenti nel prodotto non fermentato. Quercetina, acido ferulico e quercetrina sono presenti in entrambi i prodotti in modeste quantità e solo in FG troviamo tracce di acido cumarico. I dati sono in accordo con quanto osservato nei precedenti lavori di Longo et al. (2007) e Frassinetti et al. (2012) in cui si evidenziava un alto potere antiossidante del lisato (5, 7).

Parallelamente si è proceduto valutando l'effetto di citotossicità da parte di FG e LG, mediante saggio colorimetrico MTT, sulla linea cellulare delle HT-29 al fine di individuare le condizioni ottimali di trattamento. La vitalità cellulare non variava dopo 24 ore di esposizione a 0.08 e 0.4 mg/mL di FG o LG, mentre si osservava citotos-

Tabella 1 - Composizione fenolica del Lisosan G e della farina pre-fermentazione, tempo di ritenzione (Rt), lunghezza d'onda (nm) e concentrazione (mg/kg peso secco). LOD: limite di determinabilità.

Composti	Rt	Lunghezza d'onda	mg/Kg peso secco	
			Lisosan G	Farina pre-fermentazione (FG)
Acido gallico	2.669	320	419.4	23.7
4-OH Acido benzoico	4.830	265	10.8	≤LOD*
Acido vanillico	5.260	265	33.6	≤LOD*
Rutin	5.955	265	≤LOD*	≤LOD*
Vitexin	6.275	320	≤LOD*	≤LOD*
Iso-quercetrina	6.987	372	18.4	29.9
trans-p-Acido cumarico	7.444	320	≤LOD*	1.5
trans-Acido ferulico	8.219	320	14.5	13.3
Quercetin	17.363	372	16.2	15.2

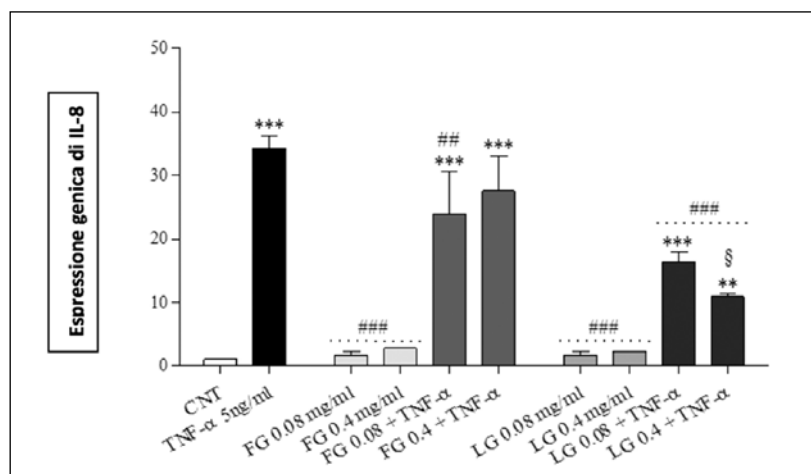


Figura 1. Espressione del gene IL-8

sicità a concentrazioni più elevate di LG (0.8 and 1.6 mg/mL).

Sulla base dei risultati ottenuti gli esperimenti successivi sono stati fatti alle concentrazioni che non hanno mostrato tossicità.

Per studiare le proprietà anti-infiammatorie degli estratti di FG e LG abbiamo valutato, mediante PCR real-time quantitativa, i loro effetti sulla modulazione di geni coinvolti nell'infiammazione. Nello specifico, abbiamo analizzato l'espressione genica sia della cicloossigenasi COX-2 (prosta-glandina-endoperossido sintasi 2) indotta dall'insulto infiammatorio, che della citochina pro-infiammatoria IL-8 / CXCL8 (ligando chemochine motivo CXC 8).

Il trattamento delle cellule del colon HT-29 con TNF-α ha provocato un aumento di fattori pro-infiammatori come interleuchina-8 e COX-2 ed il pretrattamento con il lisato ha mostrato un'ottima capacità nel ridurre l'induzione dei fattori infiammatori. Inoltre, per entrambi i geni, l'effetto osservato è significativamente più elevato con il lisato, ad entrambe le concentrazioni testate, di quanto ottenuto con la farina prima della fermentazione.

Infine il lisato ha mostrato una maggiore capacità di ridurre, nelle cellule trattate con TNF-α, i radicali liberi e di indurre il sistema antiossidante. NFκB è un fattore di trascrizione che gioca un importante ruolo nell'espressione di fattori infiammatori. Nella

forma inattiva NFκB è localizzato nel citoplasma legato ad altre proteine come IκB ed in seguito ad attivazione viene rilasciato e trasloca nel nucleo dove attiva i fattori infiammatori. Attraverso la microscopia a fluorescenza si è potuto vedere che il trattamento delle cellule per 6, 12, e 24 ore con 5 ng/ml TNFα ha indotto il passaggio di NFκB dal citoplasma al nucleo con il punto massimo a 12 ore e con conseguente aumento dei processi infiammatori. Il pretrattamento delle cellule con FG o LG ha bloccato il processo di traslocazione. I risultati fanno ipotizzare la capacità di FG ma soprattutto di LG di ridurre l'infiammazione a livello intestinale. In figura 1 sono riportati i risultati dell'effetto di FG ed LG sull'espressione del gene dell'interleuchina 8, un'importante chemochina che ha un ruolo chiave nei processi infiammatori.

Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio indicano che il processo di fermentazione porta ad un arricchimento di composti fenolici come acido gallico, 4-OH acido benzoico e acido vanillico con conseguente aumento dell'attività antiossidante totale. I nostri risultati evidenziano inoltre una maggiore capacità del lisato esaminato, rispetto al prodotto pre-fermentazione, di ridurre a livello delle cellule del colon l'infiammazione indotta da TNF-α e lo stress

ossidativo. Sulla base dei risultati ottenuti si può ipotizzare che l'assunzione del Lisosan G possa essere un utile coadiuvante nel trattamento delle malattie croniche intestinali la cui incidenza è in rapido aumento. Poiché l'infiammazione intestinale porta a un disequilibrio del microbiota e il prodotto testato ha un effetto positivo sul *Lactobacillus reuteri* (9), il lisato potrebbe rappresentare un utile prodotto, con effetto prebiotico, capace di riequilibrare il microbiota intestinale e di ridurre l'infiammazione.

***Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR**

Bibliografia

1. Terefe NS (2016) Reference Module In Food Science. In Food Fermentation; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 1–3
2. Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB (2014) Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity in Plant-Based Foods. *Food Chem* 160: 346–356
3. Dey TB, Kuhad RC (2014) Enhanced Production and Extraction of Phenolic Compounds from Wheat by Solid-State Fermentation with *Rhizopus Oryzae* RCK2012. *Biotechnol. Rep.* 4: 120–127.
4. Holscher HD (2017) Dietary Fiber and Prebiotics and the Gastrointestinal Microbiota. *Gut Microbes* 8: 172–184
5. Longo V, Chirulli V, Gervasi PG, Nencioni S, Pellegrini M (2007) Lisosan G, a powder of grain, does not interfere with the drug metabolizing enzymes and has a protective role on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biotechnol Lett* 29: 1155–1159
6. Longo V, Gervasi PG, Lubrano V (2011) Cisplatin induced toxicity in rat tissues: the protective effect of Lisosan G. *Food Chem Toxicol* 49: 233–237
7. Frassinetti S, Della Croce CM, Caltavuturo L, Longo V (2012) Antimutagenic and antioxidant activity of Lisosan G in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem* 135: 2029–2034
8. La Marca M, Befly P, Pugliese A, Longo V. A fermented powder of wheat, is an inducer of the antioxidant/detoxifying system in primary rat hepatocytes (2013) *PLOSone* 8, n. 12: 1–9
9. Balli D, Bellumori M, Paoli P, Pieraccini G, Di Paola M, De Filippo C, Di Gioia D, Mulinacci N, Innocenti M (2019) Study on a Fermented Whole Wheat: Phenolic Content, Activity on PTP1B Enzyme and In Vitro Prebiotic Properties. *Molecules* 24, 1120; doi:10.3390/molecules24061120