

ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, ALICJA DŁUBAŁA, JUSTYNA MALEC

WIĄZANIE CHOLESTEROLU PRZEZ BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ IZOLOWANE OD DZIECI

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie zdolności *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 oraz szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kału zdrowych dzieci do wiązania cholesterolu w środowisku modelowego soku jelitowego i podłoża MRS Bulion. Do oznaczenia pozostałości cholesterolu w próbkach zastosowano diagnostyczny zestaw enzymatyczny Cholesterol RTU. Hodowle prowadzono w 24-dółkowych płytkach titracyjnych. Pomiary absorbancji przy oznaczaniu stopnia wiązania cholesterolu oraz OD₆₀₀ wykonano przy użyciu czytnika mikroplatek Spark 10M. Szczepy wykazujące największy stopień wiązania cholesterolu oceniono pod względem zdolności wzrostu oraz wiązania cholesterolu ze środowiska przy zwiększającym się obciążeniu cholesterolem [g/dm³]: 1,66, 2,85 i 3,75. *L. rhamnosus* i *L. casei* wykazywały zdolność do wiązania cholesterolu z podłoża MRS Bulion odpowiednio w 68,18 i 83,6 %, natomiast w modelowym soku jelitowym osiągały odpowiednio 60 i 50 %. Szczepy wyizolowane z kału dzieci charakteryzowały się dużą zmiennością w stopniu wiązania cholesterolu ze środowiska, przy czym lepsze rezultaty osiągnięto w przypadku modelowego soku jelitowego (1,81 ÷ 77,99 %) niż podłoża MRS Bulion (0,49 ÷ 33,14 %). Przy zwiększającej się zawartości cholesterolu w środowisku badane szczepy wykazywały zmniejszony przyrost biomasy, co korelowało ze zmniejszonym stopniem wiązania tego związku. Największą redukcję cholesterolu z modelowego soku jelitowego uzyskano przy jego stężeniu – 1,66 g/dm³. Stężenie cholesterolu 3,75 g/dm³ skutkowało zahamowaniem przyrostu biomasy, a tym samym najmniejszym ubytkiem tego związku ze środowiska.

Słowa kluczowe: LAB, cholesterol, efekt hipocholesterolemiczny, modelowy sok jelitowy

Wprowadzenie

Hipercholesterolemia (podwyższony poziom cholesterolu we krwi) jest uważana za główny czynnik ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic, choroby wieńcowej serca, udaru mózgu. Mimo że istnieją środki farmakologiczne do leczenia tego stanu (np. statyny), ich działanie jest często nieoptymalne, a one same są kosztowne i mogą wywoływać

Dr hab. inż. E. Bogusławska-Wąs, dr inż. A. Dłubała, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 17, 70-310 Szczecin, mgr inż. J. Malec. Kontakt: alicja.dlubala@zut.edu.pl

niepożądane skutki uboczne [16]. Wykazano, że doustne podawanie probiotyków może obniżyć poziom cholesterolu o $22 \div 33$ % [13]. Działanie hipocholesterolemiczne przypisuje się bakteriom z rodzaju: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* [3, 5, 14].

Właściwości bakterii jelitowych i ich zdolność do obniżania poziomu cholesterolu wchłanianego do krwiobiegu wzbudzają zainteresowanie naukowców [11, 12, 15]. Proponowanych jest kilka mechanizmów redukcji poziomu cholesterolu przez drobnoustroje. Jednym z najlepiej poznanych jest dekoniugacja kwasów żółciowych przez enzym BSH (ang. *Bile Salts Hydrolase*) wytwarzany przez wiele LAB (ang. *Lactic Acid Bacteria*), w szczególności bakterii izolowanych z przewodu pokarmowego z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [19]. Zdekoniugowane kwasy żółciowe są mniej rozpuszczalne w wodzie, co prowadzi do ich eliminacji wraz z kałem. Cholesterol natomiast jest używany do produkcji nowych kwasów żółciowych, co w efekcie obniża jego stężenie w surowicy [4]. Cholesterol może ulegać koprecypitacji ze zhydrolizowanymi kwasami żółciowymi [8].

Bakterie fermentacji mlekowej mogą także asymilować cholesterol do błony komórkowej, co powoduje zmianę rozkładu nasyconych i nienasyconych błonowych kwasów tłuszczowych, w szczególności kwasu mirystynowego, palmitynowego, stearynowego, stearooleinowego i oleinowego [11]. Usman [22] uważa, że w przypadku szczepu *Lactobacillus gasseri* zmniejszenie ilości cholesterolu w środowisku zachodzi na drodze wiązania go ze ścianą komórkową.

Cholesterol może być także przekształcany w jelitach w koprostanol, który jest bezpośrednio wydalany z kałem. Powoduje to zmniejszenie ilości cholesterolu wchłanianego w jelitach, a tym samym prowadzi do zmniejszenia stężenia fizjologicznej puli tego związku [2]. Chiang i wsp. [2] stwierdzili, że dehydrogenaza/izomeraza produkowana przez bakterie, takie jak *Sterolibacterium denitrificans* jest odpowiedzialna za katalizowanie przemian cholesterolu do cholest-4-en-3-onu, kofaktora w przemianach cholesterolu w koprostanol. Redukcja poziomu cholesterolu może mieć też związek z przekształcaniem go przez szczepy probiotyczne w krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) wykorzystywane do syntezy błony komórkowej podczas fazy wzrostu [10].

Celem niniejszej pracy było określenie zdolności *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 oraz szczepów bakterii fermentacji mlekowej izolowanych z kału dzieci do obniżania poziomu cholesterolu w środowisku modelowego soku jelitowego i podłoża MRS Bulion.

Material i metody badań

W badaniach wykorzystano 53 szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z kału zdrowych dzieci oraz dwa szczepy wzorcowe: *Lactobacillus rhamnosus*

ATCC 9595 i *Lactobacillus casei* ATCC 334. Do ożywiania i namnażania szczepów używano podłoża MRS Bulion (Scharlab, Hiszpania). Hodowle kultur prowadzono w temp. 30 °C przez 24 h.

Oznaczanie zdolności do wiązania cholesterolu prowadzono w warunkach modelowych. Jako próby kontrolnej używano podłoża MRS Bulion (Scharlab, Hiszpania), natomiast w celu symulowania warunków panujących w przewodzie pokarmowym przygotowano modelowy sok jelitowy zgodnie z Tomaro-Duchesneau i wsp. [21]. Przed sterylizacją wartość pH soku modelowego doprowadzano do 6,5 za pomocą 2 M NaOH. Po sterylizacji do soku jelitowego wprowadzano pankreatynę w formie preparatu enzymatycznego Kreon Travix 10 000 (Mylan Pharmaceuticals Sp. z o.o., Polska) – jedna kapsułka zawierała 10 000 jednostek FIP lipazy, 8 000 jednostek FIP amylazy, 600 jednostek FIP proteazy. Enzym był dodawany w ilości równej zawartości dwóch kapsulek preparatu na 25 ml podłoża. Źródłem cholesterolu w próbach był krystaliczny związek o czystości chemicznej > 99 % (Sigma-Aldrich, Polska) rozpuszczany na gorąco w 96-procentowym alkoholu etylowym. Każdorazowo przed doświadczeniem sporządzano nową porcję roztworu cholesterolu.

W pierwszym etapie doświadczenia oceniano zdolność badanych szczepów do przyrostu biomasy oraz wiązania cholesterolu w środowisku MRS Bulion i w modelowym soku jelitowym. W tym celu przygotowano 3 warianty doświadczenia:

- wariant 1 (W1) – MRS Bulion (próba kontrolna),
- wariant 2 (W2) – MRS Bulion + 1-procentowy roztwór cholesterolu (ostateczna ilość cholesterolu w podłożu wynosiła 1,66 g/dm³),
- wariant 3 (W3) – modelowy sok jelitowy + 1-procentowy roztwór cholesterolu (ostateczna ilość cholesterolu w podłożu wynosiła 1,66 g/dm³).

Do podłoża wprowadzano zawiesinę badanych szczepów o gęstości 4 w skali McFarlanda ($1,2 \times 10^9$ jtk/ml). Hodowlę prowadzono w 24-dołkowych płytkach titracyjnych. Z każdego wariantu doświadczenia pobierano materiał do pomiaru wartości OD₆₀₀ (Spark 10M, Tecan, Szwajcaria). Wszystkie próbki inkubowano w temp. 30 °C przez 18 h. Po inkubacji ponownie dokonywano pomiarów OD₆₀₀ (Spark 10M, Tecan) oraz oceniano stopień wiązania cholesterolu w próbach W2 i W3.

Do oznaczenia pozostałości cholesterolu w próbkach zastosowano diagnostyczny zestaw enzymatyczny Cholesterol RTU (BioMerieux, Polska). Przed przystąpieniem do oznaczania hodowlę wirowano (7500 rpm/10 min, 4 °C) w celu wydzielenia płynu pohodowlanego. Pomiar absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 500$ nm czytelnikiem mikroplitek Spark 10M (Tecan, Szwajcaria).

Ilość cholesterolu [%] związanego ze środowiska obliczano z równania:

$$U = [(A - B) \times 100] / A$$

gdzie:

U – ubytek cholesterolu [%], A – absorbanca próbki z dodatkiem cholesterolu przed inkubacją, B – absorbanca próbki z dodatkiem cholesterolu po 18 h hodowli w 30 °C.

W drugim etapie doświadczenia oceniano wpływ obciążenia cholesterolem na przyrost biomasy i jego wiązanie ze środowiska. Analizę prowadzono na sześciu szczepach środowiskowych wykazujących największą zdolność do wiązania cholesterolu (> 70 %) oraz na szczepie wzorcowym *L. rhamnosus*. Oznaczenia prowadzono w modelowym soku jelitowym w trzech wariantach doświadczalnych [g/dm³]: 1,66 (I), 2,85 (II) i 3,75 (III). Przygotowanie zawiesiny szczepów, warunki hodowli oraz ocena stopnia związania cholesterolu zostały utrzymane i przeprowadzone według schematu opisanego powyżej.

Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Obliczono wartości średnie oraz współczynniki korelacji. Istotność różnic weryfikowano testem t-Studenta przy $p = 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu programu Statistica 13 (StatSoft, Polska).

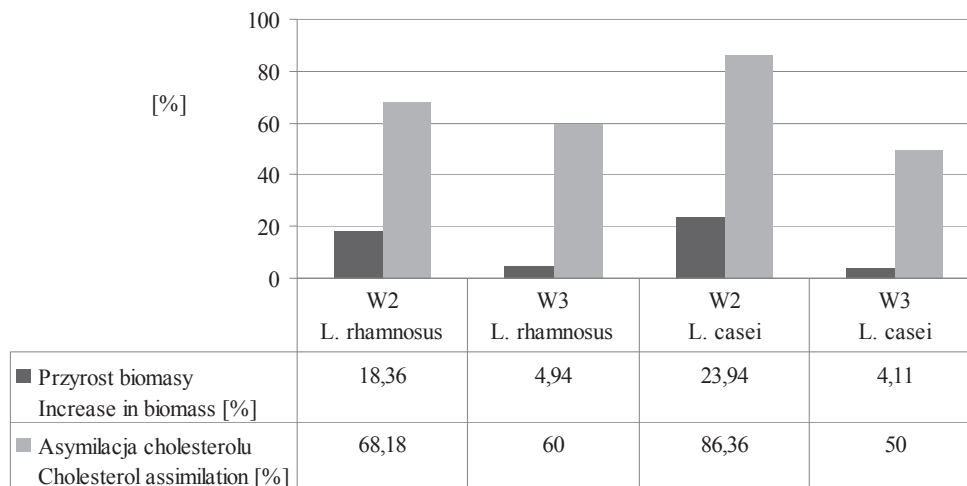
Wyniki i dyskusja

W badaniach przeprowadzonych na szczepach wzorcowych *L. rhamnosus* i *L. casei* wykazano, że charakteryzowały się one większym wzrostem na podłożu MRS Bulion, na którym przyrost biomasy szczepu *L. rhamnosus* wynosił 227,27 %, a szczepu *L. casei* – 683,3 %. Dodatek cholesterolu do podłoża spowodował zmniejszenie przyrostu biomasy odpowiednio do: 18,36 i 23,94 %. Środowiskiem najmniej korzystnym do wzrostu badanych szczepów był modelowy sok jelitowy z dodatkiem cholesterolu, w którym uzyskano przyrost biomasy odpowiednio: 4,94 % i 4,11 %. Wyniki te nie potwierdzają wniosków z badań, które przeprowadzili Kimoto i wsp. [6]. Wykazali oni bowiem korzystny wpływ cholesterolu na wzrost komórek *Lactobacillus* sp. W badaniach własnych szczepy wzorcowe wykazywały większy stopień wiązania cholesterolu w środowisku podłoża MRS niż modelowego soku jelitowego. Ubytek cholesterolu z podłoża MRS Bulion zawierającego *L. rhamnosus* wynosił 68,18 %, natomiast z modelowego soku jelitowego – 60 %. W przypadku *L. casei* wartości te wynosiły odpowiednio: 83,36 i 50 % (rys. 1).

Niekorzystny wpływ na przyrost biomasy szczepów wzorcowych w soku jelitowym mogła wykazywać obecność kwasów żółciowych zawartych w preparacie Difco Oxgall (VWR, USA) (skoniugowany kwas taurocholowy i glikocholowy). Żółć i sole żółci wywierają niekorzystny wpływ na przeżywalność bakterii, w tym także należących do *Lactobacillus* [8]. Podobne wyniki uzyskali Raghavan i wsp. [14], którzy wykazali najwyższą redukcję poziomu cholesterolu na podłożu bez dodatku kwasów żółciowych.

Stwierdzono statycznie istotną zależność ($p \leq 0,05$) pomiędzy wzrostem liczby komórek *L. rhamnosus* i *L. casei* a zmniejszeniem ilości cholesterolu w podłożu MRS Bulion. Eliminacji cholesterolu w soku jelitowym nie towarzyszył wzrost biomasy

badanych szczepów. Zaobserwowano, że przy utrzymaniu na stałym poziomie liczby bakterii doszło również do zmniejszenia ilości cholesterolu, jednak uzyskane wyniki korelacji ($r = 0,3$) nie są statystycznie istotne ($p > 0,05$). Różnice te mogą wynikać z mniejszego przyrostu biomasy podczas inkubacji w soku jelitowym.

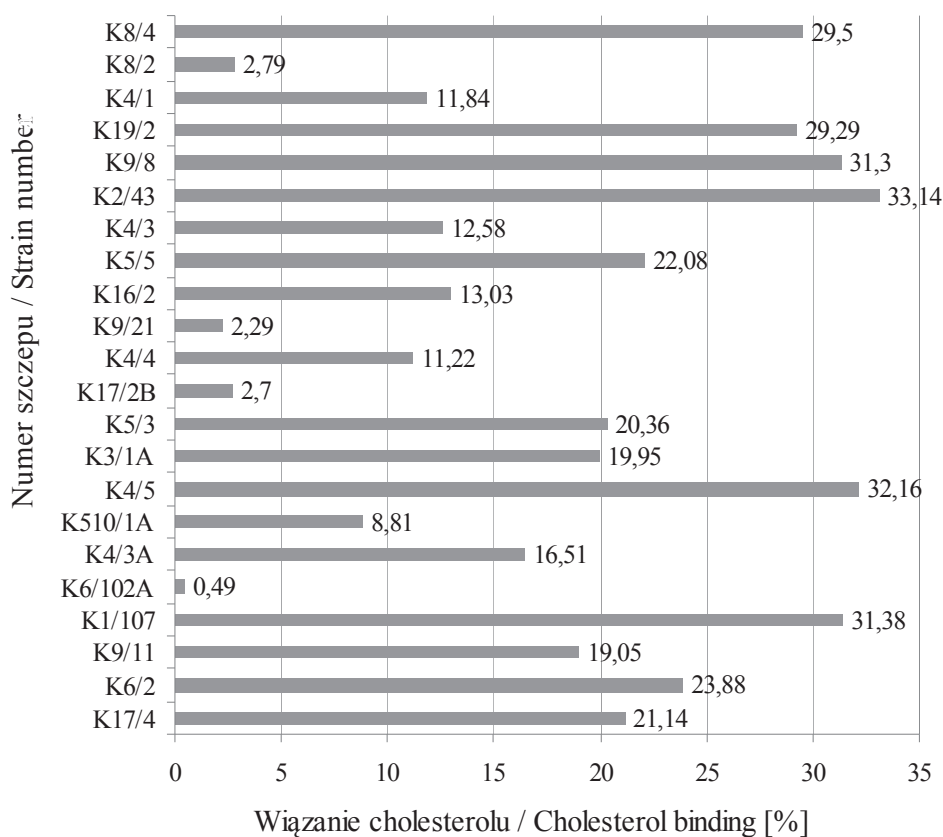


Rys. 1. Wpływ przyrostu biomasy na stopień związania cholesterolu w podłożu
Fig. 1. Effect of increase in biomass on degree of cholesterol binding in medium

W kolejnym etapie badań tożsame analizy przeprowadzono na szczepach LAB wyizolowanych z kału dzieci. Szczepy te lepiej namnażały się w modelowym soku jelitowym niż w podłożu MRS Bulion, a przyrost biomasy wynosił odpowiednio: $12,2 \div 295,5$ % oraz $3,2 \div 152,4$ %.

Wyniki stopnia wiązania cholesterolu przedstawiono na rys. 2 i 3. W przypadku izolatów od dzieci zaobserwowano większą zdolność wiązania cholesterolu w warunkach imitujących przewód pokarmowy, czego nie stwierdzono we wcześniejszym doświadczeniu w przypadku szczepów wzorcowych. W warunkach modelowego soku jelitowego 44 spośród badanych szczepów wykazywało zdolność wiązania cholesterolu w zakresie $1,81 \div 77,99$ % (rys. 3), natomiast w podłożu MRS Bulion tę cechę wykazywały 22 szczepy w zakresie $0,49 \div 33,14$ % (rys. 2). W przypadku 6 szczepów stopień wiązania cholesterolu w modelowym soku jelitowym przekraczał 70 %, a w podłożu MRS Bulion z udziałem tych samych szczepów nie przekraczał 34 %. Można przypuszczać, że najistotniejszą przyczyną różnic w zachowaniu badanych szczepów wzorcowych i środowiskowych jest ich środowisko izolacji. Szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego wykazywały naturalną oporność na warunki w nim panujące, w tym na obecność soli kwasów żółciowych. Oporność ta może wynikać

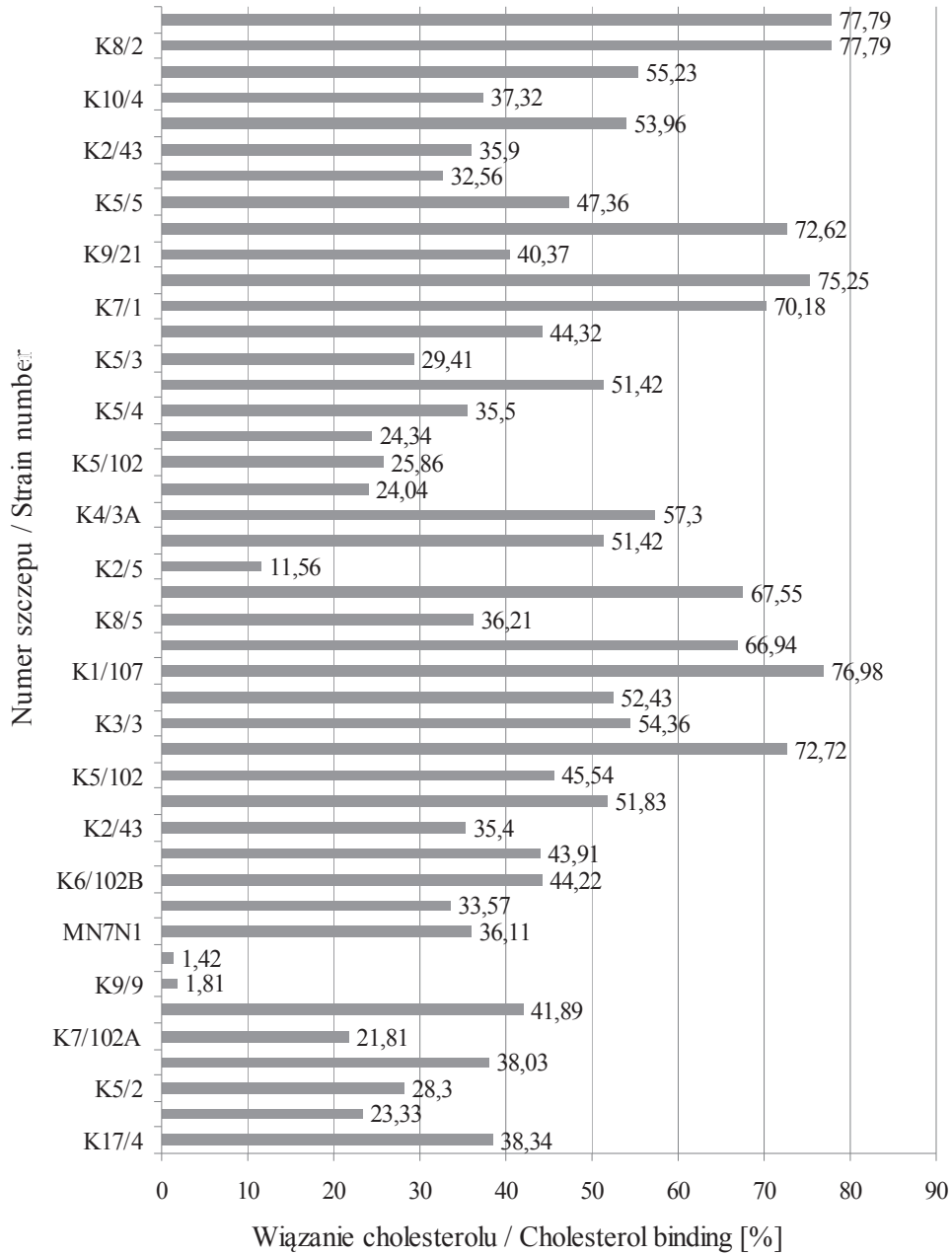
z obecności aktywnego enzymu BSH. Liang i Shah [9] badali szczepy pochodzenia ludzkiego i także uzyskali wyższe wyniki przyswajania cholesterolu w środowisku z dodatkiem Oxgall. Żółć, a w szczególności rodzaj kwasów żółciowych, ma wpływ na wiązanie cholesterolu przez drobnoustroje. Proces ten efektywniej przebiega w obecności kwasów koniugowanych [18]. Podobnie Kimoto i wsp. [6] w badaniach szczepu z rodzaju *Lactococcus* uzyskali wyższe wyniki redukcji cholesterolu w podłożu suplementowanym 0,2-procentowym taurocholanem sodu.



Rys. 2. Wiązanie cholesterolu z podłoża MRS Bulion przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci

Fig. 2. Cholesterol binding in MRS Broth medium by strains isolated from faeces of healthy children

Dla siedmiu szczepów wykazujących największy stopień wiązania cholesterolu przeprowadzono ocenę obciążenia cholesterolem. Analizy prowadzono w modelowym soku jelitowym – środowisku, w którym szczepy wykazały największy stopień wiąza-



Rys. 3. Wiązania cholesterolu z modelowego soku jelitowego przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci

Fig. 3. Cholesterol binding in model intestinal juice by strains isolated from faeces of healthy children

nia cholesterolu. Badano warianty o stężeniu cholesterolu w środowisku [g/dm^3]: 1,66, 2,85 oraz 3,75. Stwierdzono, że przy zwiększającej się ilości cholesterolu wszystkie szczepy, z wyjątkiem K8/2 i K10/2 (tab. 1), wykazywały mniejszy przyrost biomasy. Stężenie cholesterolu $3,75 \text{ g}/\text{dm}^3$ nie wpłynęło hamująco na szczepy K8/2 i K8/4, których przyrost wyniósł odpowiednio: 2,36 i 1,06 %. Nie wykazano statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi jedynie przy stężeniu cholesterolu $3,75 \text{ g}/\text{dm}^3$ ($p > 0,05$).

Wraz ze wzrastającym stężeniem cholesterolu zaobserwowano jego zmniejszający się ubytek ze środowiska, co miało związek ze słabszym wzrostem komórek. Wykazano statystycznie istotną korelację ($r = -0,72$, $p \leq 0,05$) pomiędzy przyrostem biomasy a zmniejszeniem ilości cholesterolu w środowisku przy jego stężeniu wynoszącym $1,66 \text{ g}/\text{dm}^3$. Zwiększenie stężenia cholesterolu do $2,85 \text{ g}/\text{dm}^3$ skutkowało zmniejszeniem ubytku tego związku ze środowiska, a współczynnik korelacji wynosił $r = -0,68$ ($p \leq 0,05$). Przy obciążeniu cholesterolu wynoszącym $3,75 \text{ g}/\text{dm}^3$ zauważono zahamowanie wzrostu komórek i brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy wartością OD_{600} a redukcją cholesterolu ($r = 0,21$, $p \leq 0,05$).

Tabela 1. Wiązanie cholesterolu z modelowego soku jelitowego przez szczepy wyizolowane z kału zdrowych dzieci oraz przyrost ich biomasy w zależności od ilości cholesterolu w środowisku

Table 1. Cholesterol binding in model intestinal juice by strains isolated from faeces of healthy children and increase in their biomass depending on amount of cholesterol in environment

Szczep Strain	Cholesterol – $1,66 \text{ g}/\text{dm}^3$		Cholesterol – $2,85 \text{ g}/\text{dm}^3$		Cholesterol – $3,75 \text{ g}/\text{dm}^3$	
	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss	Przyrost biomasy Biomass growth	Ubytek cholesterolu Cholesterol loss
	[%]					
K1/107	17,65	61,67	13,31	59,93	-3,01	49,25
K8/2	14,33	66,67	18,29	54,96	2,36	50,75
K8/4	29,5	62,3	15,85	61,91	1,06	55,22
K4/4	22,8	59,02	18,81	57,78	-0,56	56,72
K10/2	22,99	62,3	32,47	54,48	-6,01	46,27
K9/4	18,43	63,44	15,16	58,47	-11,73	52,24
<i>L. rhamnosus</i>	40,74	68,34	20,78	67,69	-16,73	44,78
p	0,0004	0,000001	0,000051	0,000001	0,09	0,000001

W badaniach własnych stwierdzono ścisłą korelację pomiędzy przyrostem biomasy a ilością usuniętego cholesterolu. Zależność tę uzyskano zarówno w przypadku szczepów wzorcowych w podłożu MRS Bulion, jak i szczepów wyizolowanych od dzieci w modelowym soku jelitowym. Potwierdza to wyniki badań przeprowadzonych

przez Kimoto i wsp. [7] oraz Taranto i wsp. [20]. Autorzy ci stwierdzili jednak, że niezależnie od liczby komórek korzystniejsze wyniki wiązania cholesterolu osiągnięto podczas inkubacji na podłożu MRS Bulion z dodatkiem cholesterolu w porównaniu z modelowym sokiem jelitowym.

Uzyskane w pracy wyniki potwierdzają doniesienia innych naukowców o znacznym zróżnicowaniu wiązania cholesterolu przez drobnoustroje w obrębie gatunku, a także pomiędzy szczepami tego samego gatunku [11, 17]. Mniejsza zdolność wiązania cholesterolu przez niektóre szczepy może wynikać z różnic w budowie ściany komórkowej i mniejszej tolerancji na sole żółci obecne w modelowym soku jelitowym [7].

Przebadane w niniejszej pracy szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego dzieci były zdolne do wywołania efektu hipocholesterolemicznego. Konieczne są dalsze badania *in vitro* wskazujące na molekularne podstawy tego mechanizmu.

Wnioski

1. Szczepy wyizolowane z przewodu pokarmowego zdrowych dzieci wykazują zdolność do wywołania efektu hipocholesterolemicznego. Spośród badanych 53 szczepów 44 eliminowały cholesterol ze środowiska modelowego soku jelitowego, a 22 – z podłoża MRS Bulion.
2. Stężenie cholesterolu 3,75 g/dm³ w środowisku modelowego soku jelitowego działa hamująco na wzrost mikroorganizmów.
3. Szczepy wyizolowane z kału, w przeciwieństwie do szczepów wzorcowych *L. rhamnosus* ATCC 9595 oraz *L. casei* ATCC 334, lepiej namnażają się oraz wykazują większą zdolność wiązania cholesterolu w warunkach modelowego soku jelitowego niż w podłożu MRS Bulion.
4. Zwiększenie stężenia cholesterolu w środowisku skutkuje osłabieniem przyrostu biomasy, co koreluje ze zmniejszoną eliminacją tego związku ze środowiska.

Literatura

- [1] Cheng-Chin T., Pei-Pei L., You-Miin., Zi-Yi Z., Hui-Ching W., Chun-Chih H.: Cholesterol lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile salts hydrolase activity and effect of potential strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Sci. World J.*, 2014, #690752. DOI: 10.1155/2014/690752.
- [2] Chiang Y.R., Ismail W., Heintz C., Schaeffer C., van Dorsselaer A., Fuchs G.: Study of anoxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J. Bact.*, 2008, 190 (3), 905-914.
- [3] Guo L., Li T., Tang Y., Yang L., Hou G.: Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microb. Biotechnol.*, 2016, 9 (6), 737-745.
- [4] Hosono A., Otani H., Yasui H., Watanuki M.: Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. *Anim. Sci. J.*, 2002, 73, 241-256.

- [5] Jones M.L., Chen H., Ouyang W., Metz T., Prakash S.: Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004 1 (6), 61-69.
- [6] Kimoto H., Ohmomo S., Okamoto T.: Cholesterol removal from media by lactocci. *J. Dairy Sci.*, 2002, 8 (5), 3182-3188.
- [7] Kimoto H., Nomura M., Kobayashi M., Mizumachi K., Okamoto T.: Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Can. J. Microbiol.*, 2003, 49 (11), 707-711.
- [8] Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K., Yokota A.: Mechanisms of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J. Bacteriol.*, 2006, 188, 1979-1986.
- [9] Liong M.-T., Shah N.P.: Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Res. Int.*, 2005, 38, 135-142.
- [10] Michael D.R., Davies T.S., Moss J.W.E., Calvente D.L., Ramji D.P., Marchesi J.R., Pechlivanis A., Plummer S.F., Hughes T.S.: The anti-cholesterolaemic effect of a consortium of probiotics: An acute study in C57BL/6J mice. *Sci. Rep.*, 2017, 7 (1), 2883-2886.
- [11] Miremadi F., Ayyash M., Sherkat F., Stojanovska L.: Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J. Funct. Foods.*, 2014, 9, 295-305.
- [12] Noh D.O., Kim S.H., Gilliland S.E.: Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 3107-3113.
- [13] Pereira D.I.A., Gibson G.R.: Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 37 (4), 259-281.
- [14] Raghavan C.M., Nanda A., Yuvaraj R., Mukesh Kumar D.J., Senthil Murugan A., Nalaji Raja R.: Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* species as probiotics. *World Appl. Sci. J.*, 2011, 14 (4), 552-560.
- [15] Razin S.: Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.*, 1975, 124, 570-572.
- [16] Schuster H.: Improving lipid management – To titrate, combine or switch. *Int. J. Clin. Pract.*, 2004, 58 (7), 689-694.
- [17] Shehata G., El Sohaimy S.A., Malak A., El-Sahn A., Youssef M.M.: Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ans. Agric. Sci.*, 2016, 61 (1), 65-75.
- [18] Tahri H., Grill J.P., Schneider F.: Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Curr. Microbiol.*, 1997, 34 (2), 79-84.
- [19] Tanaka H., Hashiba H., Kok J., Mierau I.: Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum* biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (6), 2502-2512.
- [20] Taranto M.P., Fernandez Murga M.L., Lorca G., de Valdez G.F.: Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95, 86-91.
- [21] Tomaro-Duchesneau C.L., Jones M., Shah D., Jain P., Saha S., Prakash S.: Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: An *in vivo* investigation. *Biomed. Res. Int.*, 2014, #380316. DOI: 10.1155/2014/380316.
- [22] Usman H.A.: Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci.*, 1999, 82 (2), 243-248.

CHOLESTEROL BINDING BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CHILDREN**S u m m a r y**

The objective of the research study was to determine the ability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus casei* ATCC 334 and strains of lactic acid bacteria isolated from faeces of healthy children to bind cholesterol in the environment of model intestinal juice and MRS Broth medium. A cholesterol RTU enzymatic kit was used to determine the cholesterol residue in samples. The cultures were grown in 24-well titration plates. In order to determine the degree of cholesterol binding and OD₆₀₀, the absorbance was measured using a Spark 10M microplate reader. The strains with the highest degree of cholesterol binding were evaluated for their ability to grow and bind cholesterol from the environment with the increasing cholesterol load (1.66 g/dm³, 2.85 g/dm³, 3.75 g/dm³). *L. rhamnosus* and *L. casei* were able to bind 68.18 % and 83.6 % of cholesterol from the MRS Broth medium, respectively, while in the model intestinal juice those values were 60 % and 50 %, respectively. The strains isolated from the faeces of children were characterised by a high variability as regards the degree of binding cholesterol from the environment, whereas better results were achieved for the model intestinal juice (1.81 ÷ 77.99 %) than for the MRS Broth medium (0.49 ÷ 33.14 %). With the increasing amount of cholesterol in the environment, the strains tested showed a reduced increase in the biomass and this was correlated with the reduced degree of binding of that compound. As regards the model intestinal juice, the highest reduction in the level of cholesterol contained therein was obtained at its concentration of 1.66 g/dm³. The cholesterol concentration of 3.75 g/dm³ caused the increase in the biomass to be inhibited and thus the lowest quantity of this compound was removed from the environment.

Key words: LAB, cholesterol, hypocholesterolemic effect, model intestinal juice 