

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 06/10/2023.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SEUS METABÓLITOS NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES NA PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS E BENEFÍCIOS À SAÚDE.

FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

Rio Claro - SP

2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SEUS METABÓLITOS NA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES NA PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS E BENEFÍCIOS À SAÚDE.

FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Ciências Biológicas – Área: Microbiologia Aplicada.

Rio Claro – SP

2021

F475a

Figueiredo, Franciane Cristina de

Avaliação de diferentes prebióticos, probióticos e seus metabólitos na inibição de bactérias patogênicas e potenciais aplicações na preservação de alimentos e benefícios à saúde / Franciane Cristina de Figueiredo. -- Rio Claro, 2021

112 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Microbiologia. 2. Microbiota. 3. Probióticos. 4. Prebióticos. 5. Alimentos Funcionais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: Avaliação de diferentes prebióticos, probióticos e seus metabólitos na inibição de bactérias patogênicas e potenciais aplicações na preservação de alimentos e benefícios à saúde

AUTORA: FRANCIANE CRISTINA DE FIGUEIREDO

ORIENTADOR: PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras UNESP Assis

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual) 
Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro - UNESP

Profa. Dra. PATRICIA BLUMER ZACARCHENCO RODRIGUES DE SÁ (Participação Virtual) 
Centro de Tecnologia de Laticínios / Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES (Participação Virtual) 
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos / Universidade Federal de Santa Maria


Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 06 de outubro de 2021

**Dedico este trabalho aos
meus amados pais, Sonia e Erberto.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Pedro de Oliva Neto pela oportunidade, orientação e confiança em meu trabalho. Obrigada por tantos ensinamentos.

Ao professor Michel Brienzo, que acompanhou minha evolução como pesquisadora e pelo auxílio em algumas análises.

Às amigas Fabiane, Joyce, Tania e Thaís. Obrigada pelos momentos de descontração e por deixarem meus dias mais leves. Espero levar a amizade de vocês sempre comigo.

A todos os colegas de laboratório, em especial Edson, Ana Flávia e Bruna.

Aos funcionários da UNESP Assis. Á Pós-graduação da UNESP de Rio Claro.

Aos meus pais Sonia e Erberto, sem seu apoio e amor eu não teria chegado tão longe.

Ao meu irmão Silmar, à Rosi, ao Junior e à Carol. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus demais familiares, em especial ao vô Licão e à vó Tília.

À Aurea e ao Osmar, ao Léo, Aldinha e dona Zélia. Obrigada pelo carinho e por me acolherem tão bem em Assis.

Ao meu noivo, Lucas, por sempre estar ao meu lado me dando suporte e amor. Sem você, este trabalho não teria sido possível. Obrigada por sempre ter acreditado em mim e me amparado nos momentos mais difíceis. Que sorte ter você em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

ABSTRACT

Intestinal microbiota has a crucial role in health, with food supplements and other products that provide balance to the intestinal microbiota being thoroughly studied in the present day. Among such products, probiotics, prebiotics and postbiotics stand out. Probiotics are defined as living microorganisms that, when ingested in adequate quantities, positively affect the health of the host. Prebiotics are substrates that reach the intestinal microbiota intact and are capable of selectively stimulating the growth of probiotics. Postbiotics, on the other hand, is a new concept, defining extracts or supernatants of probiotic origin, cell-free and beneficial to health. These ingredients are presented as possible alternatives to the usage of antibiotics or may act as food preservatives, preventing the growth of pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, responsible for severe infections. The present thesis aimed to assess the inhibition of these pathogenic bacteria by these food ingredients, applied either singly or in mixtures. In addition, the stability of antimicrobial activity was assessed in different conditions, along with the characterization of organic acids and scale-up tests. Probiotic strains were *Bifidobacterium animalis*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Levilactobacillus brevis*. *E. coli* was inhibited by all postbiotics, both singly and in mixtures. No postbiotic at dosages of 6% (v/v) was capable of inhibiting *S. aureus*. For *Salmonella typhimurium*, the postbiotics of *B. animalis*, *B. breve* and *B. lactis* successfully inhibited the pathogen's growth. Tests with the mixture of the prebiotics fructooligosaccharides (FOS) and xylooligosaccharides (XOS) showed that, with 10h of culture, only *L. brevis* and *B. longum* were stimulated, exceeding the growth of control (glucose). The postbiotic mixture of all *Bifidobacterium* strains successfully inhibited *Salmonella's* growth as well; however, adding postbiotics from *Lactobacillus* and *Levilactobacillus* strains to the mixture lessened its inhibitory activity, showing a possible antagonism between genera. No postbiotics inhibited the growth of any probiotic bacteria, showing the potential for combined use of postbiotics and prebiotics. The stability tests revealed inhibitory activity of postbiotics after treatments with high temperature, except for the postbiotics of *B. longum*, probably due to its non-thermo-resistant bacteriocin. Four organic acids (acetic, lactic, succinic and formic) were present in all postbiotics, with acetic and lactic acid present in higher concentrations. The tests in different pH ranges revealed that organic acids show inhibitory activity when in acid pH, due to their presence in their undissociated form, capable of entering the pathogen's cell-wall and dissociating inside the cell, killing the pathogen. Scale-up tests to 2-liter fermenters showed that postbiotics from the *B. breve* strain with satisfactory inhibitory activity can be produced in 24 hours. The concentration of 6% (v/v) of this postbiotic in BG medium containing commercial sugars successfully inhibited the growth of *Salmonella typhimurium*, even in the presence of easily fermented sugars. Oven-dried (105° C) *B. breve* postbiotics showed similar inhibitory activity with concentrations of 0.9% (m/v). Although further studies are necessary to clarify the complex interaction of metabolites present in postbiotics, the stability of the inhibitory activity of these substances after treatments with high temperatures, low pH and after drying is an attribute that highlights their potential usage in the food industry.

Keywords: Probiotics, Postbiotics, Prebiotics, Organic Acid, Inhibition.

RESUMO

A microbiota intestinal tem papel fundamental na saúde, sendo os suplementos alimentares e outros produtos que proporcionam equilíbrio à microbiota intestinal amplamente estudados nos dias atuais. Dentre esses produtos, destacam-se os probióticos, prebióticos e pós-bióticos. Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro. Os prebióticos são substratos que alcançam a microbiota intestinal intacta e são capazes de estimular seletivamente o crescimento de probióticos. Postbiotics, contudo, é um novo conceito que define extratos ou sobrenadantes de origem probiótica, livres de células e benéficos à saúde. Esses ingredientes são apresentados como possíveis alternativas ao uso de antibióticos ou podem atuar como conservantes de alimentos, evitando o crescimento de bactérias patogênicas como *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, responsáveis por infecções graves. A presente tese teve como objetivo avaliar a inibição dessas bactérias patogênicas por esses ingredientes alimentícios, aplicados isoladamente ou em mistura. Além disso, a estabilidade da atividade antimicrobiana foi avaliada em diferentes condições, juntamente com a caracterização de ácidos orgânicos e testes de aumento de escala. As cepas probióticas foram *Bifidobacterium animalis*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Levilactobacillus brevis*. *E. coli* foi inibida por todos os postbiotics, tanto isoladamente quanto em misturas. Nenhum postbiotic em dosagens de 6% (v/v) foi capaz de inibir *S. aureus*. Para *Salmonella typhimurium*, os postbiotics de *B. animalis*, *B. breve* e *B. lactis* inibiram com sucesso o crescimento do patógeno. Testes com a mistura dos prebióticos frutooligossacarídeos (FOS) e xilooligossacarídeos (XOS) mostraram que, com 10h de cultivo, apenas *L. brevis* e *B. longum* foram estimulados, superando o crescimento do controle (glicose). A mistura postbiotic de todas as linhagens de *Bifidobacterium* inibiu com sucesso o crescimento de *Salmonella*, entretanto, a adição de postbiotic de *Lactobacillus* e *Levilactobacillus* à mistura diminuiu sua atividade inibitória, mostrando um possível antagonismo entre os gêneros. Nenhum postbiotic inibiu o crescimento de qualquer bactéria probiótica, mostrando o potencial para o uso combinado de postbiotic e prebióticos. Os testes de estabilidade revelaram atividade inibitória dos postbiotics após tratamentos com alta temperatura, exceto para os postbiotics de *B. longum*, provavelmente devido à sua bacteriocina não termo-resistente. Quatro ácidos orgânicos (acético, láctico, succínico e fórmico) estiveram presentes em todos os postbiotics, com os ácidos acético e láctico presentes em maiores concentrações. Os testes em diferentes faixas de pH revelaram que os ácidos orgânicos apresentam atividade inibitória quando em pH ácido, devido à sua presença na forma indissociada, capaz de entrar na parede celular da bactéria e se dissociar no interior da célula, matando o patógeno. Testes de aumento de escala para fermentadores de 2 litros mostraram que postbiotics da linhagem de *B. breve* com atividade inibitória satisfatória podem ser produzidos em 24 horas. A concentração de 6% (v/v) deste postbiotic em meio BG contendo açúcares comerciais inibiu com sucesso o crescimento de *Salmonella typhimurium*, mesmo na presença de açúcares de fácil fermentação. Postbiotic secos de *B. breve* em estufa (105° C) apresentaram atividade inibitória semelhante com concentrações de 0,9% (m/v). Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer a complexa interação dos metabólitos presentes nos postbiotics, a estabilidade da atividade inibitória dessas substâncias após tratamentos com altas temperaturas, baixo pH e após secagem é um atributo que destaca seu potencial de utilização na indústria alimentícia.

Palavras-chaves: Probiótico, Postbiotic, Prebiótico, Ácido Orgânico, Inibição.

Index

Introduction	10
Aim and Objectives	11
References	12
Chapter 1 - Advances and new perspectives in prebiotic, probiotic and symbiotic products for food nutrition and feed.....	14
Abstract	15
Introduction	15
Prebiotics	16
Intestinal Microbiota	24
Probiotics.....	28
Symbiotics	33
Evaluation models of prebiotics, probiotics and symbiotics	35
Conclusion and future perspectives.....	38
References	39
Chapter 2 – Understanding the antimicrobial properties of metabolites from probiotic bacteria.....	49
Abstract	50
Introduction	50
Material and method	52
Results and discussion	55
Conclusions	68
References	68
Chapter 3 - In vitro inhibition of pathogenic bacteria by single and mixture of postbiotic from lactic acid bacteria	72
Abstract	73
Introduction	73
Material and method	75
Results and discussion	79
Conclusions	88
References	88
Chapter 4 - Postbiotics: the potential for food preservation and health benefits.....	91
Abstract	92
Introduction	92
Material and method	94
Results and discussion	97
Conclusions	107
References	108

Conclusion and Future Perspectives	111
---	------------

INTRODUCTION

In recent years there has been an increasing interest in ingredients that promote health benefits and, at the same time, prevent the appearance of diseases. These ingredients can be naturally present in foods or added to industrialized products. Currently, researchers seek to discover and develop new products that help or modulate the proper functioning of the organism.

Among these ingredients are probiotics, prebiotics and symbiotics. Probiotics are microorganisms, usually *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which, when ingested in adequate amounts, positively affect the health of the host (Wasilewski et al., 2015). These bacteria are directly related to the prevention of inflammatory bowel diseases, the formation of neoplastic cells and allergic reactions (Quigley, 2010). Recent researches show that health benefits are not exclusively related to the bacterial viability of probiotics, thus, two new terms have emerged: Postbiotics and paraprobiotics. These terms refer to extracts, cell-free supernatants or even non-viable cells of probiotics that have the ability to promote several positive effects such as immunomodulation, anti-inflammatory and antimicrobial effects (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cuevas-González et al., 2020).

Prebiotics, on the other hand, are oligosaccharides not digestible by the consumer, these ingredients therefore reach the intestine of human and other animals intact and selectively stimulate the growth of probiotic bacteria in the intestine (Rastall and Gibson, 2015; Hutkins et al., 2016). The main oligosaccharides marketed as prebiotics are fructo-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides (Wasilewski et al., 2015). Studies point to many benefits related to the consumption of prebiotics, such as improvements in intestinal balance, increased absorption of mineral salts, inhibition of pathogens and stimulation of the immune system (Wasilewski et al., 2015; Hutkins et al., 2016; Sanders et al., 2019).

Finally, symbiotics are formulated products that combine prebiotic and probiotic ingredients (Markowiak and Ślizewska, 2018). This formulation ensures that the microorganisms ingested survive and adapt easily to the host's intestine due to the presence of prebiotics (Quigley, 2010).

Probiotics, prebiotics and symbiotics are considered alternatives to the use of antibiotics in the treatment of some diseases caused by pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*Salmonella typhimurium*), *Escherichia coli*

and *Staphylococcus aureus*, responsible for many infection cases in the world (Dayan et al., 2016; Madigan et al., 2016; Mirsepasi-Lauridsen et al., 2019).

In this thesis, a bibliographical survey was carried out, covering the main functional ingredients and the most recent studies on the importance of the intestinal microbiota on the health of the host. Laboratory tests were also developed to evaluate the effect of single or mixed postbiotics from *Lactobacillus*, *Levilactobacillus* and *Bifidobacterium* in the inhibition of important pathogenic bacteria. Furthermore, an assessment of the stability of postbiotics and scale-up tests were performed, studying the potential of these substances as ingredients for food preservatives in the food industry.

AIM AND OBJECTIVES

Aim

To assess the effect of different prebiotics and of probiotics of the *Lactobacillus*, *Levilactobacillus* and *Bifidobacterium* genera, as well as their metabolites (postbiotics), on the inhibition of the pathogens *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Objectives

- To test the inhibition of *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus* by postbiotics from the following probiotic strains: *Bifidobacterium breve*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. animalis*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactobacillus acidophilus*;
- To assess a possible synergism or antagonism between the postbiotics on the inhibition of pathogens;
- To determine the minimum inhibitory concentration of postbiotics on the inhibition of pathogens;
- To verify the inhibition of *Salmonella typhimurium* in mixed culture with probiotic strains.
- To assess the stability of postbiotics in different pH, temperature and drying conditions.

- To identify and quantify the organic acids in the postbiotics, verifying their effects on the growth of pathogenic bacteria.
- To assess a possible synergism or antagonism between postbiotics and prebiotics on the inhibition of *Salmonella typhimurium*.
- To estimate the potential use of postbiotics in larger scales performing tests with 2 L fermenters.

REFERENCES

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; GARCIA-VARELA, R.; GARCIA, H. S.; MATA-HARO, V.; GONZÁLEZ, C.; VALLEJO-CORDOBA, B.; & HERNÁNDEZ-MENDOZA. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 105-114, 2018.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; & AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and Paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Research International**, v. 136, 2020.

DAYAN, G. H.; MOHAMED, N.; SCULLY, I. L.; COOPER, D.; BEGIER, E.; EIDEN, J.; JANSEN, K. U.; GURTMAN, A.; & ANDERSON, A. S. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, p. 1373-1392, 2016.

HUTKINS, R. W.; KRUMBECK, J. A.; BINDELS, L. B.; CANI, P. D.; FAHEY, J. R. G.; GOH, Y. J.; HAMAKER, B.; MARTENS, E. C.; MILLS, D. A.; RASTAL, R. A.; VAUGHAN, E.; & SANDERS, M. E. Prebiotics: why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 1–7, 2016.

MADIGAN, M. T.; et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 2016 14th ed., Pearson Education, Singapore.

MARKOWIAK, P.; & ŚLIŻEWSKA, K. The role of probiotics, prebiotics and symbiotics in animal nutrition. **Gut Pathogens**, v. 10, p. 1-20, 2018.

MIRSEPASI-LAURIDSEN, H. C.; VALLANCE, B. A.; KROGFELT, K. A.; & PETERSEN, A. M. Escherichia coli Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, p. 1-16, 2019.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 213–218, 2010.

RASTALL, R. A.; & GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42–46, 2015.

SANDERS, M. E.; MERENSTEIN, D. J.; REID, G.; GIBSON, G. R.; & RASTALL, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 605–616, 2019.

WASILEWSKI, A.; et al. Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases Journal**, v. 21, p. 1974-1682, 2015.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

Most tested postbiotics presented inhibitory activity against the pathogenic bacteria *Salmonella typhimurium* and *E. coli* and, when in very acidic conditions, against *S. aureus*. In addition, no inhibitory activity against probiotics was observed. The tests showed that all postbiotics presented antimicrobial activity after treatments with low temperature and in low pH, while most of them remained stable after treatment with high temperature. The inhibitory potential of postbiotics is possibly related to the action of organic acids in acid pH, since the inhibitory activity was lost in neutral pH. Scale-up tests showed a production of *B. breve* postbiotics with satisfactory inhibitory activity in 24 hours. The addition of this postbiotic inhibited the growth of *Salmonella typhimurium* in medium with easily fermented sugars and oven-dried (105° C) postbiotics presented similar levels of inhibition. The stability of postbiotics in high temperatures, low pH and after drying highlights the great potential of postbiotics for the food industry. Further tests should include in-vivo tests in order to verify the health benefits of postbiotics from *B. breve* and the addition of these postbiotics in food, verifying the inhibitory activity against common food contaminants and possible changes in color, flavor or smell.