

**UNIVERSITY OF SÃO PAULO**  
SCHOOL OF PHAMACEUTICAL SCIENCES  
Post-Graduation Program in Food Science  
Area of Bromatology

**Probiotic potential of fermented milk with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 and *Streptococcus thermophilus* TH-4: impact of BSG supplementation and influence on the vitamin D receptor *in vivo*.**

Carolina Battistini

Thesis presented for the degree of  
Doctor in Sciences  
Advisor:  
Full Prof. Susana Marta Isay Saad

São Paulo  
2020

## RESUMO

BATTISTINI, C. **Potencial probiótico de leite fermentado com *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 e *Streptococcus thermophilus* TH-4: impacto da suplementação com bagaço de malte e influência sobre o receptor de vitamina D *in vivo*.** 2020. 126 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Dentre os diversos benefícios à saúde relacionados ao consumo de probióticos, destacam-se a melhora da função de barreira intestinal, produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução da resposta pró-inflamatória, modulação da microbiota intestinal, entre outros. No entanto, estes efeitos dependem da cepa empregada, da matriz de administração e da genética do hospedeiro, fatores importantes que devem ser levados em consideração na prescrição ou indicação de tratamentos. Alguns estudos sugeriram que o potencial anti-inflamatório dos probióticos parece ser regulado pelo receptor da vitamina D (VDR), que, além de mediar as funções da vitamina D, também atua como fator de transcrição associado à autofagia, função de barreira intestinal e respostas imunológicas. Entretanto, este é um tópico ainda pouco explorado e nenhum estudo avaliou a administração de probióticos em uma matriz alimentar na resposta anti-inflamatória relacionada ao VDR. Sendo assim, o presente trabalho avaliou o impacto da suplementação de leite fermentado (FM – *fermented milk*) com bagaço de malte de cevada (BSG) na sobrevivência de cepas potencialmente probióticas após a exposição a condições gastrointestinais (GI) simuladas *in vitro*. Adicionalmente, o efeito do FM probiótico na resposta inflamatória relacionada às funções do VDR foi avaliado por meio de um ensaio *in vivo*, empregando um modelo de colite induzida por DSS (dextrano sulfato de sódio). Este trabalho foi dividido em três etapas: I) Seleção de uma co-cultura composta por uma cepa probiótica e uma cepa *starter* para aplicação em FM probiótico; II) Avaliação da viabilidade dos microrganismos no FM ao longo do armazenamento e sua resistência às condições GI simuladas *in vitro*; III) Estudo do impacto do FM probiótico na expressão do VDR e em biomarcadores inflamatórios *in vivo*. Foram avaliadas 10 cepas probióticas (*Lactobacillus* (*L.*) *acidophilus* LA 5, *L. fermentum* PCC, *L. reuteri* RC-14, *L. paracasei* subsp. *paracasei* L. casei 431, *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, *L. rhamnosus* GR-1, *L. rhamnosus* LGG, *Bifidobacterium* (*B.*) *animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. longum* BB-46 e *B. longum* subsp. *infantis* BB-02) e 2 cepas *starter* *Streptococcus thermophilus* (TH-4 e STM-6). As culturas *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19 e *S. thermophilus* TH-4 apresentaram os resultados mais promissores nos ensaios de fermentabilidade do BSG e, portanto, foram selecionadas para a produção do FM probiótico. No total, foram avaliadas quatro formulações: FM1 (TH-4); FM2 (TH-4 + BSG); FM3 (TH-4 + F19); FM4 (TH-4 + F19 + BSG). Em relação a viabilidade dos microrganismos, todas as formulações apresentaram populações acima de 10 log UFC por porção diária de 200 mL de FM durante os 28 dias de armazenamento a 4 °C. Além disso, estimamos que cerca de 10 log UFC de TH-4 e 8 log UFC de F19 poderiam chegar viáveis ao colôn e possivelmente conferir benefícios à saúde. A co-cultura com F19 e/ou a adição de BSG aumentou a resistência do TH-4 ao estresse GI simulado *in vitro*, mostrando um potencial promissor do TH-4 como cultura *starter* e probiótica. Os experimentos com animais foram realizados com camundongos C57BL/7 *wild-type* (WT) e VDR *knockout*, em um modelo de colite induzida por DSS. PBS, leite ou FM foram administrados diariamente por 7 dias via gavagem oral e o tratamento com DSS (5% na água do bebedouro) foi iniciado 24 h após a primeira dose. O FM probiótico foi capaz de aumentar a expressão do VDR nos camundongos WT, enquanto reduziu o nível de IL-6. Por outro lado, em camundongos VDRKO, o FM probiótico agravou a inflamação, aumentando o nível dos marcadores inflamatórios IL-6 e lipocalina-2. Os resultados obtidos corroboram com a hipótese de que o efeito anti-inflamatório dos probióticos são regulados pelo VDR, contribuindo para o entendimento dos mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus benefícios à saúde, fornecendo ferramentas para uma recomendação de tratamento mais assertiva e segura.

**Palavras-chave:** BSG; inflamação; leite fermentado; probiótico; receptor nuclear; VDR; vitamina D.

## ABSTRACT

BATTISTINI, C. **Probiotic potential of fermented milk with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 and *Streptococcus thermophilus* TH-4: impact of BSG supplementation and influence on the vitamin D receptor *in vivo*.** 2020. 126 p. Thesis (PhD) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Several health benefits are related to probiotic consumption, such as improvement of the gut barrier function, production of short-chain fatty acids, reduction of pro-inflammatory response, gut microbiota modulation, among others. However, these effects depend on the strain employed, the matrix of administration, and host genetics, which are important factors that should be taken into consideration when prescribing or indicating probiotic treatments. Previous studies suggested that the anti-inflammatory potential of probiotics seemed to be regulated by the vitamin D receptor (VDR), which, in addition to vitamin D functions, is a transcription factor associated with autophagy, gut barrier function, and immune responses. Nevertheless, this is a new subject that has hardly been explored and, to the best of our knowledge, the influence of the food matrix on the VDR-related anti-inflammatory potential of probiotics has not been studied yet. Therefore, the present study evaluated the impact of the supplementation of probiotic fermented milk (FM) with brewer's spent grain (BSG) on the survival of potentially probiotic strains after the exposure to *in vitro*-simulated gastrointestinal (GI) conditions. In addition, the effect of probiotic FM on the VDR-related inflammatory response was studied, employing an *in vivo* DSS (dextran sulfate sodium) colitis model. This study was divided into three steps: I) Selection of a co-culture of one probiotic and one starter strains for the application in probiotic FM; II) Evaluation of the viability of the microorganisms in the FM throughout storage, and their resistance to *in vitro*-simulated GI conditions; III) Study of the impact of probiotic FM on the VDR expression and inflammation biomarkers *in vivo*. Ten probiotic strains (*Lactobacillus* (*L.*) *acidophilus* LA-5, *L. fermentum* PCC, *L. reuteri* RC-14, *L. paracasei* subsp. *paracasei* L. casei 431, *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, *L. rhamnosus* GR-1, *L. rhamnosus* LGG, *Bifidobacterium* (*B.*) *animalis* subsp. *lactis* BB-12, *B. longum* BB-46, and *B. longum* subsp. *infantis* BB-02) and two starter strains *Streptococcus thermophilus* (TH-4 and STM-6) were evaluated. The cultures *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19 and *S. thermophilus* TH-4 showed the most promising results regarding the fermentability of BSG. Thus, they were selected for the probiotic FM production. In total, four FM formulations were evaluated: FM1 (TH-4); FM2 (TH-4 + BSG); FM3 (TH-4 + F19); FM4 TH-4 + F19 + BSG). All formulations showed populations above 10 log CFU per daily portion of 200 mL of FM up to 28 days of storage at 4 °C. Moreover, we could estimate that around 10 log CFU of TH-4 and 8 log CFU of F19 may reach the colon viable, and possibly confer health benefits. The co-culture with F19 and/or the addition of BSG improved the resistance of TH-4 to *in vitro* GI stress, showing a promising potential of TH-4 to be employed both as a starter and as a probiotic culture. The animal experiments were performed with wild-type (WT) and VDR knockout C57BL/7 mice, employing a DSS colitis model. PBS, milk, or FM were administered daily for 7 days by oral gavage and the DSS treatment (5% in drinking water) started 24 h after the first dose. The probiotic FM promoted an increase in the VDR expression in WT mice, while reduced the IL-6 level. On the other hand, in VDRKO mice, the probiotic FM worsened the inflammatory response, increasing the levels of the inflammation markers IL-6 and fecal lipocalin-2. These results corroborate with the hypothesis that the anti-inflammatory effects of probiotics are regulated by the VDR, contributing to the elucidation of the mechanisms by which probiotics exert their health benefits, providing tools to a more assertive and safe treatment recommendation.

**Key words:** BSG; fermented milk; inflammation; nuclear receptor; probiotic; VDR; vitamin D.