



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

BACTERIS ESPORULATS: UN FUTUR PROMETEDOR COM A PROBIÒTICS EN LA INDUSTRIA ALIMENTÀRIA

Júlia Àlvaro Serrano

TREBALL FINAL DE GRAU de BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: **Albert Bordons de Porrata- Doria**

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Professor Emèrit URV

albert.bordons@urv.cat

Data de convocatòria; Setembre 2022

Jo, Júlia Àlvaro Serrano, amb DNI 47937815-L, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formació-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 20 d'agost de 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Júlia', with a stylized flourish at the end.

Índex

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Resum | 1 |
| 2. | Abstract | 1 |
| 3. | Introducció | 2 |
| 3.1. | Justificació del tema..... | 2 |
| 3.2. | Definició de probiòtic..... | 2 |
| 3.3. | Impacte dels probiòtics en la microbiota | 3 |
| 3.4. | Bacteris probiòtics | 4 |
| 3.5. | Bacteris formadors d'espores | 6 |
| 3.5.1. | Beneficis de l'ús d'esporejats en els tractaments tèrmics | 7 |
| 3.5.2. | Avaluació per identificar un bon model probiòtic | 8 |
| 3.5.3. | Espècies probiòtiques esporulades d'interès | 10 |
| 4. | Objectius..... | 11 |
| 5. | Mètodes..... | 11 |
| 6. | Resultats i discussió | 15 |
| 6.1. | <i>Bacillus</i> | 15 |
| 6.1.1. | Caracterització i seguretat..... | 15 |
| 6.1.2. | Resistència a processament tèrmic i emmagatzematge..... | 23 |
| 6.1.3. | Resistència gastrointestinal | 26 |
| 6.1.4. | Beneficis del consum de <i>Bacillus</i> | 28 |
| 6.1.5. | Productes probiòtics <i>Bacillus</i> existents en el mercat | 29 |
| 6.1.6. | Risc del consum de <i>Bacillus</i> | 31 |
| 6.2. | <i>Clostridia</i> (Clostridials)..... | 32 |
| 6.2.1. | Caracterització i seguretat..... | 32 |
| 6.2.2. | Resistència a processament tèrmic i emmagatzematge..... | 33 |
| 6.2.3. | Resistència gastrointestinal | 34 |
| 6.2.4. | Beneficis del consum de <i>Clostridia</i> | 35 |
| 6.2.5. | Productes probiòtics <i>Clostridia</i> existents en el mercat | 36 |
| 6.2.6. | Risc del consum de <i>Clostridia</i> | 37 |
| 7. | Perspectives de futur | 38 |
| 8. | Conclusions | 40 |
| 9. | Autoavaluació | 41 |
| 10. | Agraïments | 42 |
| 11. | Bibliografia | 43 |
| 12. | Fitxa de seguiment del tutor | 54 |

1. Resum

Aquest estudi avalua els avantatges que presenten les espècies bacterianes probiòtiques formadores d'endòspores, *Bacillus* i *Clostridials*, en la producció industrial d'aliments probiòtics. La viabilitat de les espècies *Bacillus* amb beneficis per la salut, sotmeses a altes temperatures en diferents processaments industrials i a condicions gastrointestinals, ha demostrat ser superior que les presentades per *Clostridia*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. D'entre totes les soques testades, destaca *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 en la majoria de processaments i matrius alimentàries. Els múltiples beneficis que presenten les espècies clostridials *Clostridium butyricum* i *Faecalibacterium prausnitzii* en la salut humana suggereixen el seu gran potencial probiòtic. La realització de futurs estudis de resistència és necessària per determinar el futur dels clostridials en la indústria alimentària.

Paraules clau: *probiòtic, bacteris formadors d'espores, Bacillus, Clostridials, Indústria alimentària.*

2. Abstract

This research evaluates the benefits presented by probiotic spore-former species, *Bacillus* and *Clostridials*, in the probiotic food industrial production. The viability of *Bacillus* species with health benefit, subjected to high temperatures in different industrial processes and to gastrointestinal conditions has proved to be higher than the ones observed in *Clostridia*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Among all the strains tested, *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 outstands in most food processing and matrices. The multiple benefits that the clostridials species *Clostridium butyricum* and *Faecalibacterium prausnitzii* show in human health suggest their huge probiotic potential. Conducting subsequent survival studies is necessary to determine the future of clostridials in the food industry.

Key words: *probiòtic, spore-forming bacteria, Bacillus, Clostridials, food industry.*

3. Introducció

3.1. Justificació del tema

En l'última dècada hi ha hagut un creixement exponencial del protagonisme dels probiòtics en la indústria alimentària, a banda de l'administració de probiòtics sols per al tractament d'algunes disfuncions digestives. Els beneficis que han demostrat proporcionar per la nostra salut, han derivat en què grans empreses proposin la producció d'aliments funcionals amb probiòtics als seus departaments d'Investigació i Desenvolupament, com he pogut comprovar treballant en el departament d'I+D de Delafruit S.L.U (La Selva del Camp, Tarragona). En la indústria alimentària els productes són sotmesos a tractaments tèrmics a altes temperatures per tal d'evitar contaminacions microbianes, posant en risc la viabilitat dels probiòtics. Els bacteris esporulats poden ser de gran rellevància per esquivar aquest problema, ja que en ambients extrems de temperatura, són capaços de resistir i mantenir la seva viabilitat en forma d'espores i germinar un cop es troben en condicions adients en el tracte gastrointestinal.

3.2. Definició de probiòtic

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) i l'Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura (FAO) defineixen de manera oficial els probiòtics com "microorganismes vius que, quan són administrats en quantitats adequades, proporcionen beneficis per la salut de l'hoste". Aquests beneficis venen donats per la intervenció directa dels probiòtics en l'alteració de la població de microorganismes que conformen la microbiota.

Un cop definit el terme probiòtic, s'ha d'especificar quines condicions ha de complir un producte per ser comercialitzat com a probiòtic. A Itàlia i Canadà han consensuat que s'accepta la venda de probiòtics, com a aliments o suplementos alimentaris, sempre que el producte contingui un nombre mínim de cèl·lules viables d' 1×10^9 CFU (Hill et al., 2014). Un altre requisit establert és que la soca probiòtica ha d'estar ben caracteritzada i s'ha de demostrar la seva seguretat pel consum humà i els beneficis que comporta per la salut.

3.3. Impacte dels probiòtics en la microbiota

La microbiota del tracte gastrointestinal és constituïda per la comunitat microbiana viva que creix al tracte digestiu. Aquests microorganismes poden ser bacteris tant aeròbics com anaeròbics, virus, fongs i protozous. És molt important que hi hagi una homeòstasi entre els constituents d'aquest ecosistema, ja que hi ha una relació entre els canvis en la microbiota i l'aparició de malalties, l'estat de la salut i alteracions en el sistema immunitari. La microbiota contribueix de manera directa en la nostra salut a nivell intestinal i sistemàtic incidint en el metabolisme, el sistema de defensa de l'hoste, prevenint el creixement de patògens al competir contra ells i assistint el sistema immunitari.

Administrar bacteris probiòtics, similars als bacteris beneficiosos de l'intestí, té un impacte en la transformació de la microbiota, passant des d'un estat de predominança patogènica cap a un ecosistema microbiòtic més beneficiós. Per tant, els probiòtics són un focus d'estudi per tractar de restablir la disbiosi intestinal, de forma que hi hagi de nou un balanç equilibrat en la microbiota. D'aquesta forma es poden prevenir malalties com el síndrome de l'intestí irritable, el càncer i la malaltia de Crohn, entre d'altres (Kim et al., 2019), i consegüentment millorar la salut de l'hoste en general.

Algunes espècies de bacteris compten amb diferents mecanismes d'acció que els permet ser considerades com a probiòtics, ja que aquests permeten el procés de probiosi i per tant, aporten les propietats que seran beneficioses per la salut de l'hoste. L'adhesió a la superfície de les mucoses del lumen intestinal i cèl·lules epitelials fa que els probiòtics representin una competència pels patògens a l'hora d'unir-se a receptors, d'obtenir nutrients o d'evitar la colonització (Howarth & Wang, 2013). A més poden millorar la funció de la mucosa del digestiu, protegint la integritat de la barrera intestinal. Aquesta defensa que proporcionen s'ha vist que pot ser originada per la capacitat de modificar l'expressió de les proteïnes *Tight Junction*, per tal d'atenuar un possible augment de la permeabilitat de l'intestí en una situació de disbiosi. Tenen la capacitat de regular la cinètica cel·lular modulant els processos de proliferació i apoptosi cel·lular. S'ha demostrat també que secreten factors probiòtics com bacteriocines, proteïnes que inhibeixen el creixement de soques properes o bacteris similars als organismes productors. Aquestes bacteriocines inhibeixen l'adhesió d'alguns patògens entèrics coneguts, interaccionen amb les seves membranes bacterianes comprometent la seva

viabilitat. La presència de bacteris probiòtics també promou les respostes immunes i adaptatives, no només a nivell intestinal. La mucosa intestinal no està aïllada de la resta de l'organisme i molt menys de la resta de teixits immunes ja que aquesta està irrigada per vasos sanguinis i limfàtics. Per tant, antigens probiòtics poden entrar a circulació sanguínia pel sistema limfàtic a través del ducte toràcic, fent que l'administració de probiòtics tingui un impacte en la immunitat sistèmica a nivell d'organisme.

3.4. Bacteris probiòtics

Generalment, els probiòtics amb més rellevància en el mercat actual són bacteris del gènere *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, que es troben de forma natural en la microbiota intestinal sana, sobretot *Bifidobacterium*, però també en el iogurt o s'afegeixen a altres llets fermentades. Tot i això, cada cop hi ha més estudis que es centren en demostrar l'eficiència d'altres espècies com a probiòtics amb característiques i beneficis terapèutics diferents (Taula 1).

Entre la gran quantitat de probiòtics que hi ha en ús o en estudi avui en dia, trobem els bacteris formadors d'espores, són un exemple els del gènere *Bacillus* i altres de la classe *Clostridia*, coneguts com a Clostridials.

Taula 1. Espècies bacterianes amb capacitat probiòtica.

| Espècie | Mecanisme probiòtic | Afecció | Referència |
|-------------------------------------|--|--|---|
| Bacteris no esporulats | | | |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Transaldoleses de superfície actuen en l'adhesió i agregació de mucina, com a factors de colonització. | Dispepsia funcional. | Gomi et al. 2015 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Protecció de queratinòcits per exclusió competitiva pels llocs d'unió del patògen. | Mort cel·lular de queratinòcits per infecció de <i>S. aureus</i> . | Prince et al. 2012 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | Protecció de queratinòcits per exclusió competitiva pels llocs d'unió del patògen. | Mort cel·lular de queratinòcits per infecció de <i>S. aureus</i> . Diarrea associada a antibiòtics. | Prince et al. 2012 Szajewska et al. 2015 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Inhibició del creixement de patògens bacterians per producció d'àcid làctic, àcid acètic, peròxid d'hidrogen i bacteriocines. Exclusió competitiva per adhesió a mucosa. | Diarrea associada a antibiòtics. Malaltia inflammatòria intestinal. Malaltia de Crohn. | María Remes Troche et al. 2020 |
| <i>Akkermansia muciniphilla</i> | Producció de metabòlits i augment de resposta immunitària. Increment de "tight junctions". Reducció citoquines inflammatòries | Colitis crònica. Escleròsis amiotròfica lateral. Malalties hepàtica alcohòlica. | Cheng et al. 2021 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Producció d'àcid c-aminobutíric (GABA). Inhibeix adhesió de patògens com <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>E.coli</i> . | Càncer. Infeccions bacterianes. | Lee et al. 2019 |
| Bacteris esporulats | | | |
| <i>Bacillus coagulans</i> | Modula el microbioma intestinal: augmenta <i>Actinobacteria</i> i <i>Firmicutes</i> , disminueix <i>Bacteroides</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Streptophyta</i> i <i>Verrucomicrobia</i> . | Síndrome de l'intestí irritable. Diarrea associada a antibiòtics. Hipercolesterolemia. | Gupta et al. 2021 |
| <i>Bacillus clausii</i> | Producció de proteasa M que neutralitza la toxina de <i>C.difficile</i> . | Diarrea aguda per infecció de <i>Clostridium difficile</i> . | Mills et al. 2018 |
| <i>Clostridium butyricum</i> | Restaura l'homeostasi immunitària promovent respostes Treg. Activació de la via de la proteïna quinasa B. | Diarrea associada a antibiòtics. Obesitat i diabetes tipus II. Càncer colorrectal i de bufeta Diabetes tipus I. Malaltia hepàtica. | Stoeva et al. 2021 |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | Producció d'energia per als colonòcits i metabòlits antiinflamatoris que contribueixen en la salut intestinal. | Malaltia inflammatòria intestinal. Càncer colorrectal. | Ferreira-Halder et al. 2017 |

3.5. Bacteris formadors d'espores

Els bacteris formadors d'espores són aquells que tenen la capacitat de formar endòspores. Dintre d'aquest grup els grans protagonistes són les classes *Bacilli* i *Clostridia*, les quals formen part del filum Firmicutes, bacteris grampositius de baix contingut G+C. Els bacteris esporulats poden presentar formes morfològicament diferents. Segons les condicions ambientals externes, tenen la capacitat de formar endòspores (Fig. 1) o de quedar-se en forma de cèl·lula vegetativa.

L'esporulació comença amb l'aparició d'una mena d'invaginació que provoca la formació d'un esporangi (Khanna et al., 2020), dividint de forma asimètrica la cèl·lula bacteriana. Aquest esporangi consta de dues cèl·lules de diferents mides, la petita s'anomena forespora i la més gran és la cèl·lula mare. El següent pas consisteix en què la cèl·lula mare embolcalla la forespora, tancant la forespora dintre del citoplasma de la cèl·lula mare. Un cop es produeix aquesta situació, l'espore comença el procés de maduració i per tant, la formació de les seves capes.

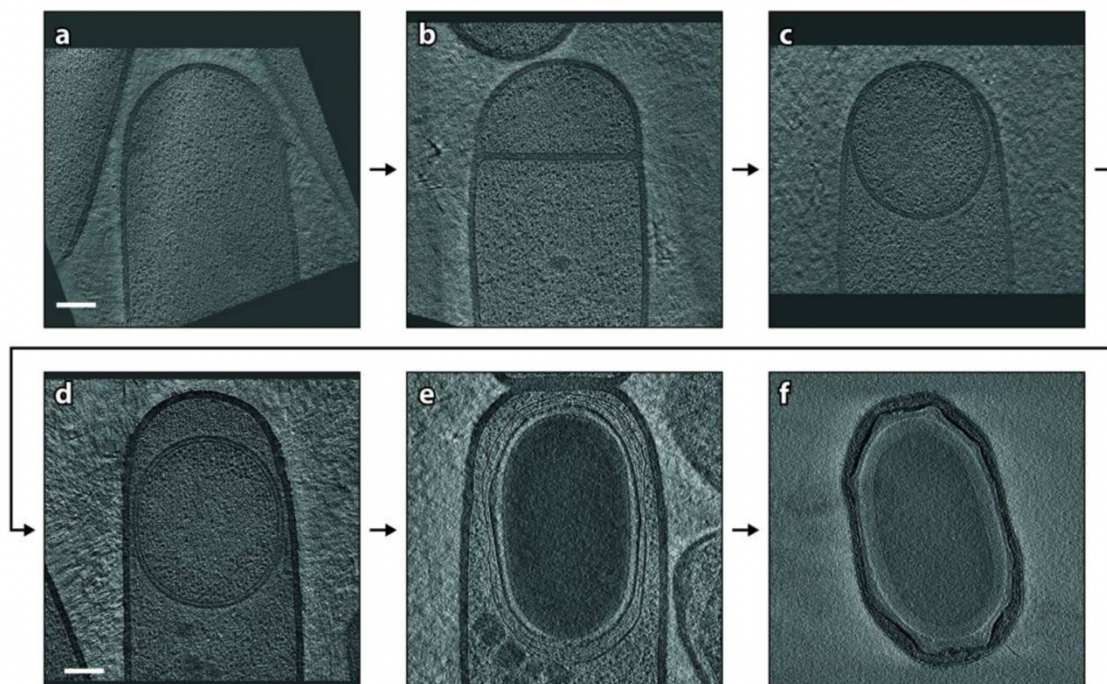


Figura 1. Procés de formació de l'endòspora de *B. subtilis* observat per tomografia crio-electrònica. (a) Esporangi amb un septe polar naixent. (b,c) Esporangis amb septes plans i engolidors. (d) Esporangi amb la forespora totalment envoltada. (e) Esporangi amb pelatge i escorça en desenvolupament. (f) Espore madura. Font: Il·lustració de Khanna et al. (2020)

L'esporulació és un mecanisme que utilitzen els bacteris quan es troben en condicions ambientals desfavorables com temperatures i pH extrems, falta de nutrients, radiacions, dessecació entre d'altres. L'espore bacteriana gràcies a les capes protectores que forma (Khanna et al., 2020) és la cèl·lula més resistent que hi ha en la natura, té la capacitat de mantenir la viabilitat del bacteri en condicions ambientals de temperatura, osmolaritat, dessecació, etc. (Gupta & Maity, 2021), en les que la cèl·lula vegetativa no seria capaç. Aquesta característica fisiològica pot arribar a proporcionar certes avantatges per la indústria alimentària.

3.5.1. Beneficis de l'ús d'esporulats en els tractament tèrmics

Durant la producció d'un producte alimentari, és comú la utilització de tècniques com la pasteurització. La pasteurització és un tractament tèrmic suau, on es sotmet al producte alimentari a temperatures inferiors als 100°C, generalment durant uns minuts. La temperatura i durada del tractament pot variar depenent del pH i de la vida útil que es vulgui aconseguir per aquell producte. Es requeriran menors temperatures com més àcid sigui el pH, degut a que un ambient àcid ja limita molt el creixement bacterià. D'altra banda, es requerirà un augment de la temperatura per augmentar la vida útil del producte, potenciant així l'estabilitat del producte a temperatura ambient. La pasteurització a 90°C aconsegueix preservar la majoria del perfil nutricional i paràmetres organolèptics de l'aliment segons el procediment industrial utilitzat en l'empresa Delafruit S.L.U (La Selva del Camp, Tarragona). Aquest tipus de processament es realitza amb la finalitat principal d'eliminar les possibles contaminacions per patògens i proporcionar garantia de seguretat microbiològica. Bacteris i altres microorganismes no solen resistir a les condicions definides anteriorment. Encara que els bacteris probiòtics estiguin presents en el producte final, la seva viabilitat disminueix significativament després de passar per tots els processos de producció, a excepció dels bacteris formadors d'espores. Els gèneres no esporulats com *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mostren una baixa taxa de supervivència en el processament tèrmic i en el tracte gastrointestinal i, són inestables a temperatura ambient durant l'emmagatzematge i la distribució (Majeed et al., 2021). Per aquests motius, s'introdueixen en aquesta indústria els bacteris formadors d'espores. L'endòspora que formen els bacteris esporulats els confereix una alta resistència i estabilitat a l'estrès causat pel xoc tèrmic, durant la producció industrial i els processos d'emmagatzematge del producte final. A més, dona una major protecció front les condicions de pH, els àcids

biliars i enzims digestius (Shinde et al., 2019) que han de superar els probiòtics a través del tracte gastrointestinal, augmentant-ne així la seva viabilitat.

Per tant, les propietats que els confereix l'endòspora als bacteris esporulats i els beneficis que s'ha demostrat que poden proporcionar a la salut humana (Taula 1), fan que aquest grup bacterià pugui arribar a ser el futur per la indústria alimentària dels probiòtics. Ara bé, dintre d'aquest grup no es sap ben bé, quina espècie és la candidata més prometedora a tenir en compte en la producció d'un producte probiòtic.

3.5.2. Avaluació per identificar un bon model probiòtic

Com ja s'ha mencionat anteriorment, un bacteri probiòtic ha de complir una sèrie de requisits, en base a la guia publicada per la FAO/FDA (World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006) per l'avaluació de microorganismes per al seu ús com a probiòtics en aliments, de forma que aquest pugui ser llençat al mercat com a producte segur i eficient (Taula 2).

El primer pas és que la soca probiòtica pugui ser aïllada de la seva font d'origen i estigui ben caracteritzada. Aquesta caracterització a nivell fenotípic i genotípic es realitza mitjançant la cerca en col·leccions de cultius oficials i a través de mètodes de seqüenciació, entre els quals el més comunament utilitzat és la seqüenciació 16S rRNA. A continuació és necessària l'avaluació de seguretat de la soca probiòtica per demostrar la seguretat per al consum animal i humà segons a la indústria alimentària a la que vagi dirigit el producte final. Al destinar la comercialització del probiòtic cap a la indústria alimentària és necessari el següent pas. Aquest pas consisteix en la realització d'estudis de resistència de la soca probiòtica al processament tèrmic, a diferents temperatures a les quals serà sotmès el bacteri en concret i dintre de varies matrius alimentàries, per tant, a diferents pH. A més, s'ha de tenir en compte que el producte final passarà per un període d'emmagatzematge i transport abans de ser comercialitzat, processos que poden afectar la viabilitat del probiòtic. Per tant, és essencial realitzar estudis de supervivència, físicoquímics i sensorials tenint en compte les condicions ambientals variables per les que pot passar el producte final. El tercer pas és l'anàlisi de la supervivència del probiòtic i la germinació de les endòspores al tracte gastrointestinal. Per dur a terme aquests estudis de tolerància del probiòtic, a pH extrems d'àcid i bàsic que es troben al llarg del tracte, es fa amb models *in vitro* que imiten aquestes condicions. També es poden dur a terme en fases

preclíniques, analitzant mostres de femta de pacients als qual se'ls ha administrat el probiòtic en concret.

Un cop es demostra la resistència del probiòtic tant al processament tèrmic com a les condicions gàstriques i intestinals i la seva seguretat és necessari que es determini si realment la seva administració comporta un benefici a nivell d'organisme, però també és important que s'indiquin quins riscos pot comportar el seu consum. Finalment, és interessant comprovar l'existència de productes comercialitzats que ja continguin la soca probiòtica d'estudi.

Taula 2. Classificació d'algunes metodologies utilitzades per analitzar cadascun dels factors essencials per l'avaluació d'una soca amb propietats potencialment probiòtiques.

| Factors essencials | Tipus d'anàlisi | Referències |
|---|---|---|
| <i>Caracterització i seguretat</i> | Seqüenciació 16S rRNA i rMLST, entre d'altres. Presència en col·leccions de cultius. Estudis in vitro d'absència de patogenicitat, factors de virulència, estabilitat genètica, activitat antimicrobiana, citotoxicitat, producció de metabòlits no desitjats, resistència a antibiòtics, proves preclíniques en models animals i humans. | Lefevre et al. 2017 Brodmann et al. (2017) Spears et al. (2021) |
| <i>Resistència al processament tèrmic</i> | Proves de viabilitat segons la matriu alimentària (variables de temperatura i pH) | Mokhtari et al. (2019) Soares et al. (2019) |
| <i>Viabilitat del probiòtic en el producte</i> | Proves de tolerància a condicions d'emmagatzematge i transport | Majeed et al. (2021) Soares et al. (2019) |
| <i>Supervivència al tracte gastrointestinal</i> | Tolerància de les condicions de pH àcid, concentració biliar i germinació a l'intestí | Majeed et al. (2021) Soares et al. (2019) Shinde et al. (2019) |
| <i>Beneficis del consum</i> | Eficàcia demostrada en afeccions diverses | Kim et al. (2019) |
| <i>Risques que comporta el seu consum</i> | Transferència de gens horitzontal, bacterièmies. | (Isa et al., 2016) |
| <i>Productes comercials</i> | Eficàcia i seguretat d'una soca concreta ja comercialitzada | U.S. Food and Drug Administration, 2015 |

3.5.3. Espècies probiòtiques esporulades d'interès

Gènere *Bacillus*

Bacillus es caracteritza per ser un bacteri formador d'espores, grampositiu i generalment creix en condicions aeròbiques, encara que algunes espècies poden ser aeròbiques facultatives (Raddadi et al., 1996). Han estat estudiats àmpliament com a probiòtics tant per l'ús animal com en humans i s'han utilitzat durant anys en processos de fabricació d'aliments. Compten amb una llarga història d'ús segur i l'absència de patogenicitat de la majoria d'espècies de *Bacillus* ha estat demostrada en múltiples estudis (Endres et al., 2009; Lakshmi et al., 2017; Lefevre et al., 2017; Rychen et al., 2017; Spears et al., 2021). Per tant, representen un especial interès en les indústries biotecnològiques, alimentàries i de la salut. D'entre totes les espècies de *Bacillus*, *B. coagulans* és molt estudiat clínicament i industrialment, a més ha mostrat un ventall de beneficis per la salut (Majeed et al., 2019). D'altra banda, l'espècie *Bacillus subtilis* també és una soca àmpliament estudiada a nivell biotecnològic i presenta un llarg historial de consum segur com a suplement i ingredient alimentari (Lefevre et al., 2017).

Classe *Clostridia* (Clostridials)

Bibliogràficament es coneix que des del naixement, la microbiota humana va sent progressivament colonitzada per Clostridials (Cassir et al., 2016). El grup *Clostridia* són bacteris formadors d'espores, grampositius i estrictament anaeròbics. L'any 2010 es va detectar *Clostridium butyricum* en un 44% de mostres fecals recollides de 76 neonats (Ferraris et al., 2010). D'altra banda, *Faecalibacterium prausnitzii* representa un 5 % de tota la microbiota fecal en adults sans (Martín et al., 2017). Per tant, els Clostridials són residents naturals de la nostra microbiota i al ser formadors d'espores poden tenir una llarga vida útil i mantenir la seva viabilitat front processos industrials, és per això que són un focus d'interès en l'àmbit dels probiòtics. Els últims 5 anys, espècies d'aquest grup com *C. butyricum* i *Faecalibacterium prausnitzii* han estat associades a l'aportació de múltiples beneficis per la salut humana (Ferreira-Halder et al., 2017a; Stoeva et al., 2021a).

4. Objectius

Objectiu principal

En aquesta revisió bibliogràfica es pretén ratificar les avantatges que presenten els bacteris formadors d'espores per la indústria alimentària dels probiòtics. Per realitzar aquesta tasca es descriuran els bacteris esporulats més rellevants com a possibles probiòtics.

Objectius secundaris

Entre les espècies seleccionades es desenvoluparà un estudi comparatiu per discutir quina d'aquestes pot presentar un major benefici per la salut i pel processament de l'aliment. A més a més, es plantejaran nous enfocaments o possibles estudis de futur en el camp dels aliments probiòtics. Es revisaran alternatives a les presentades en l'estudi, que permetin superar les limitacions d'aquests bacteris beneficiosos durant el processament del producte.

5. Mètodes

Criteris de cerca

La metodologia que ha seguit aquest estudi ha estat la revisió bibliogràfica a través de les bases de dades *PubMed*, *Science Direct* i *ELSEVIER*, per respondre als objectius establerts. També he realitzat cerques sobre les diferents soques probiòtiques en les pàgines web d'organismes com la Food and Drug Administration, U.S. (FDA) i la European Food Safety Authority (EFSA). Aquesta recerca s'ha dut a terme entre els mesos de març i juliol de 2022, l'últim article ha estat seleccionat el 15 de juliol 2022. S'ha fet ús de les eines que ofereixen aquestes plataformes, com l'*Advanced Search* i operadors booleans com "AND" i "OR". Les combinacions de paraules claus realitzades en diferents cerques i incloses per a tots els camps han estat "(*spore-forming bacteria* OR *esporulated bacteria*) AND *probiotics*", "*safety assesstment probiotics*", "*Bacillus* OR *Clostridium* OR *Faecalibacterium prausnitzii probiotic*", "*thermostable probiotic*", "(*pasteurized* OR *pasteurization*) AND *probiotics*". Realitzant la primera cerca amb les paraules claus "(*spore-forming bacteria* OR *esporulated bacteria*) AND *probiotics*", la major part d'estudis publicats parlaven sobre les espècies de *Bacillus* i l'ordre dels

Clostridials. És per això, que la revisió present es focalitza en aquests grups bacterians. A més a més, al ser un camp tant ampli ha estat necessari fer cerques més concretes per cada soca bacteriana escollida amb paraules clau com “*safety assessment*” i “*gastrointestinal resistance*”.

Criteris d’inclusió i d’exclusió

Un dels criteris d’inclusió per realitzar l’estudi comparatiu de les espècies seleccionades ha estat que en l’abstract o paraules clau es faci menció dels conceptes “probiòtic/s”, “bacteris esporulats” concretament del gènere *Bacillus* i de la classe Clostridia, o de la “microbiota intestinal”. Aquests articles han d’estar publicats en posterioritat a l’any 2012, per tenir en compte les publicacions de tota una dècada. S’ha donat preferència a estudis que facin referència a la indústria dels aliments. L’idioma d’inclusió escollit és l’anglès. Es seleccionen aquells articles que siguin *Free full text* i/o els disponibles en línia a través del Servei d’Accés a la Biblioteca Digital (SABiDi), que proporciona el Centre de Recursos per a l’Aprentatge i la Investigació (CRAI) de la URV. Han quedat exclosos aquells articles que es centrin en espècies no seleccionades per fer l’estudi o espècies no formadores d’espores.

Selecció d’estudis

Amb les diferents combinacions de paraules claus utilitzades per realitzar les cerques mencionades anteriorment, es van seleccionar 35 articles (Taula 3) per revisar els avantatges que presenten els bacteris esporulats i realitzar l’estudi comparatiu entre les espècies escollides.

La consulta de la resta de bibliografia que s’inclou en aquest estudi, que no pertany a la selecció d’articles que segueix els criteris d’inclusió i exclusió per realitzar la comparativa de les diferents espècies de bacteris esporulats, ha estat necessària per poder introduir i comprendre el tema de recerca.

Taula 3. Articles escollits segons el tipus d'avaluació realitzada. Alguns dels articles classificats en caracterització i seguretat, també han estat utilitzats en altres tipus d'avaluacions durant la revisió bibliogràfica.

| Tipus d'estudi | Espècie i soca bacteriana | Referència |
|-----------------------------------|--|--|
| Caracterització i seguretat | <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086 | (Salveti et al., 2016) (Kumar et al., 2020) |
| | <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 | (Majeed, Nagabhushanam, Natarajan, Sivakumar, Eshuis-de Rooter, et al., 2016) (Majeed et al., 2018) |
| | <i>B. subtilis</i> MB40 | (Spears et al., 2021) |
| | <i>B. subtilis</i> DE111 | (Paytuví-Gallart et al., 2020) (Labellarte et al., 2019) |
| | <i>B. subtilis</i> CU1 | (Lefevre et al., 2017) |
| | <i>B. subtilis</i> PB6 | (Rychen et al., 2017) |
| | <i>C. butyricum</i> UBCB70 | (Sulthana et al., 2019) |
| | <i>C. butyricum</i> MIYAIRI 588 | (Isa et al., 2016) |
| | <i>F. prausnitzii</i> | (Martín et al., 2017) (Hu et al., 2022a) |
| | <i>F. prausnitzii</i> DSM 17677 | (Machado et al., 2022) |
| Resistència a processament tèrmic | <i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086 | (Almada-Érix et al., 2021) |
| | <i>Bacillus coagulans</i> MTCC 5856 | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> Bn1 | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> PB6 | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> PXN21 | |
| | <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086 | (Soares et al., 2019) |
| | <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 | |
| <i>B. subtilis</i> PB6 | | |
| <i>B. subtilis</i> PXN21 | | |

| | | |
|------------------|----------------------------------|--|
| | <i>F. prausnitzii</i> | (Ferreira-Halder et al., 2017b) (Khan et al., 2014) (Bircher et al., 2018) |
| | <i>C. butyricum</i> NN-2 | (Li et al., 2020) |
| | <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086 | (Keller et al., 2019) |
| | <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 | (Majeed et al., 2021) (Shinde et al., 2019) |
| Resistència | <i>B. subtilis</i> DE111 | (Colom et al., 2021) |
| gastrointestinal | <i>B. subtilis</i> CU1 | (Lefevre et al., 2015) |
| | <i>F. prausnitzii</i> | (Foditsch et al., 2014) (Hu et al., 2022b) |
| | <i>C. butyricum</i> | (Liang et al., 2021) |
| Beneficis del | <i>B. subtilis</i> MB40 | (Penet et al., 2021) |
| consum | <i>C. butyricum</i> MIYAIRI 588 | (Ariyoshi et al., 2022) (Stoeva et al., 2021b) (Dürre, 2014) |
| | <i>F. prausnitzii</i> | (Leylabadlo et al., 2020) (Foditsch et al., 2015) |
| Riscs del consum | <i>B. clausii</i> | (García et al., 2021) |

6. Resultats i discussió

6.1. *Bacillus*

6.1.1. Caracterització i seguretat

L'avaluació de seguretat d'un probiòtic pel seu ús com a suplement alimentari ha d'incloure la seva correcta identificació i l'estudi de resistència a antibiòtics, toxicitat i estabilitat genòmica mitjançant mètodes fenotípics i genotípics, seguint els requisits de la European Food Safety Authority (EFSA).

Per tal de dur a terme aquest anàlisi comparatiu, es reflecteixen les avaluacions de seguretat dutes a terme per les soques *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 (Salveti et al., 2016), *B. coagulans* MTCC 5856 (Majeed, Nagabhushanam, Natarajan, Sivakumar, Eshuis-de Ruyter, et al., 2016), *Bacillus subtilis* MB40 (Spears et al., 2021), *Bacillus subtilis* DE111 (Paytuví-Gallart et al., 2020) i *Bacillus subtilis* CU1 (Lefevre et al., 2017).

Identificació taxonòmica de les soques probiòtiques de *Bacillus*

Bacillus coagulans GBI-30, 6086 és una soca bacteriana patentada per Ganeden Biotech, Inc. (Mayfield Heights, OH) depositada en la col·lecció *American Type Culture Collection* sota el nom de *B. coagulans* PTA-6086. Aquesta soca probiòtica està reconeguda com a *generally recognized as safe* (GRAS) per la FDA (U.S. Food & Drug Administration, 2016) i inclosa en el llistat d'organismes *Qualified Presumption as Safety* (QPS) de la EFSA (Koutsoumanis et al., 2022). Salvetti et al. (2016) seqüencien el gen complet 16S rRNA de *B. coagulans* GBI-30,6086. L'alineament amb *B. coagulans* DSM i altres gèneres *Bacillus* representatius mostren un 99,92% d'identitat, confirmant que *B. coagulans* GBI-30, 6086 correspon a l'espècie *Bacillus coagulans*. La tipificació de seqüències ribosòmiques multilocus de 49 seqüències de gens rps (S ribosomal proteins), identifica la soca per a tots els nivells taxonòmics confirmant els mateixos resultats.

Bacillus coagulans MTCC 5856, és una soca probiòtica patentada per Sabinsa Corporation/Sami Labs Limited, depositada la col·lecció de cultius Microbial Type Culture Collection i Gene Bank. Aquesta soca probiòtica ha estat caracteritzada com a GRAS (U.S Food and Drug Administration, 2015). Majeed et al. (2016) realitzen estudis fisiològics i de perfil bioquímic, seqüenciació 16S rRNA, tipificació de seqüències multilocus i la tècnica de *GTG 5'' and BOX PCR fingerprinting* per identificar la soca

bacteriana *Bacillus coagulans* MTCC 5856, revelant que correspon a l'espècie *Bacillus coagulans*. La U.S Food and Drug Administration (2015) indica un 99,5% d'identitat amb la soca *Bacillus coagulans* ATTC 7050. A més a més, Majeed et al. (2016) demostren que *B. coagulans* MTCC 5856 manté la seva identitat almenys durant els tres anys (2018-2010) de producció de lots industrials de la mateixa soca.

Bacillus subtilis MB40 és una soca probiòtica depositada en la American Type Culture Collection. Gràcies a l'avaluació de seguretat realitzada per BIO-CAT Microbials i altres laboratoris, es reconeix aquesta soca com a GRAS (U.S. Food & Drug Administration, 2020). En l'avaluació publicada per la FDA, es realitza la seqüenciació del genoma sencer de *B. subtilis* MB40 i l'anàlisi de parells de bases d'ADN ribosòmic 16S. Els resultats confirmen que la soca *B. subtilis* MB40 s'identifica amb l'espècie *B. subtilis* en un 99% d'identitat. Fenotípicament s'analitza el perfil de àcids grassos d'aquesta soca, donant validesa als resultats anteriors.

Altres estudis han indicat la soca probiòtica *Bacillus subtilis* DE111 per a l'ús com a suplement alimentari en nens (Paytuví-Gallart et al., 2020). *B. subtilis* DE111 es troba descrit en la col·lecció de soques de cultiu de la USDA National Center for Agricultural Utilization Research i s'ha notificat com a microorganisme GRAS (U.S. Food & Drug Administration, 2018). Amb la seqüenciació 16S rRNA i als anàlisis bioinformàtics duts a terme per Cornell University (Ithaca NY, USA), Microbe Inotech Laboratoies, Inc. i Deerland Probiotics and Enzymes (Kennesaw GA, USA), s'obté un 99% d'identitat entre aquesta soca i les espècies pertanyents a *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum*. La FDA confirma una identitat del 95% o superior amb *B. subtilis* CUI i amb la soca present de forma natural en l'aliment japonès *natto*. També s'han realitzat estudis d'identificació taxonòmica de soques com *Bacillus subtilis* CUI per al consum humà com a probiòtic (Lefevre et al., 2017). S'obté una alta homologia amb *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* i *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. La seqüenciació del gen *gyr B* confirma que *B. subtilis* CUI es caracteritza com a *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Lefevre et al. (2017) per PCR d'ADN polimòrfic amplificat aleatori (RAPD) i electroforesis en gel de camp pulsat (PFGE) mostren que *B. subtilis* CUI és diferent a 13 soques *Bacillus* testades i que els dos lots de *B. subtilis* CUI analitzats són idèntics genotípicament.

Cal mencionar que a part de les soques amb potencial probiòtic mencionades anteriorment, n'hi ha altres, les quals són més estudiades per l'ús com a suplement

alimentaris, però en animals. *Bacillus subtilis* PB6 està inclòs com a QPS per la EFSA per al seu ús com a suplement alimentari en animals. *B. subtilis* PB6 ha demostrat la seva eficàcia i seguretat, evidenciant l'absència de toxigenicitat i resistència a antibiòtics tant humans com animals (Rychen et al., 2017). Per tant, el seu ús podria ser derivat pel consum en humans, ara bé seria necessària una avaluació de seguretat més exhaustiva i la seva aprovació per a aquest ús per organismes com la FDA o la EFSA.

Resistència a antibiòtics

La resistència a antibiòtics s'avalua mitjançant tests fenotípics com la determinació de la concentració mínima inhibidora (CMI), que s'entén com la mínima concentració d'antibiòtic que inhibeix el creixement bacterià. Aquests valors són comparats amb els valors de tall de CMI establerts per la EFSA (2012). També es pot avaluar mitjançant mètodes de difusió amb discs impregnats d'antibiòtic com el mètode establert pel Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

L'anàlisi fenotípic realitzat per Salvetti et al. (2016) determina que *B. coagulans* GBI-30, 6086 és resistent només als aminoglicòsids kanamicina i estreptomina, 2 dels 15 antibiòtics amb els que s'ha testat. Els resultats de l'anàlisi genotípic de *B. coagulans* GBI-30, 6086 en la cerca de gens de resistència a aminoglicòsids mostren que aquesta soca presenta gens associats a la resistència a diferents antibiòtics. Tot i això, s'assumeix que aquests gens no són funcionals o no s'expressen lo suficient, ja que en l'anàlisi fenotípic no s'ha demostrat la resistència de *B. coagulans* GBI-30 a aquests antibiòtics. També s'han identificat els gens IE89_07115 i IE89_03650 associats a la resistència a aminoglicòsids, però s'ha demostrat que els elements relacionats amb aquesta resistència no són fàcilment transferibles a altres bacteris. Per tant, aquests resultats confirmen que la soca *B. coagulans* GBI-30, 6086 és segura en relació a la resistència a antibiòtics.

Majeed et al. (2016) determinen els valors de CMI de la soca *B. coagulans* MTCC 5856 per diferents antibiòtics (clindamicina, kanamicina, ampicil·lina, estreptomina, vancomicina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina i cloramfenicol). Tots els valors es troben entre un rang de 0,0078-1,01 µg/mL. *B. coagulans* MTCC 5856 mostra susceptibilitat per tots aquests fàrmacs segons els rangs que estableix la EFSA ("Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary

Importance,” 2012). Un anàlisi genotípic (U.S Food and Drug Administration, 2015) confirma l'absència de gens de resistència en la soca *B. coagulans* MTCC 5856.

Spears et al. (2021) analitzen la resistència a antibiòtics de la soca *B. subtilis* MB40 mitjançant dos mètodes fenotípics: la difusió amb discs CLSI, basat en la mesura del diàmetre de les zones d'inhibició i la mesura de CMI. La tècnica CLSI determina que MB40 és sensible a 18 dels 21 antibiòtics testats. Aquesta soca presenta resistència a la fosfomicina. D'altra banda a través de l'anàlisi de CMI, confirmen que MB40 també és resistent a l'estreptomocina, potencialment a l'ampicil·lina i susceptible a la resta d'antibiòtics.

Segons informa la FDA (2018), el genoma seqüenciat de la soca *B. subtilis* DE111 s'analitza per detectar la presència de gens de resistència a antibiòtics i també es realitzen proves de CMI. Cap gen de resistència a antibiòtics és detectat en el genoma de *B. subtilis* DE111 i aquesta soca mostra susceptibilitat pels antibiòtics comuns.

Lefevre et al. (2017) dintre de l'avaluació de seguretat de la soca *B. subtilis* CU1, inclouen proves de resistència a vuit antibiòtics (cloramfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, estreptomocina, tetraciclina i vancomicina), comparant els valors de CMI obtinguts per aquesta soca amb els valors de tall publicats per la EFSA, amb *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 com a control de referència. Els resultats mostren que *B. subtilis* CU1 és susceptible a tots els antibiòtics anteriors.

Toxicitat (amines biògenes, factors de virulència, enterotoxines, lipopèptids)

La toxicitat també es pot mesurar de forma fenotípica i genotípicament avaluant la capacitat de producció de metabòlits com amines biògenes, enterotoxines i lipopèptids.

Salveti et al. (2016) cultiva *B. coagulans* GBI-30, 6086 en un medi que conté aminoàcids precursors d'amines biògenes, demostrant l'absència de producció d'amines biògenes tiramina, histamina, putrescina, cadaverina, feniletilamina, spermina i spermidina. Genotípicament s'observa l'absència dels gens associats a la producció d'amines biògenes excepte els que estan relacionats en les rutes metabòliques de l'arginina a putrescina i de putrescina a spermidina. Com en l'anàlisi fenotípic no s'observa la producció d'amines biògenes s'assumeix que aquests gens no són funcionals o no s'expressen als nivells suficients per detectar quantitats significants d'amines biògenes.

En *B. coagulans* GBI-30, 6086 es detecta la presència de certs factors de virulència putatius, però aquests no es consideren nocius. Aquesta absència de risc es deu a que la majoria d'aquests, estan associats a mecanismes de defensa, d'esporulació i a estructures extracel·lulars essencials per l'adhesió del probiòtic a les cèl·lules de l'hoste i per la seva supervivència en el tracte gastrointestinal. La soca *B. coagulans* GBI-30, 6086 no conté cap gen relacionat amb enterotoxines ni amb la producció de pèptids nocius. Tampoc es troben gens que codifiquen per surfactants i lipopèptids cíclics, presents en gairebé totes les soques hemolítiques de *Bacillus*. Aquesta soca de *B. coagulans* no presenta els gens que codifiquen per l'hemolisina BL, enterotoxina relacionada amb desordres gastrointestinals.

Majeed et al. (2016) realitzen un estudi de toxicitat per la soca *B. coagulans* MTCC 5856 tant a nivell fenotípic com genotípic, comparant els resultats amb *Bacillus cereus* ATCC 14579. A nivell fenotípic, cultiven in-vitro les dues soques probiòtiques en diferents cultius de cèl·lules Vero, línies cel·lulars ben establertes que es solen utilitzar en proves de citotoxicitat (Lefevre et al., 2017). Microscòpicament s'observa que el cultiu amb *B. cereus* ATCC 14579 redueix la viabilitat cel·lular un 23%, a diferència de *B. coagulans* MTCC 5856 on la línia cel·lular no presenta cap alteració. Aquests resultats es confirmen genotípicament, per PCR s'observa que *B. coagulans* MTCC 5856 no presenta cap dels gens associats a la producció d'enterotoxines presents en *B. cereus* ATCC 14579.

Pel que fa a l'espècie *Bacillus subtilis* MB40, Spears et al. (2021) analitzen via nBLAST i BLASTx la presència de gens similars als que codifiquen per toxines en l'espècie *B. cereus*. No es troben seqüències en MB40 associades a la producció de toxines. Una PCR in silico amb primers específics per a les seqüències nucleotídiques codificants de toxines confirmen els resultats. També realitzen estudis fenotípics in vitro per determinar el creixement de dues toxines comuns en l'espècie *Bacillus*, la *Bacillus diarrheal enterotoxin* (BDE) i la *B. cereus enterotoxin* (Bce T). Ninguna de les dues toxines són detectades sota condicions típiques de creixement de *B. subtilis* MB40.

La FDA (2018) indica que *B. subtilis* DE111 va ser avaluat mitjançant PCR amb primers específics per les toxines Hemolisina B, Citotoxina K i les Enterotoxines no hemolítiques A, B i C. La soca *B. subtilis* DE111 va mostrar l'absència dels gens productors d'aquestes toxines comuns en algunes espècies patogèniques *Bacillus* com *B. cereus*.

Lefevre et al. (2017) avaluen in vitro l'activitat toxigènica de *B. subtilis* CU1. Els resultats els comparen amb els controls positius *Bacillus cereus* 14579 i SDS per l'activitat hemolítica, *B. subtilis* 13 GR per la producció de surfactants i *Clostridium difficile* CD VPI i *B. cereus* 14569 per avaluar la citotoxicitat. Els resultats indiquen que *B. subtilis* CU1 no indueix l'hemòlisi d'eritròcits, en canvi *B. cereus* 14579 i SDS sí que ho fan. Per la producció de surfactants es cultiven *B. subtilis* 13 GR i *B. subtilis* CU1 en medis LB i MH sòlids i líquids. La soca *B. subtilis* CU1 no produeix cap metabòlit amb activitat surfactant en cap d'aquests medis, a diferència de *B. subtilis* 13 GR. L'activitat citotòxica es duu a terme amb cultius de cèl·lules Vero mitjançant la tècnica de tinció de cristall violeta. Els controls mostren una disminució de la densitat òptica indicant activitat citotòxica per la pèrdua de viabilitat de cèl·lules Vero. En canvi, *B. subtilis* CU1 no produeix variacions en la densitat òptica, demostrant l'absència de citotoxicitat.

Estabilitat genòmica (integrases, transposons, CRISPR)

Salveti et al. (2016) determinen l'estabilitat genòmica de *B. coagulans* GBI-30, 6086 amb un anàlisi bioinformàtic d'elements de transició com elements d'inserció, pròfags, transposases, locis CRISPR i de les regions flanquejants de cadascun d'aquests elements. Es troben nou gens que codifiquen transposases en el seu genoma, tot i que les regions que els flanquegen no estan associats a cap gen nociu. També s'identifica la presència de dos elements profàgics, en les regions 58 i 137. Ara bé, s'observa l'absència d'integrases en el de la regió 58 i l'absència del gen que codifica per la *tail tape measure protein*, proteïna essencial per al pròfag. A més no s'identifiquen les regions attL i attR en cap de les dues zones on es troben els elements profàgics. Per tant, s'assumeix que aquests pròfags no són funcionals. Es detecta també la presència de tres *clustered regularly interspaced short palindròmic repeats* (CRISPR) i cinc gens que codifiquen *CRISPRassociated (cas) proteins* al voltant d'un dels locus CRISPR. El sistema CRISPR en *B. coagulans* GBI-30, 6086 promou la seva estabilitat genòmica, ja que representa una barrera d'entrada de DNA d'altres microorganismes.

Pel que fa a l'estabilitat genòmica de *B. coagulans* MTCC 5856, Majeed et al. (2016) confirmen que el seu genoma es manté estable durant els tres anys de producció del producte comercial Lactospore®. A més, la soca *B. coagulans* MTCC 5856 ha demostrat a la prova d'Ames que no té cap efecte mutagènic.

Al estar parlant de soques tant concretes i estudiades recentment de les espècies *Bacillus coagulans* i *Bacillus subtilis*, no s'ha trobat bibliografia referent a l'estabilitat genòmica de *B. subtilis* MB40, *B. subtilis* CU1 i *B. subtilis* DE111.

Tolerància en animals i humans

Kumar et al (2020) administren *B. coagulans* GBI-30, 6086 amb enzims digestius a pacients geriàtrics amb problemes d'indigestió i avaluen la seva tolerància al probiòtic. Els paràmetres hematològics i bioquímics (sucre en sang, urea i creatina) no es veuen significativament alterats. Es notifiquen esdeveniments adversos lleus (mals de caps, nàusees, vòmits i miàlgia) en vuit pacients del grup control i sis del grup d'estudi. No es descarta que aquests efectes estiguin relacionats amb el probiòtic, s'haurien de realitzar més estudis però s'assumeix que el tractament és ben tolerat.

En l'assaig clínic de Majeed et al (2018), l'administració durant 90 dies de *B. coagulans* MTCC 5856 va ser ben tolerada per pacients diagnosticats amb el síndrome de l'intestí irritable. Clínicament no va haver-hi canvis significatius en els valors relatius a la bioquímica i hematologia, tampoc va haver alteracions en els exàmens físics després de la suplementació. L'absència d'esdeveniments adversos significatius o greus també va quedar pal·liada, confirmant la tolerabilitat humana al consum de *B. coagulans* MTCC 5856.

Spears et al. (2021) estudien l'administració oral durant 14 dies de *Bacillus subtilis* MB40 en rates i durant tres setmanes en humans. Observen que no hi ha diferències significatives entre el grup placebo i el grup probiòtic de rates respecte paràmetres hematològics, la química clínica i el pes dels òrgans. A partir del nivell en el que no s'observen efectes adversos en rates, es calcula una quantitat d'ingesta diària acceptable del probiòtic en humans. L'administració de *B. subtilis* MB40 en humans no dona cap mena d'alteració en la freqüència de moviments intestinals ni canvis significatius a nivell mèdic entre el grup control i el grup al que se li ha administrat el probiòtic. S'estableix que la dosi de tolerància de *B. subtilis* MB40 per humans és 10×10^{10} CFU/dia.

El consum diari durant 20 dies de *B. subtilis* DE111 (5×10^9 CFU/dia) ha demostrat ser tolerable en humans (Labellarte et al., 2019). Els paràmetres sanguinis i els nivells de

triglicèrids del grup probiòtic es van mantenir dintre dels rangs normals, a diferència del grup control que va presentar un augment significatiu d'aquest últim factor.

Un assaig clínic de 16 setmanes realitzat per Lefevre et al. (2015), va avaluar els efectes de l'administració de 2×10^9 espores de *B. subtilis* CU1/dia durant 40 dies en ancians sans. La tendència d'esdeveniments adversos entre els dos grups no va resultar estadísticament significativa, majoritàriament van ser d'intensitat lleu i sense relació amb el tractament amb probiòtic. Pel que fa als marcadors de funció hepàtica i renal, paràmetres hematològics i hemodinàmics no es van observar diferències significatives entre el grup consumidor del probiòtic i el grup control ni en l'inici ni al final del tractament.

En general, les avaluacions de seguretat de *B. coagulans* GBI-30, 6086, *B. coagulans* MTCC 5856, *B. subtilis* MB40, *B. subtilis* DE111 i *B. subtilis* CU1, confirmen que totes les soques han estat ben identificades i han demostrat l'absència de resistència a antibiòtics i toxicitat. Per tant, podem confirmar la seguretat pel consum humà de totes aquestes soques *Bacillus*. Ara bé, els estudis de toxicitat i estabilitat genètica de *B. coagulans* MTCC 5856, *B. subtilis* MB40, *B. subtilis* DE111 i *B. subtilis* CU1 haurien de ser més complets respecte l'avaluació de la possible producció d'altres metabòlits no desitjables i la presència de factors de virulència o elements mòbils en el seu genoma. L'estudi de Salvetti et al. (2016) podria ser utilitzat com a guia general per la declaració de seguretat d'una soca probiòtica pel seu consum humà. Aquest *safety assessment* utilitza tant mètodes genotípics com fenotípics, que és lo ideal. A més, totes les avaluacions realitzades compleixen les directrius establertes en un informe conjunt sobre probiòtics de la FAO i la OMS (FAO/WHO, 2006), on es determinen els requisits per a què un producte pugui ser consumit com a probiòtic. Per acabar de seguir aquestes directrius, en l'estudi de Salvetti et al. (2016) s'haguessin pogut incloure estudis de tolerància en animals i humans, com per exemple s'ha fet en Lefevre et al. (2017). Bibliogràficament els estudis de tolerància per *B. coagulans* GBI-30, 6086 són escassos, la societat científica es focalitza en demostrar els beneficis que aporta a la salut.

6.1.2. Resistència a processament tèrmic i emmagatzematge

Almada-Érix et al. (2021) quantifiquen la resistència de vuit soques probiòtiques del gènere *Bacillus* front vuit tipus de processaments industrials, en diferents matrius alimentàries. Entre les soques d'estudi es troben *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086; *Bacillus coagulans* MTCC 5856; *Bacillus subtilis* Bn1; *Bacillus subtilis* PB6; *Bacillus subtilis* PXN21. Els tipus de processaments als que són sotmeses són la pasteurització lenta en matriu de llet (65 °C, 30 min), la pasteurització de curta duració a alta temperatura (HTST) en suc de fruita (95 °C, 30 s), cocció en producte càrnic (72 °C), fornejat en pa (180 °C, 20 min), assecat de fruita (65 °C), fermentació en iogurt (45 °C, 5 h), CO₂ supercrític en suc de fruita (36°C), irradiació gamma de pebre negre molt (3kGy – 5kGy – 7kGy) i extrusió en pasta i aperitius (només *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086).

En cadascuna de les matrius alimentàries inoculen 10⁷ espores bacterianes/g o mL. A continuació, les diferents matrius amb el probiòtic són sotmeses a les operacions unitàries mencionades. Els resultats s'interpreten segons les reduccions decimals (γ) de probiòtic *Bacillus* ocasionades per cada operació industrial (log CFU/g o mL) i les diferències significatives entre cada soca ($p < 0,05$).

Tant les soques probiòtiques de *B. subtilis* Bn1 i *B. coagulans* GBI-30, 6086 van presentar $\gamma < 1$ log CFU/ g o mL en almenys cinc de les 8 operacions estudiades, demostrant una alta resistència a aquests processos en les matrius testades. D'altra banda, *B. subtilis* PB6 i *B. subtilis* PXN21 van mostrar $\gamma > 1$ log CFU/g o mL, evidenciant una resistència menor. Tot i això totes les soques van demostrar valors de reduccions decimals que no superaven els 2 log CFU/g o mL en almenys sis de les vuit operacions. Per tant, totes poden ser considerades com altament resistents, de forma general, front la majoria d'operacions. Almada-Érix et al. (2021), llisten de major a menor resistència la capacitat de les diferents soques de les espècies *B. coagulans* i *B. subtilis*, de superar els processaments tèrmics esmentats anteriorment (Figura 2).

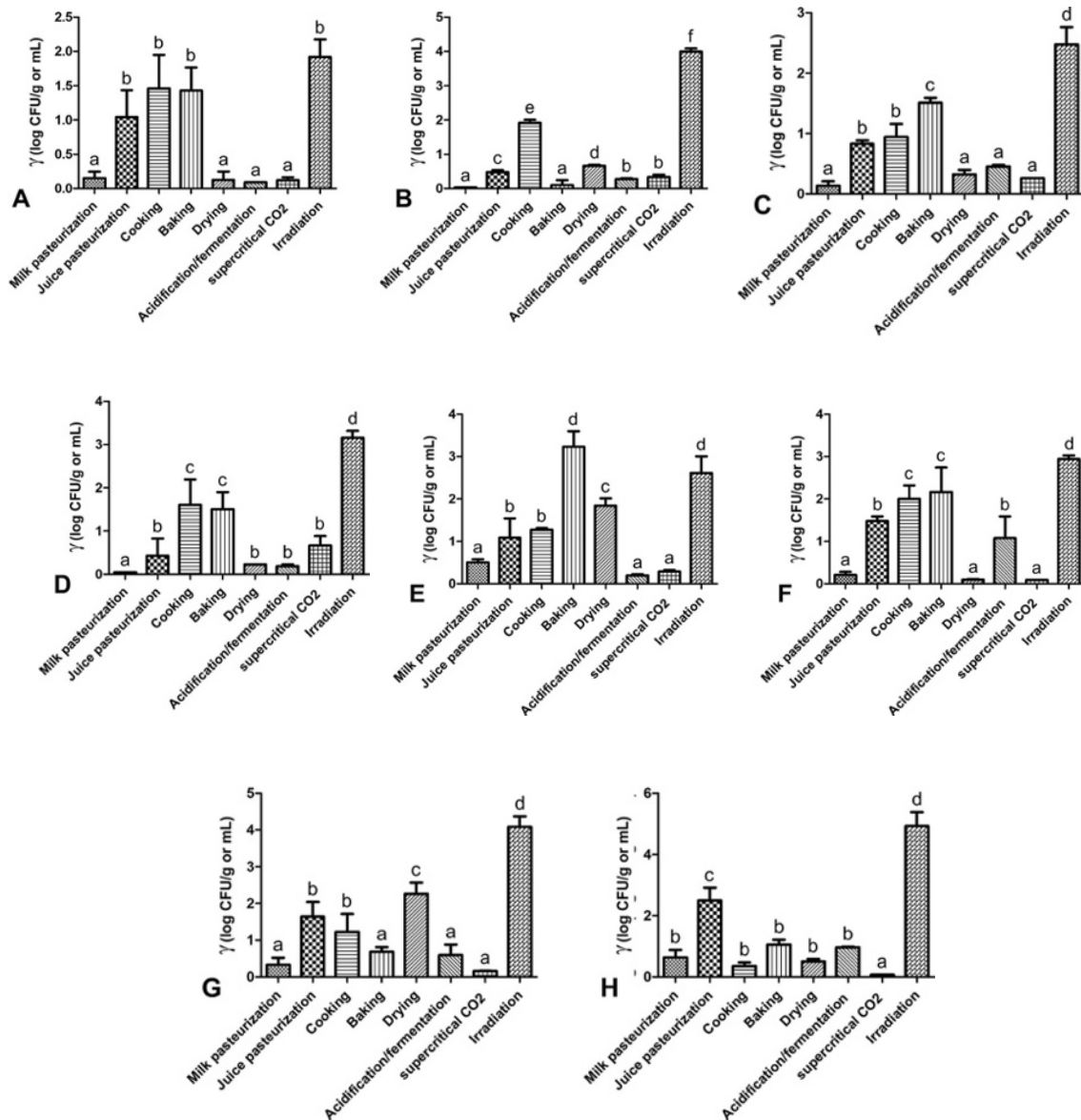


Figura 2. Reduccions decimals (γ) de probiòtic front els diferents processaments industrials en funció de la matriu alimentària. A - *B. flexus* Hk1; B - *B. subtilis* Bn1; C - *B. mojavensis* KJS3; D - *B. licheniformis* Me1; E - *B. subtilis* PB6; F - *B. subtilis* PXN21; G - *B. coagulans* MTCC 5856; and H - *B. coagulans* BC30. Les lletres minúscules indiquen la diferència significant entre els diferents processaments per la mateixa sota probiòtica. Font: Almada-Érix et. al (2021) <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110191>.

- *B. subtilis* Bn1: pasteurització lenta, fornejat > fermentació, CO₂ supercrític > pasteurització HTST > assecat > cocció > irradiació
- *B. subtilis* PB6: fermentació, CO₂ supercrític, pasteurització lenta > pasteurització HTST, cocció > assecat > irradiació, fornejat
- *B. subtilis* PXN21: CO₂ supercrític, assecat, pasteurització lenta > fermentació > pasteurització HTST, cocció, fornejat > irradiació

- *B. coagulans* GBI-30, 6086: CO₂ supercrític, cocció, assecat, pasteurització lenta, fermentació, fornejat > pasteurització HTST > irradiació
- *B. coagulans* MTCC 5856: CO₂ supercrític, pasteurització lenta, fermentació, fornejat > cocció, HTST > assecat > irradiació

Amb aquest llistat es pot afirmar que la capacitat de resistència als processaments tèrmics varia entre les diferents soques probiòtiques *Bacillus* testades, en funció de la matriu utilitzada i el tipus de processament al qual es sotmet l'aliment.

Majeed et al. (2019) han vist que la viabilitat de les espores *Bacillus coagulans* MTCC 5856 després de la producció del cafè verd torrat és d'un 94,04%, i han observat que les seves espores són viables en l'emmagatzematge d'aquest cafè a 70 i 80 °C durant 10 minuts. També han vist que en condicions de refrigeració (4 ± 2 °C), es manté la viabilitat de la soca probiòtica fins un 94,96 % durant almenys 72 h.

Soares et al. (2019) estudien la producció del formatge "requeijão cremoso" amb cinc de les soques mencionades en l'avaluació d'Almada-Érix et al. (2021). Entre aquestes soques es troben *B. coagulans* GBI-30, 6086, *B. coagulans* MTCC 5856, *B. subtilis* PB6 i *B. subtilis* PXN21. Els probiòtics mencionats són inoculats de forma individual en diferents moments de la producció del "requeijão cremoso": directament a la llet abans de la pasteurització (65 °C/ 30 min), a l'inici de la coagulació àcida tèrmica de les proteïnes de la llet (70-80 °C) i durant l'etapa de fusió (90-95 °C).

D'entre les soques testades en aquests estudis, s'ha estudiat la seguretat del seu consum en aquesta revisió bibliogràfica de *B. coagulans* GBI-30, 6086, *B. coagulans* MTCC 5856 i *B. subtilis* PB6. Només *B. coagulans* GBI-30, 6086 i *B. coagulans* MTCC 5856 són considerades com a GRAS o QPS per l'ús com a suplement alimentari en humans. Ara bé, *B. subtilis* PB6 és mencionat en múltiples publicacions de la EFSA com a segur i eficaç, a més es considerat QPS com a suplement alimentari en espècies animals generalment de corral (Rychen et al., 2009; Rychen et al., 2017). D'altra banda, la soca *B. subtilis* Bn1 no es troba ben caracteritzada, ni la FDA ni la EFSA han publicat cap notícia sobre aquesta soca i no hi ha cap estudi que demostrï la seguretat i eficiència de *B. subtilis* Bn1 com a probiòtic. Per tant, tot i que *B. subtilis* Bn1 mostra una major resistència en comparació de les altres espècies *Bacillus subtilis*, a la majoria dels processaments industrials (Almada-Érix et al., 2021) als que se l'ha sotmès, aquesta soca

s'ha desestimat en aquesta revisió bibliogràfica. Pels mateixos motius, també s'ha desestimat la soca *B. subtilis* PXN21.

Segons els resultats les dues soques testades corresponents a l'espècie *B. coagulans*, són adients pel seu ús en la indústria alimentària, destacant les grans avantatges de resistència de l'espòria de *B. coagulans* GBI-30, 6086. Les espècies *B. subtilis* testades també han demostrat la seva alta capacitat de resistència a processaments industrials. D'aquesta forma, s'evidencia que les espècies *Bacillus* són una molt bona opció per ser utilitzades en la indústria alimentària dels probiòtics. Actualment, hi ha pocs estudis de resistència a processaments tèrmics, ja que com s'ha vist aquesta resistència varia depenent del tipus d'operació, de la soca bacteriana utilitzada i la matriu alimentària en la que s'introdueix el bacteri. Seria adient realitzar aquests tipus d'estudis en altres soques de l'espècie *B. subtilis* com *B. subtilis* DE111 i *B. subtilis* CU1, les quals han demostrat ser eficients per la salut i segures pel consum humà.

6.1.3. Resistència gastrointestinal

B. coagulans GBI-30, 6086 ha estat testat in vitro simulant les condicions del tracte gastrointestinal superior (Keller et al., 2019) mitjançant un model d'estómac i d'intestí prim (TIM-1) i un de còlon (TIM-2). S'observa un 97% de supervivència després del trànsit pel compartiment gàstric, on la majoria de cèl·lules es troben en forma d'espòria (76%). D'altra banda, es detecta un 51% de supervivència al finalitzar el trànsit pel TIM-1. Per tant, la meitat de la dosi ingerida resisteix les condicions estomacals i intestinals en aquest model. El 93% d'aquestes cèl·lules es troben en forma vegetativa, per tant han germinat. La germinació de les espores de *B. coagulans* GBI-30, 6086 augmenta fins un 97% passades les 24h a TIM-2 i no hi ha pèrdua de viabilitat.

La reducció de cèl·lules viables de *B. coagulans* MTCC 5856 després de 120 minuts d'exposició a una simulació de sucs gàstrics (pH = 1,3; 1,5; 2,0) va ser inferior a 1 log CFU/mL (Majeed et al., 2021). L'exposició de *Lactobacillus casei* ATCC 393 va resultar en una reducció de més de 4 log CFU/mL respecte el recompte inicial. Es demostra l'altra resistència a condicions gastrointestinals de *B. coagulans* MTCC 5856 respecte una espècie no formadora d'endòspores. A més també s'avalua la supervivència de les espores de *B. coagulans* MTCC 5856 en un model que reproduïx les condicions fisiològiques i els sucs salivals, gàstrics i intestinals a la temperatura, pH, concentració de sals biliars i

enzims implicats en el procés (Shinde et al., 2019). La viabilitat de les espores de *B. coagulans* MTCC 5856 va ser d'un 92,4 % , a diferència de *Lactobacillus acidophilus* que va ser d'un 87,6 %.

En l'estudi de Colom et al. (2021) es detecten espores de *B. subtilis* DE111 ($6,4 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^5$ UFC/g), en l'efluent ileal de pacients amb una ileostomia, tres hores després del consum d'aquest probiòtic. La concentració d'espores ($9,7 \times 10^7 \pm 8,1 \times 10^7$ CFU/g) arriba al punt màxim a les sis hores després de la ingestió, concentració que es manté constant passat aquest temps. S'observa que tots els pacients que han ingerit la càpsula de suplementació de *B. subtilis* DE111 presenten tant cèl·lules vegetatives ($7,3 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^8$ CFU/g en el punt màxim) com espores del probiòtic. D'aquesta forma es confirma la presència i germinació de *B. subtilis* DE111 en l'intestí prim en pacients amb una ileostomia.

Lefevre et al. (2015) han observat un augment de la concentració d'espores *Bacillus* en mostres de femta de 44 subjectes, als quals se'ls havia administrat *Bacillus subtilis* CU1. Deu dies després de la suplementació, la concentració d'espores va ser d' $1,9 \times 10^7$, un augment significatiu respecte el punt de partida on el recompte era de $2,5 \times 10^3$. La tècnica de tipificació molecular Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) va demostrar la presència de *B. subtilis* CU1 a les femtes del grup consumidor del probiòtic, a diferència del grup placebo, demostrant així la seva viabilitat a nivell gastrointestinal.

Bibliogràficament no hi ha cap referència que demostrï la resistència i germinació de *B. subtilis* MB40 en el tracte gastrointestinal. Tot i no haver evidències experimentals, es pot assumir que al ser un bacteri formador d'endòspora la seva viabilitat serà major que aquells que no ho són.

Totes les soques analitzades mostren una alta resistència a les condicions àcides del tracte gastrointestinal. Aquest fenomen s'explica per la protecció que aporta l'estructura d'endòspora a la cèl·lula bacteriana. Tot i això, per les soques *B. coagulans* GBI-30, 6086 i *B. coagulans* MTCC 5856 no s'han aportat estudis de resistència gastrointestinal en models humans, només hi ha constància d'avaluacions en models in vitro diversos. Identificar un model únic i reproduïble in vitro de simulació de condicions gastrointestinals, per testar totes les soques probiòtiques conegudes sota les mateixes variables, podria ser un gran avenç. Els estudis s'haurien de completar amb

L'administració de probiòtics en humans, sotmetent aquests bacteris a les condicions intestinals *in vivo*, com s'ha dut a terme en les espècies *B. subtilis*, que han demostrat una gran resistència al digestiu.

6.1.4. Beneficis del consum de *Bacillus*

La soca *B. coagulans* GBI-30, 6086 ha demostrat ser eficient en la millora de pacients amb problemes d'indigestió. Kumar et al. 2020 han vist que l'administració d'aquest probiòtic deriva en una reducció significativa en el grau de gravetat de la dispèpsia abdominal del grup d'estudi, a diferència del grup placebo. A més, també s'observa una millora de la indigestió i la flatulència. En múltiples estudis anteriors al 2012, s'ha demostrat l'eficiència de *B. coagulans* GBI-30, 6086 en la millora d'afeccions com l'artritis reumatoide (Mandel et al., 2010), el síndrome de l'intestí irritable (Hun, 2009) i l'estimulació immunitària front infeccions virals (Baron, 2009).

Bacillus coagulans MTCC 5856 ha demostrat ser un suplement idoni per tractar els símptomes del síndrome de l'intestí irritable (Majeed et al., 2018; Majeed, Nagabhushanam, Natarajan, Sivakumar, Ali, et al., 2016). Majeed et al. (2018) administren diàriament durant 90 dies *B. coagulans* MTCC 5856 i observen una reducció significativa dels símptomes clínics. La disminució significativa de mieloperoxidasa, un biomarcador inflamatori, en el grup que ha consumit el probiòtic confirma l'eficàcia clínica d'aquesta soca. Majeed, Nagabhushanam, Natarajan, Sivakumar, Ali, et al. (2016) van obtenir els mateixos resultats que en l'estudi presentat l'any 2018.

L'absència de bibliografia que demostrï beneficis de *B. subtilis* MB40 en la salut és notable, només en un estudi es tracta d'identificar els efectes de la seva administració en molèsties intestinals, gasos i inflor (Penet et al., 2021). Els resultats mostren una millora durant l'estudi d'aquests símptomes, tant en el grup probiòtic com el placebo, sense observar diferències significatives entre els dos grups. Per tant, l'eficàcia de *B. subtilis* MB40 no queda demostrada.

L'administració de *Bacillus subtilis* DE111 en nens, ha demostrat aportar efectes beneficiosos en el manteniment d'un microbioma saludable (Paytuví-Gallart et al., 2020). En les mostres fecals del grup d'estudi que ha consumit *B. subtilis* DE111, s'observa el manteniment de l'equilibri general dels grups bacterians propis, però amb canvis subtils

positius en la diversitat del microbioma. Es produeix un augment de grups associats a la regulació immunitària i reducció d'inflamació (*Bacteroidetes*, *Alistipes*, *Bacteroidaceae*, *Odoribacter*, *Parabacteroides* i *Rikinellaceae*). D'altra banda, Trotter et al. 2020 observen que la suplementació amb *B. subtilis* DE111 disminueix significativament el colesterol total d'adults sans (-8 g/dl) i les lipoproteïnes de baixa densitat, a més millora la funció endotelial. Aquests factors suggereixen que *B. subtilis* DE111 pot estar associat a la millora dels factors de risc relacionats amb les malalties cardiovasculars.

Lefevre et al. (2015) observen que la ingesta de *B. subtilis* CU1 produeix un augment de la *Immunoglobulina A secretora* del 45 % i un increment significatiu de la concentració d'IFN-gamma 10 dies després de la suplementació. Per tant, el consum de *B. subtilis* CU1 ha demostrat augmentar les respostes immunitàries de la mucosa, essencials per fer front a malalties infeccioses respiratòries i gastrointestinals. A més, també s'ha associat la suplementació de *B. subtilis* CU1 amb la reducció d'episodis de diarrea, pel que fa a la durada com la intesitat, en humans subministrat amb *Saccharomyces boulardii* CNCM-I 3799 (Ghosh et al., 2021) i en ratolins (Urdaci et al., 2018), administrat de forma individual.

6.1.5. Productes probiòtics *Bacillus* existents en el mercat

Actualment es comercialitzen probiòtics de *Bacillus* com a suplementos en format de càpsules. Alguns d'aquests productes destinats pel consum en humans són anomenats comercialment GanedenBC^{30™}, LactoSpore[®], OPTI-BIOME[®], DE111[®] i LifeinU[™] (Taula 4).

Taula 4. Productes al mercat que contenen espècies *Bacillus*.

| Nom comercial | Soca probiòtica | Productor | Referència |
|--------------------------|-------------------------------------|--|---|
| GanedenBC ^{30™} | <i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086 | Ganeden Biotech, Inc. (Mayfield Heights, U.S.) | https://bc30probiotic.com |
| LactoSpore [®] | <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 | Sabinsa Corporation (New Jersey, U.S.) | https://lactospore.com |

| | | | |
|-------------|-----------------------------------|--|---|
| OPTI-BIOME® | <i>Bacillus subtilis</i> MB40 | BIO-CAT Microbials, LLC (Minnesota, U.S.) | https://optibiome.co |
| DE111® | <i>Bacillus subtilis</i> DE111 | Deerland Probiotics & Enzymes, Inc. (Georgia, U.S.) | https://de111.com |
| LifeinU™ | <i>Bacillus subtilis</i> CU1 | Gnosis by Lesaffre (France) | https://gnosisbylesaffre.com/ingredient/lifeinu-bscu1/ |

Com es pot comprovar, algunes de les espècies de *Bacillus* estudiades en aquesta revisió bibliogràfica ja es poden trobar de forma comercial. També podem trobar l'espècie *Bacillus subtilis* de forma natural en aliments fermentats com el tradicional “Natto” de Japó (fermentació de la soja) i el “Kimchi” Coreà (fermentació de vegetals com la col) (Jezewska-Frackowiak et al., 2018). Ara bé, ninguna soca *Bacillus* consta com a ingredient en cap producte alimentari funcional que es trobi al mercat Europeu, sotmès a processaments industrials com sucs, purés, llet, carn, pasta o altres. Segurament, aquest fet es deu a la ambigüitat en la regulació legislativa Europea respecte l'etiquetatge sota el nom de “probiòtic”. L'Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició en una publicació l'any 2020, confirma que es permet l'ús de probiòtics en la indústria alimentària sempre que es demostrï la seva seguretat, prenent com a referència la llista de QPS de la EFSA. Ara bé, pel que fa a l'etiquetatge, presentació o publicitat d'un aliment, només estan permeses les declaracions nutricionals i de propietats saludables autoritzades segons el Reglament (CE) N° 1924/2006 del Parlament Europeu. La EFSA va dictaminar desfavorables la majoria de soques, entre elles del gènere *Bacillus*, que va avaluar per declarar-les soques amb propietats saludables. El motiu va ser la falta d'assajos, el fet de ser declaracions massa generals i no específiques o per haver-se realitzat en persones malaltes, de forma que no s'acabava demostrant el seu benefici en la salut.

Com hem vist anteriorment, en l'apartat 6.1.2. , hi ha estudis on s'incorpora directament el bacteri esporulat a la matriu alimentària, per ser processats posteriorment (Almada-Érix et al., 2021). En aquests casos el producte final no és una càpsula destinada a comercialitzar-se com a suplement alimentari que només conté les espècies probiòtiques,

sinó un aliment funcional amb probiòtics que per tant, aporta també un valor nutricional. Demostrant que sí és possible obtenir un producte alimentari que contingui probiòtics viables per poder ser comercialitzat. Hi ha evidències de la producció d'un tipus de formatge anomenat "requeijão cremoso" típic del Brasil al qual se li inoculen individualment cinc soques de *Bacillus* (Soares et al., 2019); entre elles *B. coagulans* GBI-30, 6086, *B. coagulans* MTCC 5856, *B. subtilis* PXN21 i *B. subtilis* PB6. Soares et al. (2019) observen que les soques *Bacillus* en general es mantenen en altes concentracions després del processament del formatge i durant la vida útil del producte (45 dies a 6 °C). Per tant, aquestes soques representen l'oportunitat de produir futurs aliments probiòtics que han de ser sotmesos a processaments, els quals no poden ser resistits per soques probiòtiques no esporulades com *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

6.1.6. Risc del consum de *Bacillus*

Bacterièmies

L'administració de *Bacillus clausii* com a tractament en una pacient de 87 anys amb diarrea aquosa, va derivar en una bacterinèmia, causant símptomes com sagnat gastrointestinal superior, diarrea d'origen infecció i inestabilitat hemodinàmica (García et al., 2021). Abans del 2012, es van notificar quatre casos de bacterièmia causats per *Bacillus subtilis* durant un període de 6 anys en l'àmbit hospitalari (Richard et al., 1988). Aquests casos es van associar a l'administració d'un suplement d'espores de *B. subtilis* com a tractament per reduir la diarrea. Tant *Bacillus clausii* com *B. subtilis* han demostrat la seva seguretat com ha probiòtic en estudis experimentals (Lakshmi et al., 2017; Spears et al., 2021). És per això que aquests casos reportats, han de ser una alarma per la comunitat mèdica, per tenir en compte que algunes soques *Bacillus* tenen la capacitat de produir toxines entèriques. De forma que, cadascuna de les soques probiòtiques, tot i demostrar la seva eficiència i perfil de seguretat en proves in vitro a nivell d'espècie, sempre han de ser testats clínicament a nivell de soca per descartar possibles bacterièmies i esdeveniments adversos greus.

6.2. *Clostridia* (Clostridials)

6.2.1. Caracterització i seguretat

Les espècies de *Clostridia*, entre elles *Clostridium butyricum* i *Faecalibacterium prausnitzii*, queden excloses de les avaluacions QPS de la EFSA (Koutsoumanis et al., 2022). Aquest fet es deu a una posició taxonòmica ambigua i la presència de trets potencialment nocius per part d'algunes espècies Clostridials, com *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile* o *C. perfringens*. Per això, l'avaluació de seguretat específica per cada soca amb propietats probiòtiques és un tret indispensable.

Un BLAST realitzat per al gen 16S ARNr del genoma seqüenciat de *Clostridium butyricum* UBCB70, depositat en la DNA Data Bank of Japan i aïllat de mostres fecals humanes, ha detectat un 100% d'identitat amb la soca *C. butyricum* TK520 (Sulthana et al., 2019). A més realitzen una avaluació de possibles factors de virulència, plàsmids i gens de resistència antibiòtica. Els resultats mostren l'absència de gens que codifiquen factors de virulència propis de *Clostridia* com la neurotoxina botulínica (*atx*), les toxines *Clostridium difficile* (*cdtA* i *cdtB*), el complex d'enterotoxines hemolítiques (*hblA*, *hblB*, *hblC* i *hblD*) i enterotoxines no hemolítiques. Tampoc s'observen plàsmids que continguin gens de resistència a antibiòtics.

C. butyricum MIYAIRI 588 és una de les soques més utilitzades a nivell comercial depositada en el *National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganism Depository* (NPMD) i autoritzada per la EFSA ("Safety and Efficacy of Miya-Gold®S (*Clostridium Butyricum*) as Feed Additive for Chickens for Fattening," 2009) com a suplement alimentari per animals, però també s'ha reportat com a possible ingredient futur en aliments (Isa et al., 2016). Isa et al. (2016) confirmen a partir dels valors de CMI per *C. butyricum* MIYAIRI 588 que aquesta soca és susceptible als antibiòtics animals i humans clínicament més rellevants, exceptuant els aminoglicòsids. La resistència a aminoglicòsids comproven que no és un tret específic d'aquesta soca, sinó que és comú en bacteris anaeròbics. L'estudi del genoma de *C. butyricum* MIYAIRI 588 demostra l'absència de factors de virulència de les toxines *Clostridium* α , β , o ϵ , de gens que codifiquen les neurotoxines botulíniques de tipus *A*, *B*, *E* o *F* i dels que codifiquen la proteïna no-hemglutinina no tòxica. Isa et al. (2016) també analitzen la tolerància d'aquesta soca en ratolins i s'observa l'absència d'efectes adversos i de reproductibilitat d'efectes nocius en diverses generacions.

Martín et al. (2017) seqüencien el gen 16S ARNr de 17 aïllats de *Faecalibacterium prausnitzii* aïllats de la femta de d'individus sans. Els resultats mostren un 97% d'identitat entre aquestes soques ja que pertanyen a la mateixa espècie, però confirmen que cadascuna d'elles és una soca diferent. La resistència a antibiòtics és avaluada amb els valors CMI donant com a resultat la susceptibilitat de totes les soques aïllades de *F. prausnitzii* a la clindamicina, vancomicina, ampicil·lina i quinupristina/dalfopristina. Totes les soques testades són resistents a l'estreptomicina, excepte l'aïllat CNCM I-4575. Només la soca CNCM I-4541 és resistent a l'eritromicina. A més, 5 dels aïllats van mostrar resistència a concentracions més altes dels punts de tall de CMI marcats per la EFSA. Aquesta última troballa suggereix que s'haurien de realitzar nous estudis amb *F. prausnitzii*, per determinar els valors de tall CMI que la EFSA hauria d'establir per avaluar correctament aquesta espècie. La majoria d'aïllats de l'espècie *F. prausnitzii* han mostrat també sensibilitat al cloramfenicol i l'estreptomicina, i resistència a la kanamicina i gentamicina (Hu et al., 2022a). La resistència de *F. prausnitzii* a l'antibiòtic estreptomicina veiem que varia entre les soques en els dos estudis, fet que demostra l'alta diversitat dintre de la mateixa espècie i la necessitat de caracteritzar cada soca.

Machado et al. 2022 revelen que 104 genomes d'aïllats de *F. prausnitzii* contenen una mitjana de 23 gens de resistència a antibiòtics, la soca *F. prausnitzii* AHMP21 en conté 43. S'analitza la presència d'illes genòmiques, elements integratius i conjugatius i seqüències profàgiques en el genoma de *F. prausnitzii* DSM 17677 (Machado et al., 2022). Els resultats mostren la presència de 7 regions d'integració putatives, la regió d'integració 6 conté gens de resistència a l'estreptomicina. També s'observa la presència de 69 illes genòmiques en el genoma de *F. prausnitzii* DSM 17677 i set seqüències profàgiques actives. Ara bé, les seqüències profàgiques no contenen gens putatius de resistència a antibiòtics.

6.2.2. Resistència a processament tèrmic i emmagatzematge

Bibliogràficament, no es troben estudis de resistència a processament tèrmic i emmagatzematge de formulacions alimentàries que continguin probiòtics Clostridials. Tant, *C. butyricum* com *F. prausnitzii* són soques anaeròbiques obligades, de forma que l'alta sensibilitat a l'oxigen complica el seu cultiu i desenvolupament en formulacions alimentàries que els continguin (Ferreira-Halder et al., 2017b). Cal destacar que les dues espècies són formadores d'espores, s'assumeix que en la seva forma d'endòspora poden

ser capaces de resistir els processaments tèrmics, però no hi ha estudis experimentals que ho demostrin. Els preparats d'espores *C. butyricum* Miyairi 588 és comercialitzen al Japó, Xina i Corea des de 1968, però en forma de suplement alimentari, de forma que no podem confirmar que les espores siguin resistents a processaments industrials (Dürre, 2014).

La regulació del pH baix present durant la fermentació de *C. butyricum* NN-2 cap a valors de pH gairebé neutres, ha demostrat millorar la taxa de producció d'espores en comparació amb el procés de fermentació natural (Li et al., 2020). També s'ha observat que la formulació de *F. prausnitzii* amb els antioxidants cisteïna i riboflavina en combinació amb inulina crioprotectora, permet fins un 70% de supervivència de la soca probiòtica cultivada en presència d'aire ambiental durant 24 hores (Khan et al., 2014). La liofilització (4 °C durant 3 mesos) i criopreservació (-80 °C) en combinació amb protectors (sacarosa, inulina i glicerol) han demostrat millorar la viabilitat de la soca *F. prausnitzii* (Bircher et al., 2018). La liofilització resulta en una viabilitat inferior que la criopreservació, però una millor estabilitat en l'emmagatzematge. La supervivència de *F. prausnitzii* es va veure augmentada fins un 80% després de la criopreservació i emmagatzematge amb l'addició de protectors i fins un 50% sense la presència d'aquests. Tots aquests resultats poden ser un important factor a tenir en compte per poder produir industrialment els probiòtics *C. butyricum* i *F. prausnitzii*.

La condició estrictament anaeròbica dels Clostridials, disminueix les possibilitats d'ús d'aquesta soca formadora d'espores en la producció d'aliments sotmesos a processaments extrems. Tot i haver vist que poden haver alternatives per a què *Clostridia* superi aquest obstacle, les soques *Bacillus* que creixen en condicions aeròbiques prenen avantatge pel que fa a la facilitat de producció i a la supervivència que ha demostrat tenir en processats alimentaris.

6.2.3. Resistència gastrointestinal

En l'estudi de Foditsch et al. (2014) el creixement de *F. prausnitzii* ha resultat ser inhibit in vitro sota la presència d'un 0,1% de sals biliars, la mínima concentració testada. S'ha demostrat que en condicions de pH de 3,5-4,0 l'espècie *F. prausnitzii* no mostra creixement, les condicions òptimes pel creixement d'aquesta espècie es troben entre 5,5 i 6,7 creixement. El pH gàstric en humans en dejú és aproximadament d'1,7, aquest pH augmenta després de les menjades arribant al seu punt màxim de pH 6,7. Per tant,

l'administració oral del probiòtic *F. prausnitzii* s'hauria de donar després de l'alimentació, evitant el baix pH gàstric. Hu et al. (2022b) observen la inhibició del creixement de nombrosos aïllats de *F. prausnitzii* i només alguns creixen en presència de sals biliars a concentracions d'un 0,1% i 0,25 %. Aquest estudi també confirma els resultats obtinguts per Foditsch et al. (2014), ja que obtenen un creixement bacterià òptim en pH 6-7 i no s'observa creixement entre pH inferior a 4,0-5,0 ni superior a 8,0-9,0.

Tot hi haver estudis de suplementació de *Clostridium butyricum* en animals, no s'analitza la seva viabilitat front les condicions del tracte gastrointestinal in vivo. Tampoc es troben anàlisis in vitro en models que simulin aquestes condicions. En algun article, es fa referència a *C. butyricum* com un microorganisme resistent a altes temperatures, àcids i sals biliars, però no es demostra experimentalment (Liang et al., 2021). En general, durant la revisió de bibliografia, ha estat notòria la falta d'estudis exhaustius de resistència gastrointestinal pel grup bacterià *Clostridia*, a diferència dels existents per *Bacillus* que han demostrat la seva capacitat in vitro i in vivo de superar les condicions del digestiu.

6.2.4. Beneficis del consum de *Clostridia*

Clostridium butyricum MIYAIRI 588 ha estat identificat com un excel·lent agent antimicrobià amb una alta eficiència en infeccions per *C. difficile*, *Helicobacter pylori* i *E. coli* (Ariyoshi et al., 2022). D'altra banda, també s'ha associat el consum d'aquesta espècie a la millora de la salut gastrointestinal (reducció de diarrea) i en l'impacte positiu en malalties com l'obesitat i la diabetis de tipus II, malalties hepàtiques, malalties neurodegeneratives ja que afecta a la ruta metabòlica anti-apoptòtica i a la tumorigènesis (Stoeva et al., 2021b).

La producció de butirats per part del producte comercial Miya-Gold®S (Taula 4) demostra tenir eficiència terapèutica contra la malaltia d'inflamació intestinal (Dürre, 2014) i indiquen la seva capacitat com agent terapèutic profilàctic contra infeccions de patògens com *C. difficile* i *Escherichia coli*. D'altra banda, també demostren la seva eficàcia contra per combatre la diarrea.

F. prausnitzii ha estat associat en múltiples assajos clínics a la millora de trastorns gastrointestinals (malaltia inflamatòria intestinal, síndrome de l'intestí irritable, càncer colorectal), síndromes metabòlics (obesitat, diabetis tipus II i malaltia del fetge gras no

alcohòlic), malalties del sistema nerviós (Alzheimer i Parkinson, trastorn depressiu major i bipolar i esclerosi múltiple), malalties de la pell (dermatitis atòpica) i a la malaltia renal crònica (Leylabadlo et al., 2020). A més, l'administració oral d'aproximadament 1×10^9 CFU/mL al dia de *F. prausnitzii* en ratolins va ser efectiva per combatre l'asma al·lèrgic (Hu et al., 2021). Es va demostrar que la suplementació del probiòtic tant viu com inactivat regula l'activació de cèl·lules T reguladores, disminuint els nivells de IL-4, IL-5, IL-13 i Immunoglobulina G1. Aquestes interleucines afecten en l'asma provocant inflamació i dany tissular, per tant la seva disminució provoca un efecte antiastmàtic que prevé l'asma al·lèrgica. Foditsch et al. (2015) comproven que el tractament amb *F. prausnitzii* en vedells disminueix la incidència de diarrea greu i la taxa de mortalitat induïda per aquesta, en comparació amb el grup control de vedells. A més, també s'observa un augment de pes significatiu (4,4 kg) previ al deslletament en el grup que ha consumit oralment *F. prausnitzii*.

6.2.5. Productes probiòtics *Clostridia* existents en el mercat

Taula 5. Productes al mercat que contenen espècies *Clostridia*.

| Nom comercial | Soca probiòtica | Productor | Referència |
|---------------|---|-----------------------------------|---|
| Miya-Gold®S | <i>C. butyricum</i> MIYAIRI 588 | Miyairisan Pharmaceutical Co. Ltd | http://www.miyairisan.com/english_index.htm |
| PROBIOTIC-3 | <i>C. butyricum</i> TO-A <i>B. subtilis</i> TO-A <i>E. faecium</i> T-110 | Advanced Ortomolecular Research | https://aor.us/products/probiotic-3/ |
| BIO-THREE | <i>C. butyricum</i> TO-A <i>B. mesentericus</i> TO-A <i>E. faecalis</i> T-110 | TOA Probiotics | https://www.bio-three.com |

Aquests productes comercials (Taula 5) consisteixen en preparacions que contenen les soques del grup *Clostridia* esmentades, per ser utilitzades com a suplementos alimentaris en humans, tal i com passa amb els productes existents del grup *Bacillus*. No hi ha evidències de productes alimentaris que continguin *Clostridials*.

6.2.6. Risc del consum de *Clostridia*

C. butyricum productor de toxina botulínica E i la seva transferència horitzontal

Isa et al. (2016) han indicat que la toxina botulínica de tipus E es pot transferir des d'una soca toxigènica *C. butyricum* BL 5839 a una soca no toxigènica *C. butyricum* ATCC 19398T. Tot i que la taxa de transferència horitzontal del gen que codifica per la toxina i la freqüència de trobar aïllats de *C. butyricum* productors de la toxina botulínica de tipus E és molt baixa, s'ha de tenir en compte l'estudi exhaustiu de la possible transferència de la capacitat toxigènica entre aquesta espècie. En un altre estudi, Camerini et al. (2019) detecta l'aerotolerància d'una soca de *C. butyricum* productora de la neurotoxina botulínica E durant el creixement vegetatiu. Aquest factor pot representar un risc, al conferir major resistència en condicions ambientals a soques productores d'aquesta toxina.

Transferència horitzontal de gens en *F. prausnitzii*

Les illes genòmiques són clústers de gens consecutius que han estat adquirits probablement per transferència horitzontal. Aquestes illes solen incloure gens de mobilitat i seqüències d'integració. Com s'ha vist en Machado et al. (2022), *F. prausnitzii* DSM 17677 conté un gran nombre d'illes genòmiques i el seu genoma també consta de múltiples gens de resistència en seqüències d'integració, elements conjugatius i seqüències profàgiques. Les regions d'integració i conjugatives amb gens de resistència tenen un alt potencial per ser transferides genèticament de forma horitzontal. D'altra banda, Machado et al. (2022) detecten que les illes genòmiques presenten l'absència de gens de resistència, reduint així la possibilitat de transferència horitzontal de resistència a antibiòtics entre espècies. Tot i això, els resultats d'un estudi anterior del mateix autor mostren que el gen de resistència a l'antibiòtic estreptomycinina es troba codificat entre una illa genòmica i un element de mobilitat genètica de *F. prausnitzii* DSM 17677, suggerint que s'ha pogut adquirir horitzontalment i pot tenir la capacitat de transferir-se entre altres bacteris.

Els nombrosos estudis existents de caracterització i seguretat de les soques *Bacillus*, a diferència de soques *Clostridia*, asseguren un risc menor en el seu consum com a probiòtics. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 amb els estudis d'estabilitat genòmica demostra que el risc de transferència horitzontal és pràcticament inexistent per aquesta

soca. En canvi, els estudis realitzats per les espècies *C. butyricum* i *F. prausnitzii* mostren la resistència d'aquest bacteri a múltiples antibiòtics comuns i la presència de gens que codifiquen per aquests en zones d'integració, evidenciant el risc del seu consum.

7. Perspectives de futur

El camp de la microbiota intestinal i els probiòtics és molt ampli, s'han descrit diverses estratègies de futur en les que focalitzar-nos en la realització de nous estudis, per tal de progressar en aquest àmbit. Els prebiòtics són estimuladors del creixement de probiòtics i, conseqüentment provoquen l'augment de l'activitat de probiosis. Cada cop s'està valorant més la possibilitat de formular productes probiòtics amb prebiòtics. Aquesta opció permet que s'estableixi una relació simbiòtica donant lloc a una acció sinèrgica, augmentant de forma específica les possibilitats de supervivència del probiòtic al llarg del tracte gastrointestinal (Markowiak & Ślizewska, 2017). La millor elecció per generar productes simbiòtics és la formulació de probiòtics amb aliments amb alt contingut de prebiòtics, que siguin específics per l'estimulació de la soca d'interès.

Investigacions futures també tracten de determinar els efectes d'administrar bacteris amb propietats probiòtiques però inactivats, així no hauria cap impediment en la realització de processaments a altes pressions o temperatures. El probiòtic inactivat de la soca *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 (GANEDEN BC-30) patentat per Ganeden Biotech, Inc. sota el nom de "Staimune", ha mostrat eficàcia en l'activació del sistema immunitari i en la inducció de secreció de citocines i quimiocines amb efectes anti-inflamatoris (Jensen et al., 2017).

També s'ha definit el bacteri gramnegatiu no esporulat *Akkermansia muciniphila* del superfilum *Verrucomicrobia* com a futur probiòtic prometedor per la indústria alimentària (Zhang et al., 2019). La forma pasteuritzada de *A. muciniphila* ha demostrat prevenir la obesitat i les complicacions relacionades, amb una efectivitat inclús major que la de les bactèries vives (Choi et al., 2021; Ashrafian et al., 2021).

Cal també focalitzar-nos en factors derivats de probiòtics com proteïnes o altres molècules que aquests secreten, ja que s'ha comprovat que també aporten beneficis terapèutics per l'hoste, evitant el risc d'administrar bacteris vius (Okamoto et al., 2012). Una altra opció seria utilitzar enginyeria genètica i biotecnologia per modificar genèticament soques probiòtiques per tal de millorar-les, fent-les termòfiles i per tant resistents a processaments tèrmics. Ara bé, comercialitzar un producte que conté

organismes genèticament modificats és molt complicat i necessitaria de més estudis per declarar-los segurs pel consum humà. Per tant, una altra alternativa estudiada recentment és la encapsulació de probiòtics (Mokhtari et al., 2019; Raise et al., 2020; Yahav et al., 2018), tot i que és una opció que encareix el procés de producció.

Determinar els mecanismes de persistència d'aquests probiòtics en la microbiota de l'hoste seria un avenç important, ja que no està clar si la colonització per part dels probiòtics es manté després de la suplementació. Tot i això, és un treball molt tediós determinar cadascun dels mecanismes que utilitza cada tipus de probiòtic i quin impacte biològic està influenciat per aquests factors, ja que això depèn del tipus de microorganisme, la freqüència d'administració i la composició de la microbiota de cada individu. S'ha vist que en alguns casos de trasplantament de microbiota fecal en teràpies per pacients amb trastorns gastrointestinals com la malaltia de Crohn, hi ha una predominança de la microbiota a retornar a la composició original passades les 6 setmanes o directament hi ha pacients que no aconsegueixen una correcta colonització després del trasplantament (Sokol et al., 2020). Per tant un factor a tenir en compte és que s'hauria de formular un producte amb probiòtic que es pogués consumir repetitivament i perllongar el seu consum en el temps, sense cap impacte perjudicial per la salut.

Estudis recents focalitzats en el microbioma i l'aparició de noves tècniques experimentals i de seqüenciació d'alt rendiment ens poden ajudar a adquirir coneixements essencials sobre probiòtics. Així es pot facilitar la transformació cap un model terapèutic dirigit cap a la malaltia i el pacient en concret. Tot i això, pot ser en aquest cas estaríem parlant de farmabiòtics, en comptes de nutriòtics, per tant potser no seria d'interès per la indústria alimentària, sinó per la farmacèutica.

8. Conclusions

La utilització de bacteris formadors d'espores en suplementació alimentària està augmentant exponencialment. L'especial interès en demostrar els seus beneficis terapèutics ha derivat en què els estudis referents a la seva capacitat de mantenir-se viables en processaments industrials siguin escassos. Tot i que promoure un benefici per la salut de l'hoste és la propietat probiòtica més important, per fer-ho aquest també ha de sobreviure i mantenir-se estable en el producte que el contingui fins la seva ingesta.

En aquesta revisió bibliogràfica s'ha establert un model comparatiu entre els grups bacterians *Bacillus* i *Clostridia* per determinar quina soca pot ser un potencial probiòtic en la producció d'aliments. La seguretat i eficiència de *Bacillus* pel consum humà ha estat confirmada en aquest estudi, en canvi és necessària la realització de més estudis experimentals per assegurar el consum probiòtic dels *Clostridials* en humans ja que presenten una elevada resistència a antibiòtics. Les soques *Bacillus* testades han demostrat una alta resistència als processaments tèrmics industrials i a les condicions gastrointestinals tant in vivo com in vitro, per sobre de les espècies *Clostridials*. *Bacillus coagulans* GBI-30 6086 és la que ha mostrat els millors resultats en la majoria de processaments i matrius alimentàries amb reduccions decimals inferiors a 1 log CFU/g o mL. Tot i així, en l'elecció d'una soca específica en la producció d'un aliment probiòtic s'ha vist que dependrà tant la composició de l'aliment com el tipus de processament, ja que tenen impactes diferents en la viabilitat de les soques probiòtiques.

D'altra banda els *Clostridials* han demostrat tenir més efectes beneficiosos en múltiples malalties que afecten la salut humana en general, en canvi *Bacillus* presenten beneficis més concretament a nivell gastrointestinal. El paper dels *Clostridials* en la indústria alimentària encara s'ha de determinar, futurs estudis més exhaustius sobre la seva utilització en producció alimentària podrien representar la introducció d'aquests en aquesta indústria.

9. Autoavaluació

La present revisió bibliogràfica m'ha permès enriquir els meus coneixements sobre un tòpic actual de la biotecnologia alimentària. Ha estat tot un repte ja que jo m'he especialitzat durant la carrera en el sector biomèdic i per tant, escollir aquest tema em portava a un món prou desconegut per mi. A més a més, la idea inicial era realitzar un treball experimental analitzant diverses formulacions en matrius de fruita, amb el probiòtic *Bacillus coagulans* GBI-30. L'objectiu era comprovar la viabilitat i vida útil d'aquests productes en diferents condicions (pH i temperatura), després d'un procés de pasteurització. Malauradament, el projecte en el que havia de participar encara estava en les primeres etapes de desenvolupament i l'alternativa va ser la realització d'un treball bibliogràfic relacionat amb aquest àmbit. Aquest succés va comportar que hagués de treballar a contrarellotge i partint de pocs coneixements sobre l'àmbit. Personalment, considero que gràcies a l'aprenentatge obtingut durant el grau de Biotecnologia vaig poder superar aquests dos obstacles amb èxit.

Realitzant aquesta revisió bibliogràfica me n'he adonat que la microbiota és un camp molt ampli i que encara queda molt a investigar. Aquesta està involucrada en múltiples afeccions i en els sistemes de defensa propis com el sistema immunitari. L'estudi dels probiòtics representa la possibilitat de millorar la nostra qualitat de vida, pel que fa a una bona salut en general i a la lluita contra múltiples malalties. Ara bé, una preocupació que m'ha sorgit després de la finalització d'aquesta revisió és que he pogut comprovar que per la comercialització d'un producte com a probiòtic, no és un requisit la realització d'estudis de resistència gastrointestinal de la soca utilitzada. Estar d'acord amb aquest criteri és molt complicat des d'un punt de vista ètic. Si una empresa decideix no realitzar aquest tipus de prova, ja que requereix d'un cost d'inversió més elevat, la població està comprant un producte final com a probiòtic que conté aquests bacteris beneficiosos però, no s'ha comprovat si seran viables després de realitzar el seu camí pel tracte gastrointestinal. Per tant, crec que la legislació vigent respecte la comercialització de probiòtics, hauria d'incloure en els seus requisits i criteris l'obligació de realitzar proves de resistència gastrointestinal. D'aquesta forma, s'assegura la venda d'un producte òptim que compleix les característiques que promet, per tal de no enganyar al consumidor.

10. Agraïments

Per finalitzar el treball de fi de grau voldria agrair la professionalitat d'Albert Bordons. La seva disposició en qualsevol moment i l'ajuda proporcionada al compartir els seus coneixements amb mi, sobre el camp dels probiòtics, han estat indispensables per la realització d'aquesta tasca. També donar gràcies als professors i responsables del Grau de Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, ja que sense l'aprenentatge que he obtingut al llarg d'aquests quatre anys no hagués pogut desenvolupar aquest treball. L'origen del tema escollit no hagués estat aquest sense la meva estada a l'empresa Delafruit S.L.U, La Selva del Camp. Voldria agrair a tot els integrants del departament I+D, gràcies a ells vaig poder descobrir la importància que podien tenir els bacteris esporulats en la indústria alimentària. Durant la meva estada em van permetre formar part dels passos per iniciar un projecte de producció de productes amb probiòtics. Per últim, expressar que no tinc suficients agraïments pel suport incondicional dels meus pares, els meus avis i la meva parella.

11. Bibliografia

- Almada-Érix, C. N., Almada, C. N., Souza Pedrosa, G. T., dos Santos, P., Schmiele, M., Clerici, M. T. P. S., Martinez, J., Lollo, P. C., Magnani, M., & Sant'Ana, A. S. (2021). Quantifying the impact of eight unit operations on the survival of eight *Bacillus* strains with claimed probiotic properties. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *142*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110191>
- Ariyoshi, T., Hagihara, M., Takahashi, M., & Mikamo, H. (2022). Effect of *Clostridium butyricum* on Gastrointestinal Infections. *Biomedicines*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020483>
- Baron, M. (2009). A patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge. *Postgraduate Medicine*, *121*(2), 114–118. <https://doi.org/10.3810/PGM.2009.03.1971>
- Bircher, L., Geirnaert, A., Hammes, F., Lacroix, C., & Schwab, C. (2018). Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microbial Biotechnology*, *11*(4), 721–733. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13265>
- Camerini, S., Marcocci, L., Picarazzi, L., Iorio, E., Ruspantini, I., Pietrangeli, P., Crescenzi, M., & Franciosa, G. (2019). Type E Botulinum Neurotoxin-Producing *Clostridium butyricum* Strains Are Aerotolerant during Vegetative Growth. *MSystems*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00299-18>
- Cassir, N., Benamar, S., & la Scola, B. (2016). *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *22*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2015.10.014>
- Cheng, D., & Xie, M. Z. (2021). A review of a potential and promising probiotic candidate-*Akkermansia muciniphila*. *Journal of Applied Microbiology*, *130*(6), 1813–1822. <https://doi.org/10.1111/JAM.14911>
- Choi, Y., Bose, S., Seo, J., Shin, J. H., Lee, D., Kim, Y., Kang, S. G., & Kim, H. (2021). Effects of Live and Pasteurized Forms of *Akkermansia* from the Human Gut on Obesity and Metabolic Dysregulation. *Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 2039*, *9*(10), 2039. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9102039>
- Colom, J., Freitas, D., Simon, A., Brodkorb, A., Buckley, M., Deaton, J., & Winger, A. M. (2021). Presence and Germination of the Probiotic *Bacillus subtilis* DE111® in

- the Human Small Intestinal Tract: A Randomized, Crossover, Double-Blind, and Placebo-Controlled Study. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.715863/FULL>
- Dürre, P. (2014). Physiology and Sporulation in Clostridium. *Microbiology Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.TBS-0010-2012>
- EFSA. (2017). Safety and efficacy of Bacillus subtilis PB6 (Bacillus subtilis ATCC PTA-6737) as a feed additive for sows. *EFSA Journal*, 15(5). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4855>
- Endres, J. R., Clewell, A., Jade, K. A., Farber, T., Hauswirth, J., & Schauss, A. G. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, Bacillus coagulans, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2009.02.018>
- Ferraris, L., Butel, M. J., & Aires, J. (2010). Antimicrobial susceptibility and resistance determinants of Clostridium butyricum isolates from preterm infants. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(5), 420–423. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.07.005>
- Ferreira-Halder, C. V., Faria, A. V. de S., & Andrade, S. S. (2017a). Action and function of Faecalibacterium prausnitzii in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(6), 643–648. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2017.09.011>
- Ferreira-Halder, C. V., Faria, A. V. de S., & Andrade, S. S. (2017b). Action and function of Faecalibacterium prausnitzii in health and disease. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 31(6), 643–648. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2017.09.011>
- Foditsch, C., Santos, T. M. A., Teixeira, A. G. V., Pereira, R. V. V., Dias, J. M., Gaeta, N., & Bicalho, R. C. (2014). Isolation and characterization of Faecalibacterium prausnitzii from calves and piglets. *PloS One*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116465>
- Foditsch, C., van Vleck Pereira, R., Ganda, E. K., Gomez, M. S., Marques, E. C., Santin, T., & Bicalho, R. C. (2015). Oral Administration of Faecalibacterium prausnitzii Decreased the Incidence of Severe Diarrhea and Related Mortality Rate and Increased Weight Gain in Preweaned Dairy Heifers. *PloS One*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0145485>

- García, J. P., Alzate, J. A., Hoyos, J. A., & Cristancho, E. (2021). Bacteremia after *Bacillus clausii* administration for the treatment of acute diarrhea: A case report. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *41*(Sp. 2), 1–22. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5662>
- Ghosh, A., Sundaram, B., Bhattacharya, P., Mohanty, N., Dheivamani, N., Mane, S., Acharyya, B., Kamale, V., Poddar, S., Khobragade, A., Thomas, W., Prabhudesai, S., Choudhary, A., & Mitra, M. (2021). Effect of *Saccharomyces boulardii* CNCM-I 3799 and *Bacillus subtilis* CU-1 on Acute Watery Diarrhea: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study in Indian Children. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, *24*(5), 423–431. <https://doi.org/10.5223/PGHN.2021.24.5.423>
- Gomi, A., Iino, T., Nonaka, C., Miyazaki, K., & Ishikawa, F. (2015). Health benefits of fermented milk containing *Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 on gastric symptoms in adults. *Journal of Dairy Science*, *98*(4), 2277–2283. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-9158>
- Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. (2012). *EFSA Journal*, *10*(6). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2012.2740>
- Gupta, A. K., & Maity, C. (2021). Efficacy and safety of *Bacillus coagulans* LBSC in irritable bowel syndrome: A prospective, interventional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study [CONSORT Compliant]. *Medicine*, *100*(3), e23641. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023641>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Howarth, G. S., & Wang, H. (2013). Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, *5*(1), 58–81. <https://doi.org/10.3390/NU5010058>
- Hu, W., Gao, W., Liu, Z., Fang, Z., Zhao, J., Zhang, H., Lu, W., & Chen, W. (2022a). Biodiversity and Physiological Characteristics of Novel *Faecalibacterium*

- prausnitzii Strains Isolated from Human Feces. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020297>
- Hu, W., Gao, W., Liu, Z., Fang, Z., Zhao, J., Zhang, H., Lu, W., & Chen, W. (2022b). Biodiversity and Physiological Characteristics of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Human Feces. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020297>
- Hu, W., Lu, W., Li, L., Zhang, H., Lee, Y. kun, Chen, W., & Zhao, J. (2021). Both living and dead Faecalibacterium prausnitzii alleviate house dust mite-induced allergic asthma through the modulation of gut microbiota and short-chain fatty acid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5563–5573. <https://doi.org/10.1002/JSFA.11207>
- Hun, L. (2009). Bacillus coagulans significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgraduate Medicine*, 121(2), 119–124. <https://doi.org/10.3810/PGM.2009.03.1984>
- Isa, K., Oka, K., Beauchamp, N., Sato, M., Wada, K., Ohtani, K., Nakanishi, S., McCartney, E., Tanaka, M., Shimizu, T., Kamiya, S., Kruger, C., & Takahashi, M. (2016). Safety assessment of the Clostridium butyricum MIYAIRI 588® probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of Clostridium toxin genes in vitro and teratogenicity in vivo. *Human & Experimental Toxicology*, 35(8), 818–832. <https://doi.org/10.1177/0960327115607372>
- Jensen, G. S., Cash, H. A., Farmer, S., & Keller, D. (2017). Inactivated probiotic Bacillus coagulans GBI-30 induces complex immune activating, anti-inflammatory, and regenerative markers in vitro. *Journal of Inflammation Research*, 10, 107. <https://doi.org/10.2147/JIR.S141660>
- Jezewska-Frackowiak, J., Seroczynska, K., Banaszczyk, J., Jedrzejczak, G., Zyllicz-Stachula, A., & Skowron, P. M. (2018). The promises and risks of probiotic Bacillus species. *Acta Biochimica Polonica*, 65(4), 509–519. https://doi.org/10.18388/ABP.2018_2652
- Keller, D., Verbruggen, S., Cash, H., Farmer, S., & Venema, K. (2019). Spores of bacillus coagulans GBI-30, 6086 show high germination, survival and enzyme activity in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, 10(1), 77–87. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0037>
- Khan, M. T., van Dijk, J. M., & Harmsen, H. J. M. (2014). Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium

- Faecalibacterium prausnitzii alive at ambient air. *PloS One*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096097>
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., & Pogliano, K. (2020). Shaping an Endospore: Architectural Transformations During *Bacillus subtilis* Sporulation. *Annual Review of Microbiology*, 74, 361. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-022520-074650>
- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. (2019). Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1335–1340. <https://doi.org/10.4014/JMB.1906.06064>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., de Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., ... Herman, L. (2022). Update of the list of QPS-recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 16: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2022. *EFSA Journal*, 20(7). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2022.7408>
- Kumar, V. V., Sudha, K. M., Bennur, S., & Dhanasekar, K. R. (2020). A prospective, randomized, open-label, placebo-controlled comparative study of *Bacillus coagulans* GBI-30,6086 with digestive enzymes in improving indigestion in geriatric population. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(2), 1108. https://doi.org/10.4103/JFMPC.JFMPC_922_19
- Labellarte, G., Maher, M., Labellarte, G., & Maher, M. (2019). Tolerance and Effect of a Probiotic Supplement Delivered in Capsule Form. *Food and Nutrition Sciences*, 10(6), 626–634. <https://doi.org/10.4236/FNS.2019.106046>
- Lakshmi, S. G., Jayanthi, N., Saravanan, M., & Ratna, M. S. (2017). Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. *Toxicology Reports*, 4, 62–71. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2016.12.004>
- Lee, N.-K., Kim, W.-S., & Paik, H.-D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1297–1305. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9>
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., Simon, R., Pélerin, F., Jüsten, P., & Urdaci, M. C. (2017). Safety assessment of

- Bacillus subtilis CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, 54–65. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2016.11.010>
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Ripert, G., Housez, B., Cazaubiel, M., Maudet, C., Jüsten, P., Marteau, P., & Urdaci, M. C. (2015). Probiotic strain Bacillus subtilis CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: A randomized, double-blind placebo-controlled study. *Immunity and Ageing*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12979-015-0051-Y/FIGURES/5>
- Leylabadlo, H. E., Ghotaslou, R., Feizabadi, M. M., Farajnia, S., Moaddab, S. Y., Ganbarov, K., Khodadadi, E., Tanomand, A., Sheykhsaran, E., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2020). The critical role of Faecalibacterium prausnitzii in human health: An overview. *Microbial Pathogenesis*, 149. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104344>
- Li, S., Zhang, X., Li, Y., Tao, L., & Li, T. (2020). Optimization of pH conditions to improve the spore production of Clostridium butyricum NN-2 during fermentation process. *Archives of Microbiology*, 202(5), 1251–1256. <https://doi.org/10.1007/S00203-020-01820-3>
- Liang, J., Kou, S., Chen, C., Raza, S. H. A., Wang, S., Ma, X., Zhang, W. J., & Nie, C. (2021). Effects of Clostridium butyricum on growth performance, metabonomics and intestinal microbial differences of weaned piglets. *BMC Microbiology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02143-Z>
- Machado, D., Barbosa, J. C., Domingos, M., Almeida, D., Andrade, J. C., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. (2022). Revealing antimicrobial resistance profile of the novel probiotic candidate Faecalibacterium prausnitzii DSM 17677. *International Journal of Food Microbiology*, 363. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109501>
- Majeed, M., Majeed, S., Arumugam, S., Ali, F., & Beede, K. (2021). Comparative evaluation for thermostability and gastrointestinal survival of probiotic Bacillus coagulans MTCC 5856. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 85(4), 962–971. <https://doi.org/10.1093/BBB/ZBAA116>
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2019). Evaluation of probiotic Bacillus coagulans MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 121, 497–505. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.12.003>
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Majeed, S., & Ali, F. (2018). Bacillus coagulans MTCC 5856 for the management of major depression with irritable bowel

- syndrome: a randomised, double-blind, placebo controlled, multi-centre, pilot clinical study. *Food & Nutrition Research*, 62. <https://doi.org/10.29219/FNR.V62.1218>
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F., Pande, A., Majeed, S., & Karri, S. K. (2016). Bacillus coagulans MTCC 5856 supplementation in the management of diarrhea predominant Irritable Bowel Syndrome: a double blind randomized placebo controlled pilot clinical study. *Nutrition Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12937-016-0140-6>
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Eshuis-de Ruyter, T., Booij-Veurink, J., de Vries, Y. P., & Ali, F. (2016). Evaluation of genetic and phenotypic consistency of Bacillus coagulans MTCC 5856: a commercial probiotic strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(4), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S11274-016-2027-2>
- Mandel, D. R., Eichas, K., & Holmes, J. (2010). Bacillus coagulans: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-1>
- María Remes Troche, J., Coss Adame, E., Ángel Valdovinos Díaz, M., Gómez Escudero, O., Eugenia Icaza Chávez, M., Antonio Chávez-Barrera, J., Zárate Mondragón, F., Antonio Ruíz Velarde Velasco, J., Rafael Aceves Tavares, G., Antonio Lira Pedrín, M., Cerda Contreras, E., Carmona Sánchez, R. I., Guerra López, H., & Solana Ortiz, R. (2020). Lactobacillus acidophilus LB: a useful pharmabiotic for the treatment of digestive disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 13. <https://doi.org/10.1177/1756284820971201>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/NU9091021>
- Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berteau, O., Azevedo, V., Chatel, J. M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., Thomas, M., & Langella, P. (2017). Functional Characterization of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of F. prausnitzii as a Next-Generation Probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01226>

- Mills, J. P., Rao, K., & Young, V. B. (2018). Probiotics for Prevention of Clostridium difficile Infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, 34(1), 3. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410>
- Mokhtari, S., Jafari, S. M., & Khomeiri, M. (2019). Survival of encapsulated probiotics in pasteurized grape juice and evaluation of their properties during storage. *Food Science and Technology International = Ciencia y Tecnologia de Los Alimentos Internacional*, 25(2), 120–129. <https://doi.org/10.1177/1082013218801113>
- Okamoto, K., Fujiya, M., Nata, T., Ueno, N., Inaba, Y., Ishikawa, C., Ito, T., Moriichi, K., Tanabe, H., Mizukami, Y., Chang, E. B., & Kohgo, Y. (2012). Competence and sporulation factor derived from Bacillus subtilis improves epithelial cell injury in intestinal inflammation via immunomodulation and cytoprotection. *International Journal of Colorectal Disease*, 27(8), 1039–1046. <https://doi.org/10.1007/S00384-012-1416-8>
- Paytuví-Gallart, A., Sanseverino, W., & Winger, A. M. (2020). Daily intake of probiotic strain Bacillus subtilis DE111 supports a healthy microbiome in children attending day-care. *Beneficial Microbes*, 11(7), 611–620. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0022>
- Penet, C., Kramer, R., Little, R., L. Spears, J., Parker, J., K. Iyer, J., Guthrie, N., & Evans, M. (2021, June 27). A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel Study Evaluating the Efficacy of Bacillus subtilis MB40 to Reduce Abdominal Discomfort, Gas, and Bloating - PubMed. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 146–157. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.sabidi.urv.cat/31719214/>
- Prince, T., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2012). Lactobacillus reuteri protects epidermal keratinocytes from Staphylococcus aureus-induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5119–5126. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-12>
- Raddadi, N., Cherif, A., & Daffonchio, D. (1996). Bacillus. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, 219–229. https://doi.org/10.5005/jp/books/12697_30
- Raise, A., Dupont, S., Iaconelli, C., Caliri, C., Charriau, A., Gervais, P., Chambin, O., & Beney, L. (2020). Comparison of two encapsulation processes to protect the commensal gut probiotic bacterium Faecalibacterium prausnitzii from the digestive tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101608. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101608>

- Richard, V., van der Auwera, P., Snoeck, R., Daneau, D., & Meunier, F. (1988). Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 7(6), 783–785. <https://doi.org/10.1007/BF01975049>
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Villa, R. E., Wallace, R. J., ... Saarela, M. (2017). Safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis* ATCC PTA-6737) as a feed additive for sows. *EFSA Journal. European Food Safety Authority*, 15(5). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4855>
- Safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis*) as a feed additive for chickens for fattening. (2009). *EFSA Journal*, 7(9). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2009.1314>
- Safety and efficacy of Miya-Gold®S (*Clostridium butyricum*) as feed additive for chickens for fattening. (2009). *EFSA Journal*, 7(4). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2009.1039>
- Salveti, E., Orrù, L., Capozzi, V., Martina, A., Lamontanara, A., Keller, D., Cash, H., Felis, G. E., Cattivelli, L., Torriani, S., & Spano, G. (2016). Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4595–4605. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7416-9>
- Shinde, T., Vemuri, R., Shastri, M. D., Perera, A. P., Tristram, S., Stanley, R., & Eri, R. (2019). Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *Journal of Functional Foods*, 52, 100–108. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.10.031>
- Soares, M. B., Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C. R., Pereira, E. P. R., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., & Sant'Ana, A. S. (2019). Behavior of different *Bacillus* strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 307. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108288>
- Sokol, H., Landman, C., Seksik, P., Berard, L., Montil, M., Nion-Larmurier, I., Bourrier, A., le Gall, G., Lalande, V., de Rougemont, A., Kirchgesner, J., Daguanel, A., Cachanado, M., Rousseau, A., Drouet, É., Rosenzweig, M., Hagege, H., Dray, X.,

- Klatzman, D., ... Simon, T. (2020). Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn's disease: a pilot randomized controlled study. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S40168-020-0792-5>
- Spears, J. L., Kramer, R., Nikiforov, A. I., Rihner, M. O., & Lambert, E. A. (2021). Safety Assessment of *Bacillus subtilis* MB40 for Use in Foods and Dietary Supplements. *Nutrients*, 13(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/NU13030733>
- Stoeva, M. K., Garcia-So, J., Justice, N., Myers, J., Tyagi, S., Nemchek, M., McMurdie, P. J., Kolterman, O., & Eid, J. (2021a). Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–28. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1907272>
- Stoeva, M. K., Garcia-So, J., Justice, N., Myers, J., Tyagi, S., Nemchek, M., McMurdie, P. J., Kolterman, O., & Eid, J. (2021b). Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–28. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1907272>
- Sulthana, A., Thorramamidi, A., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2019). Whole-Genome Shotgun Sequencing and Characterization of Probiotic Strain *Clostridium butyricum* UBCB 70 To Assess Its Safety. *Microbiology Resource Announcements*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/MRA.01732-18>
- Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(10), 1149–1157. <https://doi.org/10.1111/APT.13404>
- Urdaci, M. C., Lefevre, M., Lafforgue, G., Cartier, C., Rodriguez, B., & Fioramonti, J. (2018). Antidiarrheal Action of *Bacillus subtilis* CUI CNCM I-2745 and *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4547 in Mice. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01537>
- U.S. Food & Drug Administration. (2016). *GRAS Notice 660, Bacillus coagulans GBI-30*, 6086. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>
- U.S. Food & Drug Administration. (2018). *GRAS Notice 831, Bacillus subtilis DE111*. <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>
- U.S. Food & Drug Administration. (2020). *GRAS Notice 995, Bacillus subtilis MB40*.

- World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 85, 1–50.
- Yahav, S., Berkovich, Z., Ostrov, I., Reifen, R., & Shemesh, M. (2018). Encapsulation of beneficial probiotic bacteria in extracellular matrix from biofilm-forming *Bacillus subtilis*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2), 974–982. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1476373>
- Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H., & Zhang, F. (2019). *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microbial Biotechnology*, 12(6), 1109. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13410>

12. Fitxa de seguiment del tutor

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumna JÚLIA ÀLVARO SERRANO

Nom i Cognoms del Tutor Albert Bordons

Data de la entrevista amb l'alumna (1) dv 4 mar 2022
(2) dc 23 mar 2022
(3) dt 10 maig 2022
(4) per email: 23 maig, 26 maig

Recomanacions durant el seguiment

- (1) Vol fer de tema Probiòtics TFG Biblio, Begoña li ha dit que parli amb mi. Està fent Pràct Ext a Delafruit Fruselva, Selva del Camp (hi treballen 2 biotecs: Ana Rodríguez i Lucía Abarrategui), que fan proves per utilitzar *Bacillus* com a probiòtics. Proposo tema TFG sigui probiòtics esporulats, avantatges. Li passo info del meu post i assignatura AFCBN.
- (2) RC m'ha assignat com a seu tutor. Comentem estructura del TFG bibliogràfic. Intro sobre probiòtics i esporulats, i justificació, interès a Fruselva i proves que fan; i després desenvolupar aspectes de selecció, legislació, tecnologia, conservació, seguretat etc.
- (3) Comentem dubtes que té sobre estructura memòria, tenint en compte que és TFG bibliogràfic. Aviat em passarà esborrany.
- (4) A mitjans de maig em va passant esborranys de memòria i li vaig corregint i recomanant alguns canvis.

Observacions: Cap, tot correcte.

Observacions Darrera revisió: Tot correcte.

Signatura del Tutor

Signatura de l'Alumna

Tarragona a 26 de maig de 2022