

DISS. ETH NO. 18419

**NOVEL TECHNOLOGICAL APPROACHES TO
ENHANCE STRESS TOLERANCE OF
BIFIDOBACTERIUM LONGUM NCC2705 CELLS
USING CONTINUOUS CULTURES**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

VALERIA MOZZETTI

Dipl. Lm.-Ing. ETH

Date of birth

November 10th, 1980

citizen of

Vogorno, Ticino

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix

Prof. Dr. Leo Meile

Dr. Bernard Berger

2009

Summary

The efficient delivery of live cultures in high concentrations at their site of action represents a major challenge in probiotic product development. Application of probiotics as food additives is hampered by their fastidious production and their sensitivity to environmental stresses. Possibilities to produce more robust probiotics include exposition of the cells to sublethal stresses during production, and isolation of resistant strains under selective pressure. Based on the observation that continuous cultures have been used for producing cells with constant physiology over time (Hoskisson and Hobbs 2005) and also in combination with selective pressure for selection of resistant strains to antibiotics (Noack et al. 1988; Butler et al. 1996), two hypotheses were tested in this dissertation. First, that continuous culture could be used to produce cells with constant physiology over time to efficiently screen for sublethal stresses. Secondly, that continuous culture in combination with immobilized cell technology and selective pressure could be used for selection of stress resistant strains.

The prerequisite for using continuous culture in stress screening is the physiological stability of continuously produced cells. In Chapter 2, the potential of continuous culture mode with conditions set to produce late exponential growth phase cells for screening of sublethal stresses was assessed using *Bifidobacterium longum* NCC2705. Physiological parameters as viable cell counts, production of metabolites, susceptibility to antibiotics, and stress conditions showed either stable or only moderate changes over 211 h culturing time. The comparison of gene transcription profiles between samples collected after 31 h of continuous culturing, and those collected after 134 h, and 211 h revealed only limited changes in expression profiles i.e., 1.0 and 3.8 % of total genes, respectively. These minimal changes in time showed that continuous culture can be used to produce physiological stable bacterial cells suitable for fast and efficient screening of sublethal stress conditions.

In Chapter 3, a stable 2-stage continuous culture of *B. longum* NCC2705 was used for fast screening of sublethal stresses and to test the effects of such stresses on cell survival to lethal stresses. Different stress pretreatments of 42 min were tested in the second stage: combinations of pH (6.0, 5.0 and 4.0), temperature (37, 45 and 47°C) and NaCl concentration (0, 5 and 10%) were tested using a 3 by 3 factorial design. This 2-stage

continuous culture design allowed fast and efficient screening of several stress pretreatments during the same culture experiment, up to four different stress pretreatments tested per day with conditions of this study. Of all tested combinations, only those with pH 4.0 significantly affected cell viability compared to control conditions (37°C, pH 6.0, 0% NaCl), and thus could not be considered as sublethal stresses. Pretreatments with 5 or 10% NaCl had a negative effect on cell viability after gastric lethal stress. A significant improvement in cell resistance to a heat lethal stress (56°C, 5 min) was observed for cells pretreated at 47°C. In contrast, heat pretreatments negatively affected cell viability after freeze drying and osmotic lethal stresses. Selected stress pretreatments (pH 4.0; 47°C; 10% NaCl; 47°C+10% NaCl; and pH 4.0+10% NaCl) applied to early stationary phase cells during batch cultures produced similar effects compared to continuous culture, showing that continuous culture permits to select sublethal stress conditions which can be then applied for traditional batch cultures.

Another possibility to produce more robust probiotics is by selection of resistant strains during growth under selective pressure. Chapter 4 presents a new method to isolate resistant strains to oxidative stress using continuous culture. Continuous culture with selective pressure was combined with immobilized cell technology, which allowed to achieve very high cell densities in the bioreactor of 10^{13} CFU l^{-1} without stress application. The continuous culture gradually adapted to increasing H_2O_2 concentrations, as shown by the optical density of culture effluent which dropped after each increase of H_2O_2 concentration and then increased again. However, at day 9 after increasing the H_2O_2 concentration to a high value of 130 ppm the OD of the culture decreased to 0. Full wash out was prevented by immobilization of cells in gel beads. Hence after stopping the stress, it was possible to re-grow the cells that survived the lethal level of H_2O_2 and to isolate two adapted variants (HPR1 and HPR2). In contrast to HPR1, HPR2 showed stable characteristics over at least 70 generations. HPR2 exhibited higher also tolerance to O_2 than non adapted wild type cells. Preliminary characterization showed that 2 genes coding for a protein with unknown function possessing trans-membrane domains and an ABC-type transporter protein were overexpressed in HPR2 cells. This study showed that continuous culture with cell immobilization is a powerful approach for selecting cells adapted to hydrogen peroxide.

In this dissertation, two novel approaches using continuous cultures for improving cell robustness of probiotic microorganisms were designed and experimentally validated. Continuous culture was successfully applied for screening sublethal stresses and, together with immobilized cell technology and selective pressure, was used for selection of *Bifidobacterium* cells resistant to oxidative stress. Our study opens new doors for technological optimization of sensitive strains and their utilization in food products.

Riassunto

I probiotici sono dei microorganismi molto usati nell'industria alimentare, poiché quando ingeriti in quantità adatte sono benefici alla salute (FAO/WHO 2002). Un efficiente apporto di colture vive ad alta concentrazione nel loro luogo d'azione rappresenta una delle maggiori sfide nello sviluppo di prodotti contenenti probiotici. Infatti, l'utilizzo di probiotici come additivi alimentari è ostacolato dalla loro produzione esigente e dalla loro sensibilità agli stress ambientali. Possibilità di produrre probiotici più robusti includono l'esposizione delle cellule a stress sub-letali durante la produzione e l'isolamento di ceppi genetici resistenti usando delle pressioni di selezione. La ricerca di stress sub-letali e l'isolamento di ceppi genetici adatti richiedono tuttavia molto tempo. Le cosiddette "colture continue" permettono di aumentare l'efficacia della ricerca poiché permettono di produrre cellule con una fisiologia costante nel tempo (Hoskisson and Hobbs 2005). Inoltre, in combinazione con una pressione di selezione adeguata, esse permettono per esempio d'isolare ceppi resistenti agli antibiotici (Noack et al. 1988; Butler et al. 1996). Basandosi su queste osservazioni, questa dissertazione di dottorato presenta l'esame di 2 ipotesi per l'uso delle colture continue di probiotici. La prima ipotesi postulò che la coltura continua potesse essere usata per produrre cellule di probiotici con fisiologia costante nel tempo per fare uno screening di stress sub-letali. La seconda fu che la coltura continua in combinazione con la tecnologia di cellule immobilizzate e una pressione di selezione potesse essere usata per isolare ceppi resistenti allo stress. Il prerequisito per utilizzare la coltura continua per fare uno screening sugli stress è la stabilità fisiologica delle cellule prodotte con questo sistema.

Dopo un'introduzione al tema, il secondo capitolo di questa dissertazione presenta la verifica di questo prerequisito: il potenziale del metodo di coltura continua con parametri scelti per produrre cellule alla fine della fase esponenziale di crescita per fare uno screening di stress sub-letali è stato testato usando il batterio *Bifidobacterium longum* NCC2705. Il risultato principale fu che i parametri fisiologici come il numero di cellule vive, la produzione di metaboliti, la suscettibilità agli antibiotici e alle condizioni di stress rimasero stabili o mostrarono solamente cambiamenti minori sulle 211 h di coltivazione. Inoltre, il paragone tra i profili d'espressione genetica tra i campioni raccolti dopo 31 h di coltura continua e quelli raccolti dopo 134 h e 211 h hanno rivelato solo lievi

cambiamenti nei profili d'espressione: solo, rispettivamente, 1.0 e 3.8 % del totale dei geni espressi erano indotti o repressi. Questi cambiamenti minimi nel tempo mostrano che la coltura continua può essere utilizzata per produrre cellule batteriche con fisiologia stabile adatte per fare uno screening veloce ed efficiente sugli stress sub-letali.

Nel terzo capitolo della dissertazione viene descritta questa ricerca di stress sub-letali atti a produrre bifidobatteri più robusti. Il primo di due stadi di un bioreattore permise di mantenere una coltura continua di *B. longum* NCC2705. Questi, in seguito, vennero sottoposti a diversi pretrattamenti di stress nel secondo stadio. L'efficacia di questo trattamento venne stabilita misurando la sopravvivenza delle cellule a stress letali. I pretrattamenti di stress consistevano in diverse combinazioni di pH (6.0, 5.0 e 4.0), temperatura (37, 45 e 47°C) e concentrazione di NaCl (0, 5, e 10 %). Queste combinazioni vennero applicate per 42 min usando uno schema fattoriale 3X3. La coltura continua a 2 livelli ha permesso di fare uno screening in modo veloce ed efficiente poiché, nelle condizioni usate in questo studio, fino a 4 pretrattamenti di stress potevano essere testati per giorno sulla stessa coltura. Tra tutte le combinazioni testate, quelle con pH 4.0 hanno influito sulla viabilità cellulare in paragone alle condizioni di controllo (37°C, pH 6.0, 0 % NaCl), e per questo non possono essere considerate come stress sub-letali. Pretrattamenti con 5 o 10 % NaCl hanno invece avuto un effetto negativo sulla viabilità cellulare unicamente dopo stress gastrici letali. Un miglioramento nella resistenza cellulare ad uno stress letale termico (56°C per 5 min) è stato osservato per cellule pretrattate a 47°C. Pretrattamenti di calore hanno avuto però un effetto negativo sulla viabilità cellulare dopo liofilizzazione e dopo un stress osmotico letale. Specifici pretrattamenti di stress (pH 4.0; 47°C; 10% NaCl; 47°C+10% NaCl; and pH 4.0+10% NaCl) vennero anche applicati su cellule all'inizio della fase stazionaria di crescita in colture in lotto (batch). Questo procedimento produsse effetti simili a quelli riscontrati in coltura continua, mostrando che essa permette di trovare gli stress sub-letali applicabili in seguito pure a tradizionali colture in lotto.

Un'altra possibilità di produrre probiotici più resistenti è l'isolamento di ceppi genetici durante una coltura sotto pressione di selezione. Nel capitolo 4 viene presentato un nuovo metodo per isolare ceppi resistenti allo stress ossidativo usando colture continue. Partendo dal presupposto che sottoporre i bifidobatteri a stress porterà all'apparizione di

ceppi più resistenti e che una densità cellulare più elevata porta ad una maggiore probabilità di mutazione; la coltura continua con pressione di selezione è stata combinata con la tecnologia di cellule immobilizzate, che ha permesso di raggiungere densità cellulari molto alte nel bioreattore di 10^{13} CFU l⁻¹ senza applicazione di stress. Sottoposta a crescenti concentrazioni di perossido d'idrogeno (H₂O₂), la coltura continua si è adattata gradualmente, come mostrato dall'evoluzione della densità ottica. Questa diminuiva dopo ogni aumento in concentrazione di H₂O₂ ed in seguito aumentava nuovamente. Dopo 9 giorni, dopo aver aumentato la concentrazione di H₂O₂ a 130 ppm, la densità ottica della coltura è scesa a 0. La completa eliminazione delle cellule dal bioreattore è stata evitata grazie all'immobilizzazione delle cellule in sfere di gel. Quindi dopo aver interrotto lo stress è stato possibile ricoltivare le cellule sopravvissute e di isolare 2 ceppi (HPR1 e HPR2) adattati allo stress di H₂O₂. Paragonato a HPR1, HPR2 ha dimostrato di possedere caratteristiche stabili per almeno 70 generazioni. Inoltre, HPR2 ha anche dimostrato di possedere una più alta tolleranza all'O₂ che cellule del ceppo originale non adattate allo stress. Una caratterizzazione preliminare ha mostrato che HPR2 mostra un'espressione indotta di due geni che codificano uno per una proteina con regioni transmembranari e funzione sconosciuta e l'altro per una proteina da trasporto del tipo ABC. Questo studio ha mostrato che la coltura continua con cellule immobilizzate è un approccio efficace per selezionare cellule adattate al H₂O₂.

In conclusione, questa dissertazione descrive la progettazione e la validazione sperimentale di due nuovi approcci con coltura continua per migliorare la resistenza cellulare dei microorganismi probiotici. La coltura continua è stata applicata per fare uno screening di stress sub-letali e, insieme alla tecnologia di cellule immobilizzate e a una pressione di selezione, è stata usata per isolare cellule di *Bifidobacterium* resistenti allo stress ossidativo. Il nostro studio apre nuove vie per l'ottimizzazione tecnologica di ceppi probiotici sensibili e per la loro utilizzazione in prodotti alimentari.