

# Gut bacterial fermentation of food by-products

Citation for published version (APA):

Bussolo de Souza, C. (2019). *Gut bacterial fermentation of food by-products*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20190213cb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2019

## DOI:

[10.26481/dis.20190213cb](https://doi.org/10.26481/dis.20190213cb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

# Summary

---

## Summary

The industrial processing of foods is responsible for generating enormous amounts of by-products that are underused and/or discarded. If inappropriately disposed off, they are a source of pollution. There is, therefore, an urgent need to find a sustainable solution to deal with food by-products. In the case of plant by-products, such as bagasses and peels, because of their fibre content, they may be reintroduced into food products as functional ingredients – aiming to improve intestinal health and energy metabolism via the gut microbiota.

In **Chapter 1** an overview is provided about the generation of food by-products and the paradox among food wastage, undernourishment and obesity. Brazil, as the largest producer of orange and passion fruit juices, and an important producer and consumer of cassava, generates considerable amounts of by-products originating from these processing. Cassava bagasse, orange bagasse and passion fruit peel are described.

The gut microbiota has emerged as an important environmental factor that can affect host metabolism, which can be modulated via diet – especially dietary fibres. A brief description of gastrointestinal tract functioning, gut microbiota and dietary fibres is given.

The problem of obesity and the influence of the gut microbiota on host metabolism is also reviewed in Chapter 1. Additionally, the main approach used in this research – the use of the TNO Intestinal Models (TIM- 1 and 2) is described.

The aim of the present research was to assess the potential prebiotic effects of a number of different (Brazilian) food by-products using an *in vitro* model of the proximal colon, either with microbiota from healthy individuals or from lean or obese individuals.

First, chemical characterization of eight food by-products (three cassava bagasses [CBs], two orange bagasses [OBs] and three passion fruit peels [PFPs]) and their respective alcohol insoluble solids (AIS) fractions is shown in **Chapter 2**. Digestibility experiments using the *in vitro* model TIM-1 with all CBs, one OB and one PFP are also described. Results revealed that for CBs, two samples (CB1 and CB2) were chemically more similar than CB3. CB3 had less starch and more pectin and non-starch polysaccharides (NSP) than the other two samples of CBs. Their AIS fractions were higher in pectin and (hemi)cellulose than the raw by-product. *In vitro* digestibility experiments indicated that ~12% of the starch present in CBs was resistant starch (RS).

Chemical analyses of OBs showed similarity between the two samples. High methylated pectin and small sugars (likely from residual juice) were the main components of OBs. AIS fractions of OBs were also composed of higher amounts

of pectin than their respective raw by-products. Digestibility experiments showed that 86.3% of glucose present as starch and small sugar was digestible. Two of the PFP samples (PFP1 and PFP2) had a similar chemical composition, with ~20% of pectin and ~16% of NSP (hemi)cellulose. PFP3, however, showed an unusual high amount of starch (38%), and it is likely that this sample was “contaminated” with starch or another by-product. Approximately 83% of this starch was digestible. AIS fractions of PFPs had similar pectin amount as the raw by-product.

Differences found in the chemical composition of by-products from different batches, and their AIS fractions may result in divergent fermentation profiles when fermented by the gut microbiota, and therefore such characterization is crucial regarding the use of prebiotics, when aiming for host and intestinal health.

**Chapter 3** describes the first set of experiments performed to test *in vitro* (in TIM-2) the potential prebiotic effect(s) of one sample of cassava bagasse (CB1) when using a microbiota originating from lean or obese individuals (from now on referred to as “lean and obese microbiota”). Overall, CB1 fermentation showed a pronounced bifidogenic effect in both microbiotas but resulted into otherwise different bacterial and metabolite profiles when using lean or obese microbiotas. This first study with CB1 resulted in promising results, and therefore a new set of experiments was performed with CB1 in order to see whether such results could be replicated – especially the bifidogenic effect. Additionally, the interplay between fermentation of different substrates by gut microbiota and host health is not completely understood. Therefore, in **Chapter 4** we tested all food by-products characterized in Chapter 2 – three CBs, two OBs and three PFPs, regarding the potential prebiotic effects using the same *in vitro* approach as in Chapter 3 – TIM-2. Also here, two sets of experiments – using faecal slurry from lean or obese individuals were performed. This chapter describes the effects that each food by-product had on the dynamics of bacterial fermentation. The results from this study showed that not only the two types of microbiota - lean and obese, metabolized the same by-products differently, but also chemically similar substrates, such as the two OBs, resulted in divergent effects on the microbiota composition and end-products generated. This study showed that food by-products have the potential to be used as an alternative tool to improve gut health and consequently host health in the context of obesity.

After experiments with the raw by-product, we wanted to assess whether the isolated fibres from food by-products would exert similar effects on the gut microbiota. Thus, AIS fractions of OBs (A-OB1 and A-OB2) and PFPs (A-PFP1 and A-PFP2) were used in *in vitro* fermentation experiments using a microbiota from healthy individuals, as described in **Chapter 5**. Through the analysis of

intermediate degradation products formed during fermentation we could investigate the bacterial utilization of the different monosaccharides present in these polysaccharides. This study confirmed the observation in Chapter 4, that, although A-OBs were chemically similar, their fermentation profile was different. Only through the analysis of intermediate products formed during fermentation it was possible to observe differences regarding the proportion of soluble to insoluble of each A-OB, and this difference may have influenced the dynamics of the gut microbiota, explaining the discrepancies found between the two different batches.

**Chapter 6** focuses on the differences in fermentation of two fibres – inulin and arabinogalactan, regarding their use by the microbiota from lean or obese individuals. This research showed that metabolism profile was indeed different when fermentation occurred in the lean or obese microbiotas. Importantly, these two fermentable fibres were found to modulate the obese microbiota towards a healthier milieu, reinforcing the fact that the use of prebiotics may represent an inexpensive and non-invasive way to tackle obesity.

The structural complexity of dietary fibre and their influence on the dynamics in changes of the gut microbiota is still not completely known. Therefore, in **Chapter 7** how the structure of pectins influenced the dynamics of the gut microbiota was investigated, regarding its potential to modulate composition and/or metabolic activity. Experiments were performed using TIM-2, using microbiota from healthy individuals, and nine structurally diverse pectins plus a pectic derivative rhamnogalacturonan I (RGI). This study helped to elucidate that the effects of pectins in the modulation of the gut microbiota was dependent on their structural features, and emphasized results in earlier chapters, which showed that substrates that are evaluated on their effect on the gut microbiota (composition and activity) should be structurally characterized, to be able to make structure-function relationships.

In **Chapter 8**, a general discussion of the results is provided, including some ideas for future research.

---

# Samenvatting

---

## Samenvatting

Het industrieel processen van voedsel is verantwoordelijk voor enorme hoeveelheden bijproducten die niet of nauwelijks in de voedingsbereiding gebruikt worden, of zelfs weg gegooid worden. In het laatste geval kunnen ze in sommige gevallen zelfs voor vervuiling van het milieu zorgen. Daarom is er urgent behoefte aan een duurzame oplossing voor het verwerken van voedsel bijproducten. In het geval van plantaardige bijproducten, zoals pulp en schillen, vanwege de aanwezigheid van (voedings)vezels, kunnen deze als functionele ingrediënten opnieuw geïntroduceerd worden in de voedingsketen – met als doel om darmgezondheid en energie metabolisme via de darm microbiota (vroeger darmflora genoemd) te verbeteren.

**Hoofdstuk 1** geeft een overzicht over het genereren van voedsel bijproducten en de paradox van voedsel verspilling, ondervoeding en obesitas. Brazilië, de grootste producent van sinaasappel- en passievruchtensappen, en een belangrijke producent en consument van cassave, genereert aanzienlijke hoeveelheden bijproducten die afkomstig zijn van deze verwerking. Cassave-pulp, sinaasappel-pulp en passievruchtenschillen worden in dit hoofdstuk beschreven.

De darm microbiota is recentelijk beschouwd als een belangrijke (omgevings)factor die het gastheer metabolisme kan beïnvloeden, en dat kan worden gemoduleerd via het dieet, met name door voedingsvezels. Een korte beschrijving van het functioneren van het maag-darmkanaal, darm microbiota en voedingsvezels wordt gegeven.

Het probleem van obesitas en de invloed van de darm microbiota op het gastheer metabolisme wordt ook besproken in **Hoofdstuk 1**. Daarnaast wordt de belangrijkste benadering die in dit onderzoek is gebruikt beschreven – het gebruik van de valideerde *in vitro* modellen van het maag-darm kanaal van TNO (TIM-1 en TIM-2).

Het doel van het huidige onderzoek was om de potentiële prebiotische effecten van een aantal verschillende (Braziliaanse) voedsel bijproducten te beoordelen met behulp van een *in vitro* model van de proximale colon (TIM-2), hetzij met een microbiota van gezonde individuen, of van obese personen vergeleken met personen met normaal gewicht. Dit staat beschreven in de andere hoofdstukken en wordt hieronder kort samengevat.

Ten eerste wordt de chemische karakterisering van acht voedsel bijproducten (drie monsters van cassave-pulpen [CB's], twee sinaasappel-pulpen [OB's] en drie passievruchtenschillen [PFP's]) en hun respectievelijke in alcohol-onoplosbare vaste stoffen (AIS)-fracties beschreven in **Hoofdstuk 2**. Verteerbaarheids-experimenten met behulp van het *in vitro* model TIM-1 met

alle CB's, één OB en één PFP worden ook beschreven. Uit de resultaten bleek dat voor CB's twee monsters (CB1 en CB2) chemisch meer vergelijkbaar waren dan CB3. CB3 had minder zetmeel en meer pectine en niet-zetmeel-polysacchariden (NSP) dan de andere twee monsters van CB's. Hun in alcohol onoplosbare vaste stoffen (AIS)-fracties waren hoger in pectine en (hemi) cellulose dan het ruwe bijproduct. Deze *in vitro* verteerbaarheids-experimenten toonden aan dat ~12% van het zetmeel dat aanwezig was in CB's resistent zetmeel (RS) was.

Chemische analyses van de OB's toonden gelijkens tussen de twee monsters aan. Hoog gemethyleerd pectine en kleine suikers (waarschijnlijk van resterend sap) waren de belangrijkste componenten van OB's. AIS-fracties van OB's waren ook samengesteld uit grotere hoeveelheden pectine dan hun respectieve ruwe bijproducten. Verteerbaarheids-experimenten toonden aan dat 86,3% van de aanwezige glucose als zetmeel en kleine suiker verteerbaar was.

Twee van de PFP-monsters (PFP1 en PFP2) hadden een vergelijkbare chemische samenstelling, met ~20% pectine en ~16% NSP (hemi (cellulose)). PFP3 vertoonde echter een ongewoon hoge hoeveelheid zetmeel (38%) en het is waarschijnlijk dat dit monster "verontreinigd" was met zetmeel of een ander bijproduct. Ongeveer 83% van dit zetmeel was verteerbaar. AIS-fracties van PFP's hadden een vergelijkbare pectine-hoeveelheid als het ruwe bijproduct.

Verschillen in de chemische samenstelling van bijproducten uit verschillende batches en hun AIS-fracties kunnen resulteren in afwijkende fermentatieprofielen wanneer ze worden gefermenteerd door de darm microbiota, en daarom is een dergelijke karakterisering van cruciaal belang met betrekking tot het gebruik van prebiotica bij het streven naar de gezondheid van de gastheer en de darm.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de eerste reeks experimenten die werden uitgevoerd om *in vitro* (in TIM-2) het potentiële prebiotische effect (de effecten) van één monster cassave-pulp (CB1) te testen bij gebruik van een microbiota afkomstig van normaal-gewicht of obese personen (vanaf nu verwezen als "gewoon en obese microbiota"). Over het geheel genomen vertoonde de CB1-fermentatie een uitgesproken bifidogeen effect in beide microbiota's maar resulteerde dit in anderszins verschillende bacteriële en metaboliet-profielen bij het gebruik van gewone of obese microbiota's.

Deze eerste studie met CB1 resulteerde in veelbelovende resultaten en daarom werd een nieuwe reeks experimenten uitgevoerd met CB1 om te zien of dergelijke resultaten konden worden gerepliceerd - met name het bifidogene effect. Bovendien is het samenspel tussen fermentatie van verschillende substraten door de darm microbiota en gastheer-gezondheid niet volledig begrepen. Daarom testten we in **Hoofdstuk 4** alle voedsel bijproducten gekarakteriseerd in Hoofdstuk 2 - drie CB's, twee OB's en drie PFP's, met



betrekking tot de potentiële prebiotische effecten met dezelfde *in vitro* benadering als in Hoofdstuk 3 - TIM-2. Ook hier werden twee reeksen experimenten uitgevoerd - met behulp van fecale slurry van gewone of obese personen. Dit hoofdstuk beschrijft de effecten die elk voedsel bijproduct had op de dynamiek van bacteriële fermentatie. De resultaten van deze studie toonden aan dat niet alleen de twee soorten microbiota - gewoon en obese - dezelfde bijproducten verschillend metaboliseerden, maar ook dat chemisch vergelijkbare substraten, zoals de twee OB's, resulteerden in uiteenlopende effecten op de samenstelling van de microbiota en eind-producten gegenereerd. Deze studie toonde aan dat voedsel bijproducten het potentieel hebben om te worden gebruikt als een alternatief hulpmiddel om de darmgezondheid en bijgevolg de gezondheid van de gastheer te verbeteren in de context van obesitas.

Na experimenten met het ruwe bijproduct wilden we beoordelen of de geïsoleerde vezels uit voedsel bijproducten vergelijkbare effecten zouden hebben op de darm microbiota. Aldus werden AIS-fracties van OB's (A-OB1 en A-OB2) en PFP's (A-PFP1 en A-PFP2) gebruikt in *in vitro* fermentatie-experimenten met behulp van een microbiota van gezonde individuen, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. Door de analyse van tussentijdse degradatieproducten gevormd tijdens fermentatie konden we het bacteriële verbruik van de verschillende monosacchariden aanwezig in deze polysacchariden onderzoeken. Deze studie bevestigde de observatie in Hoofdstuk 4 dat, hoewel A-OB's chemisch vergelijkbaar waren, hun fermentatieprofiel anders was. Enkel en alleen door de analyse van tussenproducten gevormd tijdens fermentatie was het mogelijk om verschillen te observeren met betrekking tot de verhouding van oplosbaar tot onoplosbaar vezel van elke A-OB, en dit verschil kan de dynamica van de darm microbiota beïnvloed hebben, wat de verschillen gevonden tussen de twee batches waarschijnlijk verklaard.

**Hoofdstuk 6** richt zich op de verschillen in fermentatie van twee fermenteerbare vezels - inuline en arabinogalactan, met betrekking tot het gebruik ervan door de microbiota van gewone of obese personen. Dit onderzoek toonde aan dat het metabolisme-profiel inderdaad anders was wanneer fermentatie plaatsvond in de gewone of obese microbiota's. Belangrijk is dat deze twee fermenteerbare vezels de obese microbiota naar een gezonder milieu lieten moduleren, wat het feit versterkt dat het gebruik van prebiotica een goedkope en niet-invasieve manier kan zijn om obesitas aan te pakken.

De structurele complexiteit van voedingsvezels en hun invloed op de dynamiek in veranderingen van de darm microbiota is nog steeds niet volledig bekend. Daarom werd in **Hoofdstuk 7** onderzocht hoe de structuur van pectines de

dynamica van de darm microbiota beïnvloedde, met betrekking tot het vermogen ervan om de samenstelling en/of metabolische activiteit te moduleren. Experimenten werden uitgevoerd in TIM-2, met behulp van een microbiota van gezonde individuen, en negen structureel verschillende pectines plus het pectisch derivaat rhamnogalacturonan I (RGI). Deze studie hielp om te verduidelijken dat de effecten van pectines in de modulatie van de darm microbiota afhankelijk waren van hun structurele kenmerken en benadrukte de resultaten in eerdere hoofdstukken, waaruit bleek dat substraten die worden geëvalueerd op hun effect op de darm microbiota (samenstelling en/of activiteit) qua structuur moet worden gekarakteriseerd, om structuur-functie relaties te kunnen maken/achterhalen.

In **Hoofdstuk 8** wordt een algemene bespreking van de resultaten gegeven, inclusief enkele ideeën voor toekomstig onderzoek.

