Oligosakkarider

- substrat til bakterierne i spædbarnets tarm.

Af Louise M. Arildsen Jakobsen,
Institut for Fødevarer,
Aarhus Universitet

Metabolomics kan anvendes som et værktøj til at forstå den biokemiske aktivitet af bakterier fra spædbarnets tarm og hvordan de påvirkes af specifikke kulhydratsubstrater. Ny viden om, hvordan tarmbakterier omsætter disse kulhydrater til bioaktive metabolitter, kan bidrage til udvikling af modermælkserstatning, der understøtter spædbarnets naturlige tarmmikrobiota og bidrager til barnets sundhed, blandt andet ved at forhindre vækst af sygdomsfremkaldende bakterier.

Spædbarnets tarm er spækket med bakterier - og det er godt

Vores krop er dækket af bakterier, der er specielt udviklet til at leve i helt specifikke biologiske nicher, såsom vores næsebor, vores hud og i mundhulen. Særligt mange bakterier har taget ophold i tyktarmen, hvor de blandt andet lever af præbiotika (se faktaboks 1), der kommer fra den mad, vi indtager. Bakterierne i tyktarmen har stor betydning for menneskets sundhed gennem deres produktion af kemiske forbindelser og metabolitter samt gennem interaktion med tarmvævet.

De første 1.000 dage af et barns liv (fra undfangelse til to års fødselsdag) er en særlig vigtig periode i forhold til at udvikle barnets tarmbakterier og sikre barnet en sund udvikling [1,2]. Hos spædbørn er der især fokus på mælkesyrebakterier såsom bifidobakterier og lactobacilli. Mælkesyre nedsætter tarmens pH og det ændrede kemiske miljø forhindrer vækst af sygdomsfremkaldende bakterier.

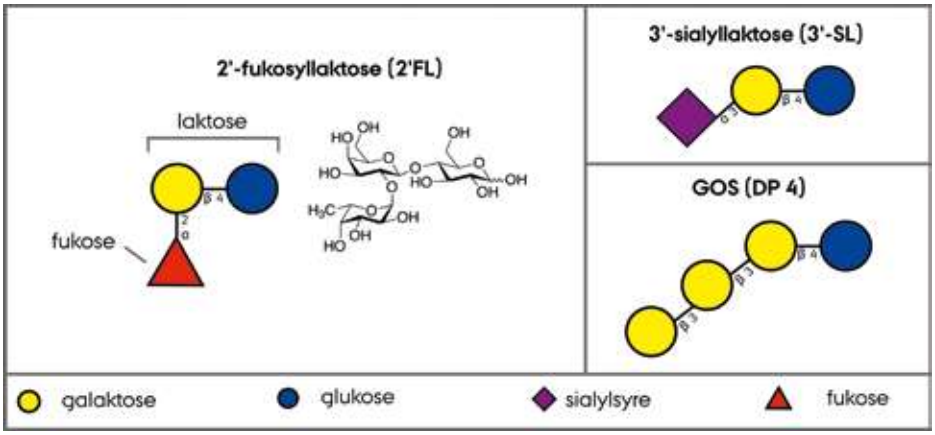
Modermælk - det hvide vidunder

Modermælk er spækket med vigtige næringsstoffer og bioaktive forbindelser til det nyfødte spædbarn. Indholdet af laktose, fedt og protein medvirker til, at barnet vokser og tager på. Den mælk, som moderen danner, er nøje målrettet spædbarnets behov. Man skulle tro, at alle indholdsstofferne i modermælk blev udnyttet til fulde af spædbarnet, men sådan er det ikke. Humane mælke-oligosakkarider (HMO) er det tredjestørste indholdsstof i modermælk og nedbrydes ikke af spædbarnet, men passerer fordøjelsessystemet og ender i tyktarmen, hvor det fungerer som næring for gavnlige bakterier og beskytter mod sygdomsfremkaldende bakterier. HMO er præbiotiske kulhydrater, hvilket vil sige, at de stimulerer væksten af gavnlige tarmbakterier. I de første dage efter fødsel er koncentrationen i modermælken >10 g/L, hvorefter koncentrationen falder til et stabilt niveau på ~4 g/L [3,4].

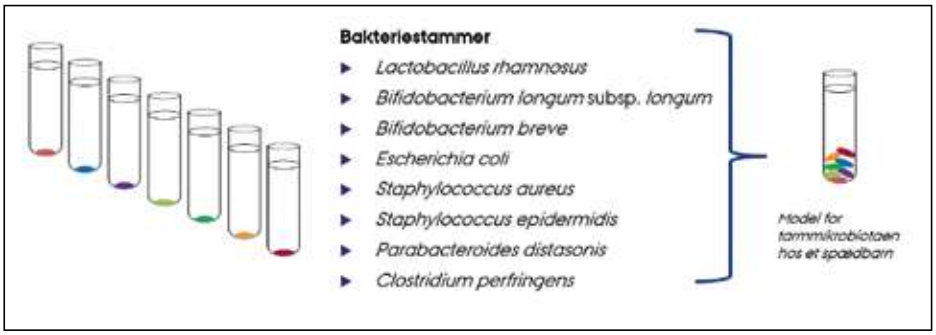
HMOer består af en laktoseenhed i den reducerende ende, som af β-glukosidbindinger forlænges med galaktose, og N-acetylglucosamin-enheder, hvilket danner en lineær eller forgrenet struktur [3] (figur 1). De terminale positioner kan være udstyret med fukose- eller sialylsyre-enheder, som sidder i α-position. Størstedelen (70-90 procent) af HMOerne i modermælk er neutrale med eller uden fukose i terminalposition, herunder kan nævnes lacto-N-tetraose (LNT) og 2-fukosyllaktose (2'FL) [4]. De sialylerede HMOer udgør de resterende 10-30 procent af HMOerne, hvoraf 6'-sialyllaktose og 3'-sialyllaktose findes i den største koncentration [4]. Analytiske studier baseret på massespektrometri har anslået, at der findes omtrent 200 forskellige HMOer, hvoraf strukturen af lidt over halvdelen er karakteriseret og beskrevet i litteraturen [5]. Det særlige ved oligosakkarider fra modermælk er, at selvom kæderne er korte, så fungerer de stadig som præbiotika, fordi bindingerne, der holder dem sammen, kun kan brydes med særlige enzymer.

Fødevarekemisk viden om oligosakkarider bidrager til at forbedre modermælkserstatning

Der er spædbørn, der af den ene eller den



Figur 1. Oligosakkarid er betegnelsen for kulhydrater med tre eller flere sakkarid-enheder. Alle oligosakkarider i mælk er opbygget med en kerne af laktose, med forgreninger af galaktose og eventuelt dekoreret med fukose og sialylsyre i terminale positioner. GOS: galaktooligosakkarid.



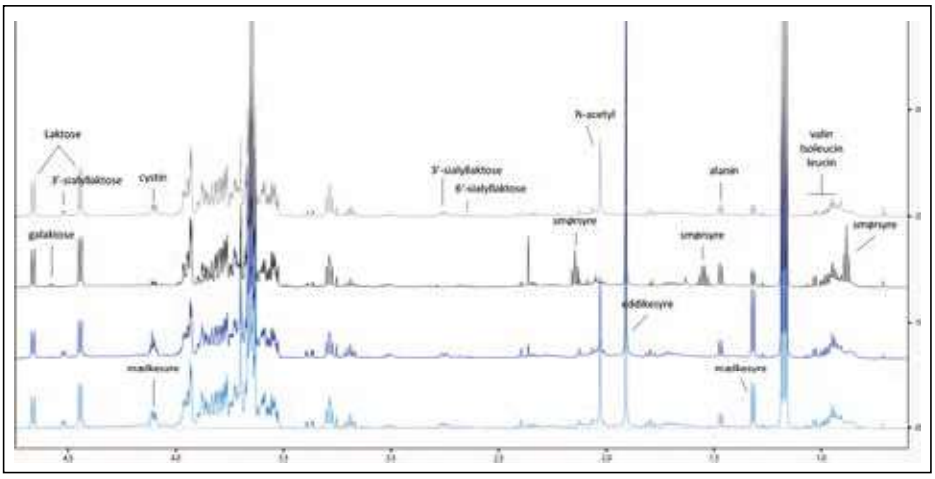
Figur 2. For at undersøge effekten af tildeling af forskellige substratsammensætninger blev der anvendt en bakteriekultur bestående af otte velkarakteriserede typestammer, som repræsenterer bakterierne i spædbarnets tarm. Modelforsøgene inkluderede både monokulturer samt en kultur med alle otte stammer.

anden grund ikke får modermælk. Det er svært at efterligne naturen, og forskning viser også, at der er stor forskel på tarmbakteriernes sammensætning hos børn, der har fået henholdsvis modermælk og modermælkserstatning [6,7]. Hvor de ammede børn har en simpel sammensætning med lav diversitet af tarmbakterier domineret af bifidobakterier og lactobacilli, er sammensætningen hos børn, der har fået modermælkserstatning mere kompleks [8,9], hvilket kan medføre forøget risiko for sygdom, fordi tarmen ikke er blevet modnet tilstrækkeligt, før den udsættes for komplekse påvirkninger [1].

Det er derfor vigtigt at undersøge kilder til præbiotiske kulhydrater, som tilnærmer sig effekten af de oligosakkarider, som findes naturligt i modermælk. De simpleste oligosakkarider kan produceres i laboratoriet, mens det endnu ikke er muligt at producere de mere komplekse oligosakkarider i kommerciel skala [10]. Oligosakkarider fra komælk er grundlæggende opbygget på samme måde som HMOerne, men findes i meget lavere koncentration i mælken og derudover er der kun omkring 40-50 oligosakkarider identificeret i komælk [11,12]. Modermælk og komælk har mindst 10 oligosakkaridstrukturer til fælles, men i komælk er det dog 3'-sialyllaktose og 6'-sialyllaktose, der dominerer, hvorimod neutrale eller fukosylerede oligosakkarider kun forekommer i små mængder [13]. Koncentrationen af oligosakkarider er relativt lav i komælk og derfor kan det ikke betale sig at oprense dem direkte fra mælken. Forskere har arbejdet målrettet på at løse denne udfordring, og det viser sig, at oligosakkarider findes i valle, der er et restprodukt fra osteproduktion. Ved hjælp af ultrafiltrering er det lykkedes at oprense oligosakkariderne til en koncentration, der kan bruges til at teste effekterne i modelforsøg i laboratoriet [14].

Bifidobakterierne skyder med skarpt

Ved at anvende en bakteriekultur bestående af otte bakteriestammer (figur 2), som er særligt velkarakteriserede og velkendte i spædbørns tyktarm, har vi undersøgt, hvordan bakterier påvirker hinanden for at opnå detaljeret viden om effekterne af oligosakkarider på bakteriernes biokemiske aktivitet og vækst i et komplekst system [15]. Bakteriekulturen indeholder blandt andet bifidobakterier, som hører til de ønskede bakterier i spædbarnets tarm, samt clostridier, der er potentielt sygdomsfremkaldende. Når bifidobakterier fermenterer kulhydrater i tarmen, dannes forskellige syrer, herunder kortkædede fedtsyrer og organiske syrer. Mængden af ikke-metaboliserede glykaner, kortkædede fedtsyrer og organiske syrer kan bruges som et direkte mål for, hvor aktiv tarmbakterierne er.



Figur 3. Den alifatiske region af ^{1}H NMR-spektre opnået fra supernatant fra 24 timers fermentering af medie indeholdende 1 procent oligosakkarid fra komælk plus laktose. Farverne af spektrene indikerer, hvilken bakterie der har været til stede: grå (top): ingen bakterie/sterilt medie, sort (2. fra top): *Clostridium perfringens*, mørkeblå (3. fra top): *Clostridium perfringens* i prefermenteret *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* medie, derefter blå (nederst): *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Dette spektrum viser, hvordan *C. perfringens* (sort) kan metabolisere 3'-sialyllaktose, dog ikke hvis mediet først har været fermenteret med *B. longum* (mørkeblå). Dette tyder på, at metabolitter fra *B. longum* hindrer *C. perfringens'* evne til at metabolisere denne oligosakkarid.

Ved at anvende kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi som metabolomics-metode har det været muligt at karakterisere den biokemiske aktivitet af bakterierne under forskellige betingelser. Anvendelsen af metabolomics har gjort det muligt på én og samme tid at bestemme et meget bredt sæt af metabolitter og dermed opnå indblik i, hvor biokemisk aktive bakterierne er ved tildeling af forskellige substratsammensætninger. Resultaterne fra et modelforsøg, der specifikt undersøgte interakti-

Faktaboks 1 - Præbiotika

Præbiotika er kulhydrater, der passerer fordøjelsessystemet uden at blive nedbrudt, men i tyktarmen omsættes de af tarmbakterierne, der forøges i antal og producerer metabolitter, som har en gavnlig virkning på tarmsystemet. Præbiotika er defineret af International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) [17] som:

"et substrat, der selektivt udnyttes af værtsmikroorganismer, hvilket resulterer i en sundhedsgevinst".

Galaktooligosakkarider (GOS) og fruktooligosakkarider (FOS) er velundersøgte præbiotika, som anvendes i modermælkserstatning. Disse oligosakkarider bliver fortrinsvist nedbrudt af bifidobakterier, hvilket skyldes forholdet mellem struktur og funktion; bindingerne i GOS og FOS bliver fortrinsvist nedbrudt af enzymer af typen β-fructanosidase og β-galactosidase, som er udbredte i bifidobakterier.

HMOer kategoriseres som præbiotika, idet indtagelse af modermælk medfører en forøgelse af HMO-omsættende bakterier *Bifidobacteriaceae* og *Bacteroidaceae*. Glykosidaser (EC 3.2.1.X), herunder fukosidaser, sialidaser og galactosidaser, er nødvendige for omsætning af HMO-strukturer og selvom disse udskilles af en række bakterier i tarmen, indeholder bifidobakteriers genom særligt mange elementer, der sikrer en effektiv udnyttelse af oligosakkarider fra modermælk [3]. Bifidobakterier har således en særlig evne til at mobilisere HMOer ind i cellerne og har derfor en konkurrencemæssig fordel i forhold til andre medlemmer af tarmmikrobiotaen. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* er den eneste bifidobakterie, der har alle enzymsystemer til at transportere og nedbryde alle HMO-strukturer [3]. Andre bifidobakterier er særligt tilpassede til at udnytte mindre dele af HMOerne.

oner mellem bifidobakterier og clostridia viste, at oligosakkariderne fra komælk i kombination med laktose stimulerede de gavnlige *Bifidobacterium longums* evne til at danne metabolitter såsom mælkesyre og eddikesyre, og at dette forhindrede sygdomsfremkaldende bakteriers evne til at nedbryde de selvsamme kulhydrater på trods af, at *Clostridium perfringens* har de nødvendige enzymer [16] (figur 3, side 11).

En af de vigtige mekanismer, der har relevans i forhold til undersøgelser af HMOernes virkninger på tarmmikobiotaen, er mikrobe-mikrobe-vekselvirkninger (se faktaboks 2), såsom cross-feeding af glykaner. Derudover kan de kortkædede fedtsyrer og organiske syrer beskytte mod diarré og bidrage til et sundere tarmvæv (mikrobe-vært-vekselvirkninger). Syrerne kan også sænke pH i tarmen. En lav pH-værdi i tarmen beskytter mod infektion med sygdomsfremkaldende bakterier.

Resultaterne fra *in vitro* modelforsøgene kan medvirke til at forbedre sammensætning af modermælkserstatning, så de børn, der ikke får modermælk, også kan få gavn af oligosakkarider og dermed en sund udvikling af tarmens bakteriesammensætning og beskyttelse mod infektioner. Perspektiverne er, at vi en dag vil have kortlagt, hvordan vi nøjagtigt skal sammensætte modermælkserstatning for at lave målrettede ændringer i sammensætningen af tarmbakterierne.

Denne artikel beskriver data fra Louise M.A. Jakobsens ph.d.-projekt, som blev udført i samarbejde med Arla Foods Ingredients P/S.

E-mail:
Louise M. Arildsen Jakobsen:
loujak@food.au.dk

Faktaboks 2 - Cross-feeding, en mikrobe-mikrobe vekselvirkning

Cross-feeding er en mekanisme, der foregår mellem bakterier, der lever i konsortier, for eksempel i tarmmikrobiotaen, hvor bakterierne gennem produktion af metabolitter/biprodukter medvirker til at styrke hinandens overlevelse enten ensidigt eller gensidigt. Der kan enten være cross-feeding af glykaner eller metabolitter. Metabolitter, herunder mælkesyre og eddikesyre, kan optages af smørsyre-producerende bakterier og derved indirekte øge smørsyre-koncentrationen i tarmmiljøet [19]. En høj koncentration af smørsyre har vist sig at have gavnlige effekter på tarmepitelet. Cross-feeding kan også ske gennem enzym-sekretion: nogle bifidobakterier, herunder *B. bifidum*, udskiller enzymer til omgivelserne, som frigiver mono- eller disakkarider fra HMOer, og som derved kan optages af andre bakterier med de rette transporterproteiner [18].

Andre mikrobe-mikrobe-vekselvirkninger

Synbiotisk vekselvirkning
Modelforsøg med den komplekse bakteriekultur pegede i retning af en vekselvirkning mellem *Parabacteroides distasonis* og *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, som var afhængig af, hvilket substrat der var tilgængeligt i mediet; oligosakkarider fra komælk i kombination med laktose resulterede i en øget vækst og metabolitproduktion fra *B. longum* [15]. Dette blev yderligere undersøgt og verificeret ved at have de to bakterier i en kultur sammen, hvorved det blev tydeligt, at *B. longum* subsp. *longum* bedre var i stand til at omsætte laktose, når *P. distasonis* også var tilstede i kulturen [16].
Postbiotisk vekselvirkning
I modsætning til synbiotisk vekselvirkning kan nævnes postbiotiske vekselvirkninger, hvor metabolitter fra *B. longum* subsp. *longum* viste sig at hæmme *C. perfringens*' evne til at metabolisere 3'-sialyllaktose [16].

Referencer
1. Laursen M.F., Bahl M.I., Michaelsen K.F., Licht T.R. First Foods and Gut Microbes. Front microbio. Frontiers Media SA; 2017; 8.
2. Selma-Royo M., Tarrazó M., García-Mantrana I., Gómez-Gallego C., Salminen S., Collado M.C. Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. Springer; 2019.
3. Sela D.A., Mills D.A. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacterial and milk oligosaccharides. Trends Microbio. 2010;18(7):298-307.
4. Ten Bruggencate S.J.M., Bovee-Oudenhoven I.M.J., Feitsma A.L., van Hoffen E., Schoterman M.H.C. Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides. Nutr Rev. 2014;72(6):377-89.
5. Ninonuevo M.R., Park Y., Yin H., Zhang J., Ward R.E., Clowers B.H., et al. A strategy for annotating the human milk glycome. Journal of agricultural and food chemistry. ACS Publications; 2006;54(20):7471-80.
6. Wang M., Li M., Wu S., Lebrilla C.B., Chapkin R.S., Ivanov I., et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. J Pediatr Gastroenterol Nutr. NIH Public Access; 2015;60(6):825-33.
7. Charbonneau M.R., O'Donnell D., Blanton L.V., Totten S.M., Davis J.C., Barratt M.J., et al. Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition. Cell. Elsevier; 2016;164(5):859-71.
8. Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G., et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr. LWW; 2000;30(1):61-7.
9. Lim E.S., Wang D., Holtz L.R. The Bacterial Microbiome and Virome Milestones of Infant Development. Trends Microbiol. Elsevier; 2016;24(10):801-10.
10. Zeuner B., Meyer A.S. På vej mod bedre modermælkserstatning. Dansk Kemi. TechMedia A/S; 2018;99(2):14-7.
11. Tao N., DePeters E., Freeman S., German J., Grimm R., Lebrilla C.B. Bovine milk glycome. J Dairy Sci. Elsevier; 2008;91(10):3768-78.
12. Aldredge D.L., Geronimo M.R., Hua S., Nwosu C.C., Lebrilla C.B., Barile D. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. Glycobiology. Soc Glycobiology; 2013;23(6):664-76.
13. Robinson R.C. Structures and metabolic properties of bovine milk oligosaccharides and their potential in the development of novel therapeutics. Frontiers in nutrition. Frontiers; 2019;6:50.
14. Barile D., Tao N., Lebrilla C.B., Coisson J-D., Arlorio M., German J.B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. Int Dairy J. Elsevier; 2009;19(9):524-30.
15. Jakobsen L.M., Sundekilde U.K., Andersen H.J., Nielsen D.S., Bertram H.C. Lactose and Bovine Milk Oligosaccharides Synergistically Stimulate B. longum subsp. longum Growth in a Simplified Model of the Infant Gut Microbiome. J Proteome Res. ACS Publications; 2019;18(8):3086-98.
16. Jakobsen L., Maldonado-Gómez M.X., Sundekilde U.K., Andersen H.J., Nielsen D.S., Bertram H.C. Metabolic Effects of Bovine Milk Oligosaccharides on Selected Commensals of the Infant Microbiome-Commensalism and Postbiotic Effects. Metabolites. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020;10(4):167.
17. Gibson G.R., Hutkins R.W., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. 2017.
18. Turroni F., Duranti S., Milani C., Lugli G.A., van Sinderen D., Ventura M. Bifidobacterium bifidum: a key member of the early human gut microbiota. Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019;7(11):544.
19. Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G., Holtrop G., Louis P., Lobley G.E., et al. Two routes of metabolic cross-feeding between Bifidobacterium adolescentis and butyrate-producing anaerobes from the human gut. Appl Environ Microbiol. 2006;72(5):3593-9.