

Præbiotika - Sundhedsfremmende ikke-fordøjelige kulhydrater

Hvordan tester vi om et ikke-fordøjeligt kulhydrat kan klassificeres som præbiotika?

Af ph.d. Louise Kristine Vignæs, postdoc, DTU Fødevareinstituttet og ph.d. Tine Rask Licht, professor, DTU Fødevareinstituttet

Siden begyndelsen af sidste århundrede er det blevet klart, at der eksisterer et symbiotisk forhold mellem tarmens bakterier og deres vært, mennesket. Ubalance i bakteriesammensætningen kan derfor have konsekvenser for værtens helbred. Ikke-fordøjelige kulhydrater, specielt præbiotika (faktaboks 1), kan selektivt stimulere væksten af gavnlige tarmbakterier og derved forbedre tarmmiljøet. Hvis et ikke-fordøjeligt kulhydrat skal kunne klassificeres som et præbiotika, er det nødvendigt med adskillige *in vitro*- og *in vivo*-studier for at validere det præbiotiske potentiale for det givne ikke-fordøjelige kulhydrat.

Tarmens bakterier og deres fordøjelse af næringsstoffer

Menneskets tarmkanal beboes af op til 100 billioner (10^{14}) bakterier, hvilket betyder, at der er 10 gange flere bakterier i tarmen end det totale antal af celler i menneskekroppen. Menneskets tarmmikrobiota er kompleks og består af mange forskellige bakteriepopulationer (figur 1). De lever i et gensidigt fordelagtigt forhold med deres vært, hvor de hjælper med at udvinde energi fra kostfibre, som menneskets egne fordøjelsesenzymer ikke er i stand til at nedbryde [1]. Når bakterierne nedbryder kostfibre i tyktarmen, dannes der forskellige metabolitter. De primære metabolitter er kortkædede fedtsyrer (dvs. eddikesyre, propionsyre, smørsyre og mælkesyre). Kortkædede fedtsyrer anses for at have en gavnlig effekt på menneskets sundhed. Eksempelvis har eddikesyre og mælkesyre vist sig at kunne hæmme væksten af patogene bakterier, propionsyre kan hæmme dannelse af kolesterol i leveren og smørsyre kan fremme anti-inflammatorisk immunrespons [2,3] (tabel 1).

Kort-kædede fedtsyrer	Bakteriegrupper involveret i dannelsen	Effekten af kort-kædede fedtsyrer
Eddikesyre	Bifidobakterier, bacteroides, laktobaciller, clostridia, eubacteria, propionibacteria, butyrivibrio	Hæmmer patogene bakterier
Propionsyre	bacteroides, propionibacteria	Hæmmer kolesterol syntese
Smørsyre	Clostridia, eubacteria, butyrivibrio	Fremmer anti-inflammatorisk immunrespons
Mælkesyre	Bacteroides, bifidobakterier, laktobaciller, eubacteria, clostridia	Hæmmer patogene bakterier

Tabel 1. Bakteriegrupper involveret i dannelsen af kortkædede fedtsyrer og fedtsyrernes effekt.

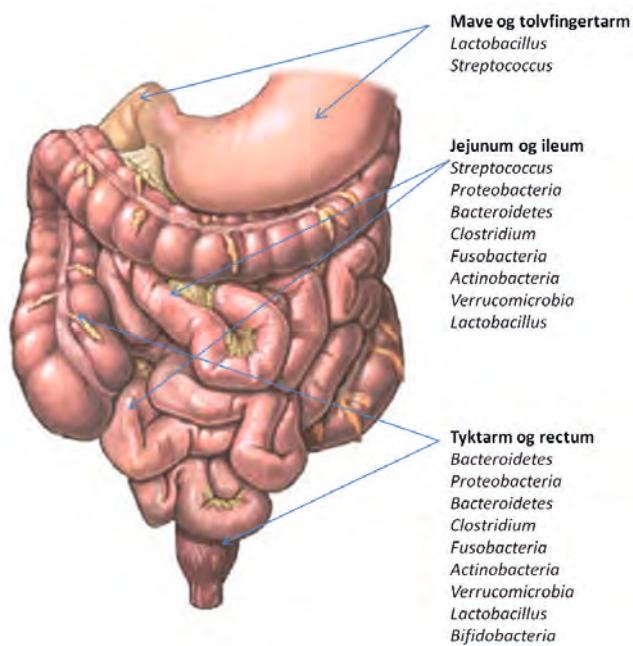
Modulering af bakteriekompositionen i tarmen vha. præbiotika

Det er vigtigt, at mennesket kan tolerere tilstedeværelsen af de mange bakterier, der bebor tarmen, og at immunsystemet ikke begynder at reagere unødvendigt på disse. En ubalance i tarmens mikrobiota med fremvækst af skadelige mikroorganismer kan hæmme tarmens normale funktioner. Der findes arter i tarmen som mælkesyrebakterierne *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*, der, hvis man forøger antallet af dem i tarmens økosystem, har en positiv effekt på tarmen [1,4,5]. Fødevarekomponenter, som præbiotika, kan anvendes til at forbedre sammensætningen af tarmmikrobiotaen ved bl.a. selektivt at stimulere væksten af laktobaciller og bifidobakterier. Præbiotika er typisk kort- eller langkædede (evt. forgrenede) kulhydrater. De kan være opbygget af forskellige typer monomerer, men fælles for dem er, at monomererne er bundet sammen med bindinger, som ikke kan nedbrydes af kroppens fordøjelsesenzymer, men derimod metaboliseres og udnyttes af specifikke bakterier.

Validering af præbiotisk effekt

For at et ikke-fordøjeligt kulhydrat skal kunne klassificeres som præbiotika, er det vigtigt, at det kan leve op til specificationer i præbiotika-definitionen. Dvs., at det ikke må blive nedbrudt af mavesyre eller menneskets fordøjelsesenzymer, og at det kan stimulere væksten og/eller aktiviteten af gavnlige tarmbakterier. Forsøg skal derfor udføres både *in vitro* (i laboratoriet) og *in vivo* (i levende værter) for at validere det præbiotiske potentiale for et givet ikke-fordøjeligt kulhydrat. I dag er der kun en lille delmængde af ikke-fordøjelige kulhydrater, der efter adskillige valideringsforsøg er klassificeret som præbiotika. Disse er:

- I) fruktaner, som kan være frukto-oligosakkarider eller inulin, der begge består af fruktose-monomerer, der er kædet sammen med $\beta 1 \rightarrow 2$ glykosidbindinger,
- II) galakto-oligosakkarider, som består af galaktose-monomerer, der er kædet sammen med $\beta 1 \rightarrow 6$ glykosidbindinger og
- III) laktulose, som er et disakkarid bestående af galaktose og fruktose bundet sammen med en $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidbinding [6] (tabel 2, side 26). Metoder til produktion af nye typer præbiotiske kandidater er i dag ved at blive nyudviklet. Specielle enzymatiske teknologier kan bl.a. anvendes, hvor kandidaterne produceres fra sukkerroer eller kartoffelrester.



Figur 1. Mave-tarmsystemets forskellige afsnit og fordeling af bakteriepopulationer.

Typer af *in vitro*-fermenteringsmetoder

In vitro-metoder kan anvendes til første indikation af selektiv fermentering af præbiotiske kandidater. Disse metoder er hurtigere,

billigere og mere etisk forsvarlige end *in vivo*-teknikker, men har begrænsninger, såsom mangel på vært-bakterieinteraktioner og absorptionsprocesser. Derfor kan *in vitro*-teknikker kun anvendes prædiktivt og videre undersøgelser som dyreforsøg og/eller humane studier er nødvendige for at dokumentere gavnlig effekt.

Batch, semi-kontinuerlige og kontinuerlige systemer er de primære anvendte *in vitro*-modeller. Til disse modeller anvendes friske afføringsprøver som inocula til simulering af menneskets tarmmikrobiota.

Batch-modellen er den mest simple af de tre *in vitro*-metoder. Her anvendes enkle fermenteringsbeholdere, som enten kan være ikke-pH kontrollerede eller mere fysiologisk korrekt pH-kontrollerede. Anaerobe forhold bevares under inkuberingen ved brug af et anerobt kammer eller iltfrie fermenteringsbeholdere. I et batch-system fjernes fermenteringsprodukterne ikke, så en inkuberingstid over 24 timer er ikke anbefalelsesværdig, da høje koncentrationer af fermenteringsprodukter kan hæmme bakteriernes vækst [7].

Inden for semi-kontinuerlige og kontinuerlige *in vitro*-metoder findes de dynamiske *in vitro*-modeller. Disse modeller kører med flere fermenteringsbeholdere i serie, hvori tarmsystemets forskellige afsnit simuleres. Det er en fordel frem for batch-systemet, da effekten af en given præbiotisk kandidat kan måles gennem hele tarmsystemet. De dynamiske modeller er ligeledes pH- og temperaturkontrollerede, har til- og udstrømning af næring og mulighed for adskillige prøveudtag under hele inkuberingsforløbet. De to mest kendte dynamiske *in vitro*-modeller er *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* [8] (SHIME) og *TNO gastro-Intestinal Model* [9] (TIM).



FREMGANG? DENNE VEJ.

Vi giver ikke op, før vi har fundet den bedste vej fremad for hver eneste kunde. Vi er strategiske rådgivere for nogle af verdens mest fremgangsrige virksomheder. Vi giver klare og tydelige råd, og vi står inde for dem. Vi er 300 medarbejdere, heraf 160 konsulenter inden for immaterialret, fordelt på 13 kontorer i Danmark, Sverige og Tyskland. Kontakt os, hvis vi skal hjælpe dig. www.awapatent.com

AWAPATENT
INTELLECTUAL PROPERTY FOR BETTER BUSINESS

Sidsel Hauge er European Patent Attorney og ekspert inden for life science og kemi.



Dyreforsøg og/eller humane studier

Som nævnt kan en fødevarerbestanddel ikke klassificeres som præbiotika uden dyreforsøg og/eller et veldefineret human studie. Da både dyreforsøg og humane studier er dyre og tidskrævende, kan de med fordel anvendes efter *in vitro* præ-screening af mulige præbiotiske kandidater. Dyreforsøg er meget anvendelige, da de kan udføres helt kontrolleret, så variation i kosten undgås. Test af præbiotiske kandidater i dyreforsøg kan enten foregå i raske dyr eller i dyr med den lidelse, man ønsker at forebygge med præbiotisk behandling (f.eks. patogen infektion, diabetes, blødende tarmbetændelse eller allergi). Hvis der anvendes en model med syge dyr, bedømmes den præbiotiske effekt af en kandidat ud fra dens evne til at hæmme sygdomsaktiviteten og ud fra hvilke tarmbakterier, der stimuleres. Kvantificering af tarmbakterier kan enten være ud fra afføringsprøver taget løbende og/eller fra forskellige tarmafsnit taget ved forsøgets afslutning. Det er velkendt, at bakteriesammensætningen

■ Faktaboks 1 – Definition på præbiotika

Præbiotika er en selektivt fermenteret fødevarerbestanddel, som giver specifikke ændringer i sammensætningen og/eller i aktiviteten af tarmens mikrobiota, og herved medfører gavnlig effekt på værts sundhed.

ændrer sig ned gennem tarmen, det bedste billede opnås derfor ved at tage prøver fra flere forskellige dele af tarmen.

I humane studier kan der også anvendes raske eller syge forsøgspersoner. I et veldefineret human studie er det vigtigt, at der er nok forsøgspersoner. Effekten af præbiotika bedømmes som ved dyreforsøg ud fra sygdomsaktiviteten og ændringer i tarmbakterierne. I humane studier foretages undersøgelsen af tarmbakterierne ofte vha. afføringsprøver, men enkelte studier har også brugt tarmbiopsier [10]. Tabel 3 viser en oversigt over

nogle af de studier, der er udført for at bevise præbiotisk effekt.

Fælles for de nævnte *in vitro*- og *in vivo*-metoder er undersøgelsen af fermenteringsegenskaber, hvor bakteriemetabolitter som kortkædede fedtsyrer kan måles vha. gaskromatografi, og bakteriekompositionen kan måles vha. molekylære mikrobiologiske metoder som sekventering, fluorescerende *in situ*-hybridisering eller kvantitativ PCR.

Navn	Struktur	Industriell produktion
Inulin	-D-Glu-(1 2)-[-D-Fru-(1 2)-] _n , n=2-60	Udtræk fra cikorerod eller artiskok
Frukto-oligosakkarider	-D-Glu-(1 2)-[-D-Fru-(1 2)-] _n , n=2-7	Enten fra inulin vha. enzymatisk hydrolyse eller fra sukrose vha. transfruktosylation
Galakto-oligosakkarider	-D-Glu-(1 4)-[-D-Gal-(1 6)-] _n , n = 2-5	Fra laktose vha. transgalaktosylation
Laktulose	-D-Gal-(1 4)- -D-Fru	Fra laktose vha. isomerization

Glu: glukose; Fru: fruktose; Gal: galaktose; n: antal af monomerer.

Tabel 2. Oversigt over de industrielle klassificerede præbiotika

Sygdom	Præbiotika	Effekt	Studium
Diarré	FOS	Reduceret antal af diarré	Mennesker
Tyktarmskræft	Laktulose FOS	Reduceret antal af atypiske formationer i tyktarmen	Rotter
	Laktulose	Reduceret risiko for dannelse af polypper i tyktarmen	Mennesker
Kalcium malabsorption	Miks af FOS og Inulin	Forhøjet absorption af kalcium	Mennesker
Patogen infektion	GOS	Hæmning af <i>Listeria monocytogenes</i>	Marsvin
Tarmbetændelse	Miks af FOS og inulin	Reducering af sygdomsaktivitet	Mennesker
	FOS Laktulose	Reducering af skader på tyktarmen, samt stigende vækst af laktobaciller og bifidobakterier	Rotter
Raske	Inulin Laktulose	Stigende vækst af bifidobakterier	Mennesker

FOS: Fruktio-oligosakkarider; GOS: Galakto-oligosakkarider

Tabel 3. Dyreforsøg og humane studier til at bevise præbiotisk effekt.

Louise Kristine Vignæs er finansieret af Center for Biologisk Produktion af Kostfibre og Præbiotika. Centeret er støttet af Det Strategiske Forskningsråds Programkomite for Fødevarer og Sundhed (FøSU), samt DTU, Danisco og Lyckebystærkelsen.

E-mail-adresse

Louise Kristine Vignæs: lokv@food.dtu.dk

Referencer

- Vernazza, C. L., Rabi, B. A. & Gibson, G. R. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics. in Prebiotics: Development and Application; Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (eds.); John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2006; pp. 1-28.
- Fooks, L. J. & Gibson, G. R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS. Microbiol. Ecol. 2002, 39, 67-75.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. & Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology. 2007, 13, 2826-2832.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G. H. et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. Science. 2011, 331, 337-341.
- Endt, K., Stecher, B., Chaffron, S., Slack, E., Tchitchev, N., Benecke, A., Van Maele, L. et al. The Microbiota Mediates Pathogen Clearance from the Gut Lumen after Non-Typhoidal Salmonella Diarrhea. Plos Pathogens. 2010, 6, 1-18.
- Crittenden, R. G. & Playne, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science & Technology. 1996, 7, 353-361.
- Coles, L. T., Moughan, P. J. & Darragh, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. Animal Feed Science and Technology. 2005, 123, 421-444.
- Molly, K., Woestyne, M. V. & Verstraete, W. Development of A 5-Step Multichamber Reactor As A Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. Applied Microbiology and Biotechnology. 1993, 39, 254-258.
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M. et al. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 53, 108-114.
- Lindsay, J. O., Whelan, K., Stagg, A. J., Gobin, P., Al-Hassi, H. O., Rayment, N., Kamm, M. A. et al. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. Gut. 2006, 55, 348-355.

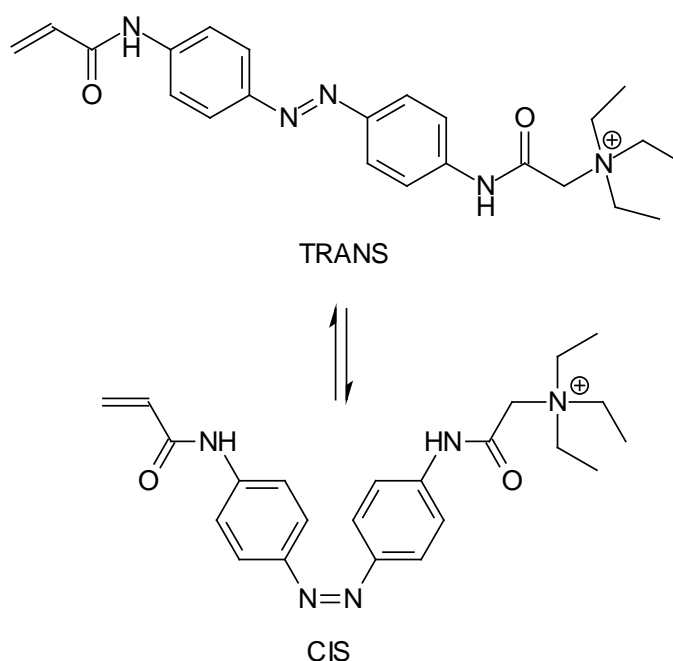
Nyt om ...

... Lysstyrede lægemidler

Lægemidler, hvis virkning kan aktiveres og stoppes reversibelt ved belysning, kan blive en ny generation af lægemidler. Det er vist, at *trans*-formen af den viste azoforbindelse kan stoppe K⁺ flowet i ionkanaler, hvorimod *cis*-formen, som den omdannes til ved belysning, tillader et frit flow. Ionkanaler er grundlaget for en lang række nervers funktion, man kan således forestille sig, at man kunne lave et bedøvelsesmiddel, hvis virkning kan kontrolleres af lys.

Carl Th.

Photochrome Liganden für spannungsgesteuerte Kaliumkanäle. *Angewandte Chemie* **121**, 2009, side 9261.





Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler



Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk



Cal. Reg. Nr. 482