



UNIVERSITEIT
GENT

FACULTEIT LANDBOUWKUNDIGE
EN TOEGEPASTE BIOLOGISCHE WETENSCHAPPEN

Academiejaar 2003-2004

MICROBIELE VORMING VAN EQUOL
UIT DAIDZEINE

Steffi VANHEMMENS

Promotor : Prof. dr. ir. W. Verstraete

Scriptie voorgedragen tot het behalen van de graad van
BIO-INGENIEUR IN DE SCHEIKUNDE

De auteur en de promotor geven de toelating dit afstudeerwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit afstudeerwerk.

The author and the promotor give the permission to use this thesis and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to copyright laws, more specially the source must be extensively specified when using results from this thesis.

1 mei, 2004

De promotor,

De auteur,

Prof. dr. ir. W. Verstraete

Steffi Vanhemmens

Woord vooraf

1 oktober 1999: de kennismaking met de universiteit en met al het hippe gedierte dat er rondloopt, het ophalen van de eerste mega-cursussen, de wiskundetest... Het zit allemaal nog heel fris in mijn geheugen. De voorbije vijf jaren, doorspekt met vele leuke feestjes, toffe activiteiten, boeiende lessen en excursies, maar ook met iets minder interessante lessen, vervelende taakjes en examens (kortom het hele 'varken-, koe- en pluimveegebeuren'), zijn als een sneltrein voorbij gevlogen. Als ik straks definitief afscheid zal moeten nemen, zal ik met goede gevoelens (en ook wel met een beetje heimwee...) kunnen terugdenken aan deze mooie tijd.

Karel, bedankt voor de grote vrijheid die je me hebt gegeven bij dit eindwerk, voor al hetgeen je me dit jaar hebt kunnen bijbrengen en voor de nuttige tips die je me kon geven wanneer onze bacteriekes eens niet veel zin hadden om te werken... Zelfs vanuit Nederland, Florida en Duitsland kon ik altijd op je rekenen. Ook al is dit misschien geen definitief afscheid, bedankt, het zou alleen nooit gelukt zijn.

Prof. Verstraete, bedankt voor het enthousiasme en het onvoorwaardelijk geloof in 'the younger generation'. Terwijl u er altijd was om raad te geven en het onderzoek nieuw leven in te blazen, heb ik enorm veel kunnen bijleren en veel vrijheid gekregen om mijn eigen weg te zoeken. Ook bedankt om me de onderzoekskriebel te doen vinden en me de kans te geven om die de volgende jaren verder te ontdekken.

Daarnaast wil ik ook iedereen van LabMET bedanken voor de toffe werksfeer en de bereidwillige hulp. Zonder Siska en Katrien ging het moleculaire werk heel wat minder vlot verlopen hebben. En ook Kurt, die ons nu spijtig genoeg heeft verlaten (het is alvast heel wat rustiger in het pc-lokaal), verdient een standbeeld voor zijn hulp met mijn statistische problemen.

Prof. dr. ir. Cyberware, mijn pcke is je heel erg dankbaar voor de spoedherstellingen bij virusaanlagen, chronische vermoeidheid, depressies of andere kwaaltjes. Mijn pc is nu alvast aan vakantie toe...

Mamsie, bedankt voor jouw steun en de kans die je me hebt gegeven om deze studies te doen. Ook al ben ik de laatste jaren niet veel thuis geweest, ik zal nooit vergeten hoeveel je voor mij hebt gedaan... Je stond altijd klaar voor mij, ook gedurende de laatste moeilijke jaren. Je krijgt een 10/10 van mij!

En last but not least, kan ik al mijn vrienden niet vergeten, voor de leuke feestjes, etentjes, babbels en activiteiten... en gewoon om er te zijn natuurlijk. Dankzij jullie zijn het vijf onvergetelijke jaren geworden!

Steffi Vanhemmens,

1 mei 2004

Lijst met afkortingen

Afkorting	Betekenis
BHI	Brain Heart Infusion
BHIa	Brain Heart Infusion, anaëroob
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
DGGE	Denaturerende Gradiënt Gel Electroforese
DHD	Dihydrodaidzeïne
DHT	5- α Dihydrotestosteron
ER	Estrogen Receptor, Oestrogeen Receptor
FOS	Fructo Oligo Saccharide
FSH	Follikel Stimulerend Hormoon
GC	Gas Chromatografie
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRT	Hormone Replacement Therapy
IC	Ionen Chromatografie
KVE	Kolonie Vormende Eenheden
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteïniserend Hormoon
MB	Methanogene Bacteriën
MRS	Man Rogosa Sharpe
NADH	Gereduceerd Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Gereduceerd Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfaat
<i>O</i> -DMA	<i>O</i> -demethylangolensine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTH	Parathyroïd Hormoon
ROS	Reactive Oxygen Species, Reactieve Zuurstof Deeltjes
KKVZ	korte-ketenvetzuren
SHBG	Sex Hormone Binding Globuline
SORM	Selectieve Oestrogeen Receptor Modulator
SRB	Sulfaat Reducerende Bacteriën
TGF beta	Transforming Growth Factor beta
TPM	Toeren Per Minuut

Samenvatting

De consumptie van soja en daarvan afgeleide producten heeft de laatste jaren heel wat pennen in beweging gebracht omwille van potentiële gezondheidsbevorderende effecten. Vooral de isoflavonen, een groep van polyfenolische componenten die bijna uitsluitend in soja voorkomen, krijgen veel aandacht. Wegens hun antioxidatief en mild oestrogeen effect wordt aangenomen dat ze een rol kunnen spelen in de preventie van enkele chronische ziekten zoals borst- en prostaatkanker, cardiovasculaire aandoeningen, osteoporose en post-menopauzale klachten. Van cruciaal belang voor de absorptie en de bioactiviteit van isoflavonen is het metabolisme ervan na ingestie, voornamelijk door de intestinale microbiota. Dit wordt geïllustreerd door de vorming van equol uit daidzeïne, een veel voorkomend isoflavon in soja, die ten volle afhankelijk is van de darmbiota. Recent is de wetenschap steeds meer interesse gaan tonen voor dit metaboliet omwille van de superieure antioxidatieve en oestrogene werking en de betere absorptie ten opzichte van zijn precursor. Sommige onderzoekers zijn ervan overtuigd dat de positieve effecten van de consumptie van soja hoofdzakelijk aan equol te danken zijn. Er is echter maar ongeveer 35 % van de Westerse bevolking in staat om dit metaboliet aan te maken. Dit weerspiegelt de grote interindividuele variabiliteit in samenstelling en activiteit van de darmbiota. De identiteit van de verantwoordelijke bacteriën, de microbiële-ecologische mechanismen en de dieetfactoren die deze omzetting beïnvloeden zijn tot op heden niet opgehelderd en maken voorwerp uit van intensief en diepgaand onderzoek.

In de literatuurstudie van dit eindwerk werd de rol van de isoflavonen in deze gezondheidsproblematiek gewassen en geschoren. Er werd nagegaan wat exact gekend is omtrent de equolproducerende bacteriën en het belang van de erkenning van een 'equolproductiestatus' bij klinische studies werd geïllustreerd. Tenslotte werd het colon en de intestinale biota onder de loep genomen.

Het labowerk spitst zich toe op de identificatie, karakterisatie en potentiële toepassingsmogelijkheden van een equolproducerend consortium dat recent in LabMET werd geïsoleerd.

De identificatie op basis van een sequencerings van 16S rDNA fragmenten in een eerste fase van dit eindwerk leidde tot de onthulling van de naam van de volgende bacteriën: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus mucosae* en *Fingoldia magna*. De vierde bacterie kon niet exact geïdentificeerd worden, maar blijkt sterk verwant te zijn met *Veillonella* spp.

Tijdens een tweede fase werden de invloedsfactoren bij de vorming van equol uit daidzeïne bepaald door een aantal specifieke componenten in zowel de gas- als vloeistoffase te variëren. Om een verband te kunnen leggen met de fluctuaties van de betreffende factoren *in vivo*, namen deze factoren waarden aan die relevant zijn voor humane colonomstandigheden. De equolproductie bij de verschillende experimentele omstandigheden werd opgevolgd via RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) en de microbiële groei via uitplatingen. De resultaten wijzen op een cruciale rol van waterstof en de redoxpotentiaal bij de microbiële vorming van equol uit daidzeïne.

In een derde fase werden tenslotte een aantal potentiële toepassingsmogelijkheden beoordeeld. Hierbij werd de aandacht vooral gericht op de slaagkansen van het consortium als probioticum. De resultaten bevestigen het competitief vermogen van het consortium ten opzichte van autochtone darmbiota. Er werd zelfs een synergetisch effect waargenomen in combinatie met deze bacteriën. De equolproducerende micro-organismen blijken echter weinig resistentie te vertonen tegen maagzuur en galzouten, maar dit probleem kan omzeild worden aan de hand van een geschikte formulatie die een optimale activiteit van deze micro-organismen waarborgt. De betreffende bacteriën behouden immers hun activiteit na lyofilisatie, wat de deuren opent voor inkapseling van de gevriesdroogde cultuur zodanig dat ze weerstand zou kunnen bieden aan stressfactoren en intact de darm zou kunnen bereiken. Dit potentieel probioticum zou in de praktijk kunnen gebruikt worden om de equolproductie bij de Westerse bevolking te optimaliseren waardoor mogelijks een groter deel van de populatie zal kunnen genieten van de weldadige effecten van equol.

Abstract

During the last years, there has been a lot of interest in the consumption of soy because of its potential beneficial health effects. Especially the isoflavones, a group of polyphenolic compounds that occur almost exclusively in soy, have received a lot of attention. Their antioxidative and weak oestrogenic action seems to play a role in the prevention of some chronic diseases like breast and prostate cancer, cardiovascular diseases, osteoporosis and postmenopausal symptoms. The metabolism after ingestion, mainly by intestinal bacteria, is of crucial importance for the absorption and the bioactivity of isoflavones. That can be illustrated by the formation of equol from daidzein, one of the most important isoflavones of soy, that is mediated exclusively by colon bacteria. Recently the literature about this metabolite has expanded spectacularly because of the superior antioxidative and oestrogenic action and the better absorption compared to its precursor. There are even some presumptions that the beneficial health effects of soy consumption are mainly attributable to equol. Unfortunately, only 35 % of the Western population is able to form this metabolite. This phenomenon reflects the great interindividual variability in composition and activity of the human intestinal bacteria. The identity of the responsible bacteria, the microbial-ecological mechanisms and the nutritional factors that influence this conversion are yet not known and are part of intensive and profound research.

In the literature of this thesis, the role of isoflavones in the current health issues was washed and shaved. There was a research towards the knowledge about the equol producing bacteria and the importance of the recognition of the 'equol production status' in clinical studies was illustrated. Finally the colon and the intestinal bacteria were scrutinised.

The practical research was devoted to the identification, the characterisation and the potential applications of an equol producing consortium that was isolated recently at LabMET.

The identification by sequencing of 16S rDNA during the first phase of this research, revealed the names of the following bacteria: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus mucosae* and *Finegoldia magna*. The fourth bacterium is still unknown, but it seems to be related with *Veillonella* spp.

During the second phase, the factors that influence the equol production were determined by variation of specific compounds in both the gaseous and liquid phase. In order to allow an extrapolation to variations of the concerning factors *in vivo*, the values of these factors were relevant for human intestinal conditions. The equol production during the different experimental conditions was followed up by RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) and the microbial growth by plating out. The results indicate a crucial role of hydrogen and the redox potential during the microbial transformation of daidzein.

Finally, during the third phase, a number of potential applications were evaluated. Especially the possibility to use the equol producing consortium as a probiotic received a lot of attention. The results revealed the competitive capacities of the consortium. There was even a synergetic effect in the presence of native colon bacteria. The equol producing micro-organisms seem not to be very resistant to gastric acid and bile. However, this problem can be avoided by a suitable formulation that guarantees an optimal activity of this micro-organisms. After all, the representative bacteria keep their activity after lyophilisation, what permits encapsulation of the freeze-dried cultures. In that way, the bacteria would be protected against these stresses and could reach the colon in active form. In practice, this potential probiotic could be used to optimise human equol production by which probably a bigger part of the Western population will be able to benefit from the positive health effects of this metabolite.

Inhoud

(zie apart pdf document)

Deel I

Literatuurstudie

1. Fyto-oestrogenen

1.1. De drijfveer voor onderzoek

In 1927 kwam men al tot de ontdekking dat sommige planten stoffen bevatten die sterk gelijken op het vrouwelijke hormoon oestradiol: fyto-oestrogenen. Het is echter pas sinds enkele jaren dat deze fytochemicaliën heel wat pennen in beweging brengen omwille van hun potentiële gezondheidsbevorderende effecten. Aanzienlijke data van epidemiologisch onderzoek en nutritionele interventiestudies in mensen en dieren suggereren dat fyto-oestrogenen een rol kunnen spelen in de preventie van enkele chronische ziekten zoals borst- en prostaatkanker, cardiovasculaire aandoeningen, osteoporose en post-menopauzale klachten (Anderson et al., 1999; Kurzer & Xu, 1999; Messina et al., 2002). De vaststelling dat bovenvermelde ziektes aanzienlijk minder voorkomen in Aziatische landen, waar veel soja als bron van fyto-oestrogenen wordt geconsumeerd, is een drijfveer voor verder onderzoek naar de potentiële effecten van deze componenten (Adlercreutz & Mazur, 1997).

1.2. Biochemie

Fyto-oestrogenen zijn een groep van biologisch actieve plantenbestanddelen waarvan de chemische structuur sterke gelijkenissen vertoont met deze van oestradiol, het belangrijkste vrouwelijk geslachtshormoon (Fig.1). Deze structurele gelijkaardigheid is verantwoordelijk voor het vermogen van deze bestanddelen om te binden aan oestrogene receptoren in verscheidene cellen (An et al., 2001; Anderson et al., 1999; Adlercreutz & Hamalainen, 1992; Knight & Eden, 1996; Miksicek, 1993; Adlercreutz, 1999) en op deze wijze oestrogene of anti-oestrogene effecten uit te oefenen.

De drie voornaamste klassen zijn isoflavonen, lignanen en coumestanen (Bhathena et al., 2002; Kurzer & Xu, 1997). De meest voorkomende bioactieve isoflavonen zijn genisteïne en daidzeïne, welke respectievelijk worden afgeleid uit de precursoren biochanine A en formononetine. Glyciteïne komt minder voor, maar in de sojakiem kan deze gemethoxyleerde component tot 40 % van het totaal aantal isoflavonen uitmaken. De tweede klasse, de lignanen, zijn wijder verspreid in het plantenrijk dan de isoflavonen. Ze vormen de bouwstenen voor lignine, een hoofdbestanddeel van de plantencelwand. De twee voornaamste

lignan, enterolacton en enterodiol, worden respectievelijk geproduceerd uit matairesinol en secoisolariciresinol. Als vertegenwoordiger van de laatste klasse, de coumestanen, kan coumestrol vermeld worden. Dit is het belangrijkste coumestan voor menselijke consumptie.

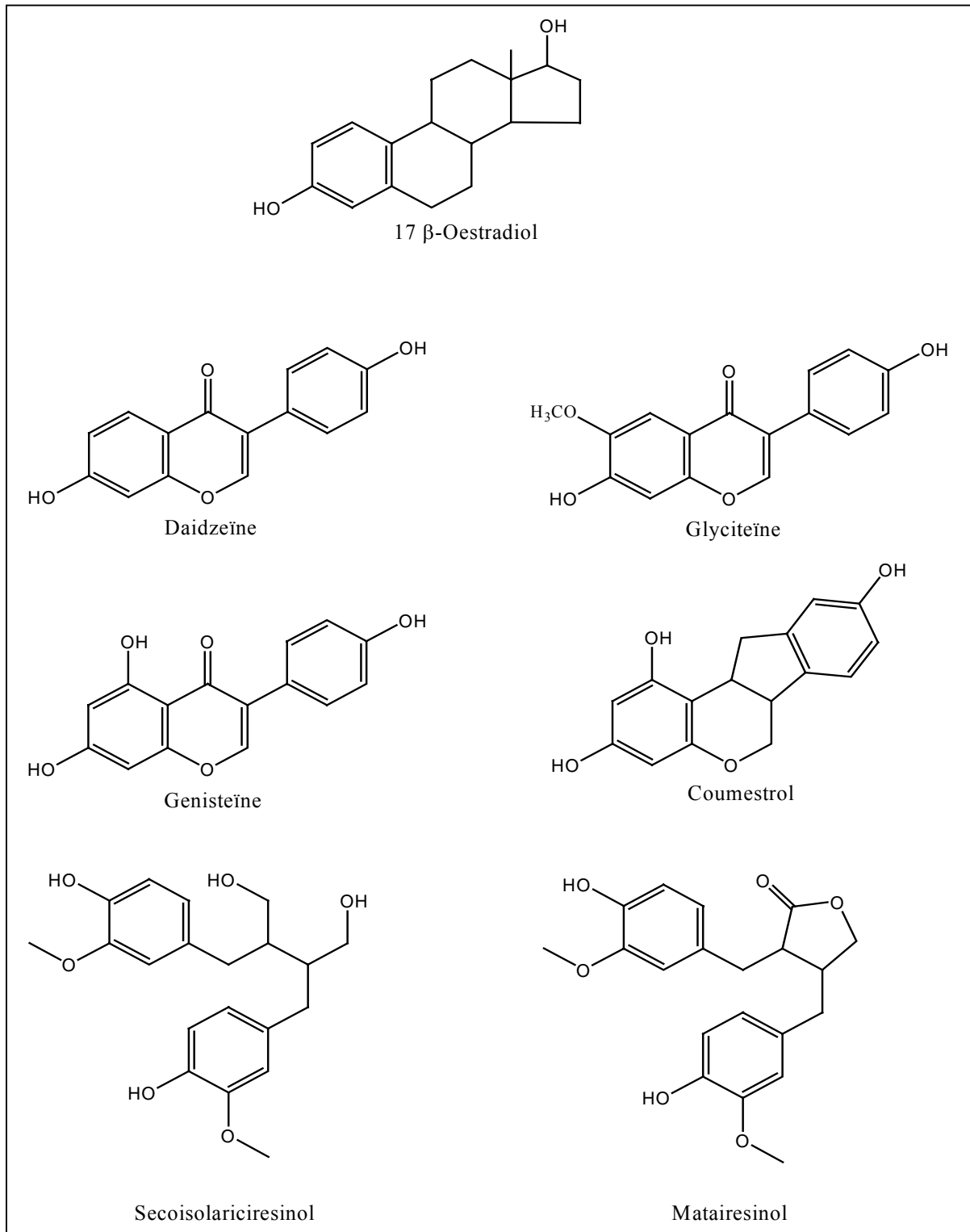


Fig. 1 De structuur van oestradiol en de voornaamste fyto-oestrogenen

1.3. Voedingsbronnen

Fyto-oestrogenen worden gevonden in een ruim assortiment van planten die bestemd zijn voor menselijke consumptie. Het gaat hier echter meestal om zeer lage concentraties. Sojabonen en afgeleide producten, de meest voorkomende bronnen van isoflavonen, vormen hierop een uitzondering (Tabel 1). Andere bonen, linzen, erwten en klaver bevatten een heel kleine hoeveelheid isoflavonen.

Tabel 1 Isoflavonengehalte van sojaproducten in $\mu\text{g} / \text{g}$ (Wang & Murphy, 1994)

Sojaproduct	Totale isoflavonen	Genisteïne	Daidzeïne	Glyciteïne
Geroosterde sojabonen	2661	1426	941	294
Sojaproteïnen isolaat	987	640	191	156
Tempeh	865	422	405	38
Tofu	532	245	238	49
Proteïne concentraat	73	19	0	54
Sojadrank	28	21	7	-

De hoeveelheid isoflavonen in sojabonen varieert van 1,5 - 3,8 mg/g zaad naargelang het type sojaboon, de plaats van cultivatie en het oogstjaar (Axelson et al., 1984; Wang & Murphy, 1994; Coward et al., 1993). Daarnaast kan het isoflavonengehalte van sojaproducten ook verschillen als resultaat van verschillende verwerkingsmethoden (Slavin et al., 1998). De inname bij de consumptie van een portie sojaproduct kan variëren van 0,25 - 40 mg isoflavonen (Wang & Murphy, 1994; Coward et al., 1993). De voornaamste bronnen van lignanen omvatten zaden, granen, peulvruchten en groenten. De hoogste concentraties worden gevonden in vlaszaad. Coumestanen komen vooral voor in alfa-alfazaden en diervoeders.

2. Isoflavonen

2.1. Structuur

Isoflavonen zijn een groep natuurlijk voorkomende heterocyclische fenolen. Ze zijn, naast de flavonen, flavonolen, flavanolen en anthocyanen, een subklasse van de flavonoïden. De basisstructuur van deze verbindingen is de flavonkern, bestaande uit twee benzeenringen verbonden door een heterocyclische pyraanring. De positie van de tweede benzeenring op het

pyraan is de basis voor de onderverdeling van de flavonoïdklasse in de flavonoïden, gebonden op de 2-positie, en de isoflavonoïden, gebonden op de 3-positie.

In 98 % van de gevallen komen de isoflavonen in soja voor als inactieve β -glycosiden, gebonden aan een glucoseresidu op plaats 7: daidzine, genistine en glyciteine met de respectievelijke verhouding 15, 25 en 60 % (Fig. 2). Het glucoseresidu kan al dan niet gesubstitueerd zijn op de 6'' plaats met een acetyl- of malonylgroep.

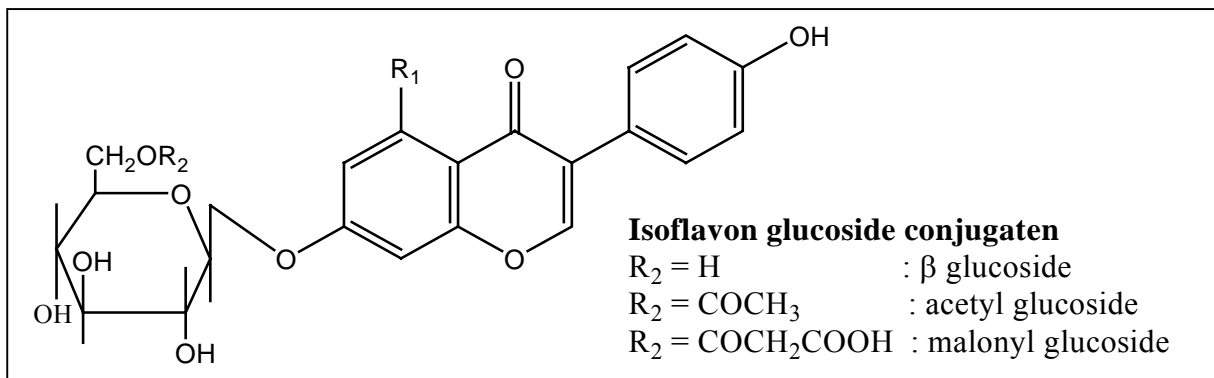


Fig. 2 Structuur van de geconjugeerde isoflavonen

De aglyconvorm, zonder glucose groep, wordt beschouwd als de actieve vorm van de isoflavonen (Fig. 3). Er komt echter maar een klein percentage als dusdanig voor in niet-gefermenteerde sojaproducten (Richelle et al., 2002).

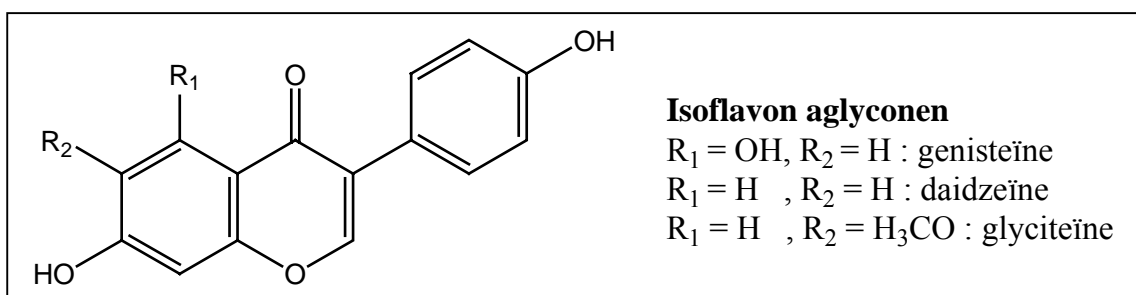


Fig. 3 Structuur van isoflavon aglyconen

De chemische vorm waaronder de isoflavonen voorkomen, bepaalt de biologische activiteit, de biologische beschikbaarheid en de fysiologische effecten van deze voedselbestanddelen (Adlercreutz & Mazur, 1997).

2.2. Absorptie

Tijdens de vertering worden de geconjugeerde isoflavonen onderworpen aan hydrolyse door β -glycosidasen. Zo worden biologisch actieve aglyconen gevormd (Adlercreutz & Mazur, 1997; Setchell, 2000; Setchell et al., 2002c). Er is een sterk vermoeden dat deze hydrolyse nodig is voor de absorptie uit de darm, aangezien β -glycosiden niet gedetecteerd worden in het plasma. De glycosiden worden niet geabsorbeerd omwille van hun meer hydrofiel karakter en hun hoger moleculair gewicht (Xu et al., 1995). Volgens Adlercreutz en Mazur (1997) zijn de β -glycosidasen afkomstig van de darmbiota, maar Bowey et al. (2003) vonden echter ook bij kiemvrije ratten, dit zijn ratten die geen darmbiota bezitten, omzetting van β -glycosiden in aglyconen. Dit werd reeds gesuggereerd door Day et al. (1998) en Rowland et al. (2003). Waarschijnlijk gaat het om een combinatie van de enzymatische activiteit van de dunne darm en van microbiële β -glycosidasen. De snelle verschijning van isoflavonen in het plasma na consumptie van de overeenkomstige glycosiden bevestigt de veronderstelling dat een deel van deze glycosiden reeds in de dunne darm, waar de microbiota afwezig is, gehydrolyseerd worden (Setchell et al., 2001; Rowland et al., 1999). De vraag kan gesteld worden of de intervariabiliteit van de darmbiota tussen individuen zou kunnen leiden tot het meer of minder beschikbaar worden van de isoflavonen. Nochtans is uit onderzoek gebleken dat voorafgaande enzymatische hydrolyse van een isoflavonenextract niet leidt tot een verhoogde absorptie bij vrouwen na de menopauze (Richelle et al., 2002; Setchell et al., 2001; Zublik et al., 2003). Er was wel een vertraging merkbaar in het bereiken van een maximale concentratie in het plasma na inname van de glycosiden. Dit toont aan dat de snelheidsbepalende factor in de absorptie de initiële hydrolyse is.

2.3. Metabolisme

De aglyconen worden geabsorbeerd doorheen het gastro-intestinale kanaal. Eenmaal opgenomen in de bloedbaan worden ze omgezet naar glucuronides (door het glucuronyltransferase van de lever) en sulfaten. Na een eventuele recyclage via de enterohepatische cyclus, worden ze geëxcreteerd via de urine of de faeces (Richelle et al., 2002; Setchell et al., 2001).

Verdere intestinale biotransformaties zijn: dehydroxylatie, reductie, ring-splitsing en demethylatie. Dit zijn bacteriële reacties die plaats vinden in het colon (Setchell et al., 1998). Daidzeïne kan verder gemetaboliseerd worden tot dihydrodaidzeïne, dat op zijn beurt kan omgezet worden tot zowel equol als *O*-demethylangolensine (*O*-DMA) (Axelson et al., 1984; Chang & Nair, 1995; Rowland et al., 2000; Setchell et al., 2002b; Bowey et al., 2003; Rafii et al., 2003). Genisteïne wordt getransformeerd tot dihydrogenisteïne en kan verder gemetaboliseerd worden tot *p*-ethylfenol (Rowland et al., 2000; Anderson et al., 1999, Joannou et al., 1995). Menselijke urinaire excretie van deze metabolieten is enorm variabel en enkel 30-35 % van de populatie excreteert significante hoeveelheden equol na isoflavonen consumptie (Setchell et al., 2002a).

2.4. Actiemechanismen

Fyto-oestrogenen kunnen hun doelcellen op twee manieren beïnvloeden: enerzijds door effecten op het genoom via de klassieke oestrogeenreceptoren en anderzijds door niet-genomische effecten die bewerkstelligd worden door membraangebonden oestrogeen receptoren of andere cellulaire proteïnen.

2.4.1. Genomische werking

Oestrogenen, gebruikt in hormonetherapie bij de behandeling van menopauzale klachten, kunnen het risico op borstkanker vergroten (Colditz, 1999; Pichar et al., 1998). Isoflavonen daarentegen, worden geassocieerd met een lage frequentie van borstkanker (An et al., 2001). Deze plantaardige hormonen binden net als oestrogenen op bepaalde intramoleculaire bindingsproteïnen, oestrogeen receptoren (estrogen receptors, ER). Het zijn net als alle steroïd-hormoon-receptoren, transcriptie-factoren die de gen-expressie beïnvloeden wanneer ze geactiveerd worden. Er zijn reeds twee types geïdentificeerd, ER- α en ER- β . ER- α komt in een brede waaier van weefsels voor terwijl ER- β meer in specifieke weefsels voorkomt zoals in het skelet, het darmkanaal, de bloedvaten, de hersenen, ... (Morito et al., 2001; Kuiper et al., 1997; Nilsson et al., 2000). Fyto-oestrogenen binden met een lagere affiniteit aan de oestrogeen receptoren (Miksicek, 1994) (Tabel 2) en produceren zwakkere oestrogene effecten (Markiewicz et al., 1993) in vergelijking met 17 β -oestradiol. Ze veroorzaken

afhankelijk van hun concentratie, het weefsel en het celtype, oestrogene of anti-oestrogene effecten (De Kleijn et al., 2001). Isoflavonen hebben echter een opmerkelijk grotere affiniteit voor ER- β , terwijl 17 β -oestradiol met een gelijke affiniteit bindt aan ER- α en ER- β (Kuiper et al., 1997; Barkhem et al., 1998). Kleine verschillen in de structuur tussen individuele isoflavonen kunnen de oestrogeniteit aanzienlijk beïnvloeden. Dit wordt geïllustreerd door daidzeïne en genisteïne die, behalve de extra hydroxylgroep op de A-ring, identiek dezelfde structuur hebben. De extra hydroxylgroep zorgt er echter voor dat genisteïne een tot 5 à 6 maal grotere oestrogene activiteit heeft in bepaalde condities (Markiewicz et al., 1993).

Tabel 2 Relatieve bindingsaffiniteit van de voornaamste fyto-oestrogenen in vergelijking met 17 β -oestradiol (Anderson et al., 1999)

Molecule	Relatieve bindingsactiviteit
Oestradiol	1
Coumestrol	0,13
Genisteïne	0,0125
Daidzeïne	0,001
Biochanine A	0,00005

De verschillen in de verdeling van ER- α en ER- β over de verschillende weefsels en de grotere bindingsaffiniteit van de isoflavonen voor de ER- β hebben aanleiding gegeven tot het vermoeden dat isoflavonen natuurlijke selectieve oestrogeen receptor modulators (SORM's) zijn (An et al., 2001; Boker et al., 2002). De ideale SORM vertoont oestrogeenachtige effecten op het skelet, de bloedvaten en de hersenen, waar vooral ER- β voorkomen. Op het endometrium en de borst daarentegen, vertonen ze anti-oestrogene (antagonistische) effecten. In deze laatste weefsels binden ze op de meest voorkomende ER- α . Isoflavonen geven een lagere activatie van de transcriptiefactoren bij binding op ER- α . Hierdoor kunnen ze anti-oestrogeen werken: ze binden op de receptor waardoor deze geblokkeerd wordt voor oestradiol. Zo wordt de synthese van bepaalde proteïnen, die aanleiding kunnen geven tot proliferatie van de cellen, geblokkeerd.

2.4.2. Niet-genomische werking

Steroïdemoleculen zoals oestrogenen en andere geslachtshormonen, adrenale steroïden en 1,25-dihydroxyvitamine D, hebben blijkbaar ook effecten op membraan gebonden receptoren via een mechanisme waarbij het cellulair genoom niet wordt geactiveerd (Nemere, 1996; Le

Mellay et al., 1997). Verschillende onderzoekers hebben aangetoond dat bij toediening van 17 β -oestradiol aan osteoblasten en andere cellen in cultuur de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie binnen seconden tot minuten aanzienlijk stijgt (Picotto et al., 1996. Le Mellay et al., 1997). De veranderingen in deze potentiële secundaire boodschapper zijn te snel om verklaard te worden door verschillen in proteïne synthese via de nucleaire ER.

Er wordt gesuggereerd dat fyto-oestrogenen ook herkend worden door deze celoppervlak gebonden ER. Daarnaast kunnen fyto-oestrogenen waarschijnlijk ook de downstream pathways van het metabolisme en proteïne productie stimuleren en inhiberen via verschillende secundaire boodschappers, waaronder kinase en topoisomerase enzymen (Anderson et al., 1999; Akiyama et al., 1987).

In vitro onderzoek toonde aan dat genisteïne de groei kan remmen van een grote variëteit aan kankercellen op een manier die niet hormoongebonden is. Bij een concentratie groter dan 10^{-5} M, is er een inhibitie van de proliferatie door de inhibitie van tyrosine kinases en topoisomerasen (Akiyama et al., 1987; Fotsis et al., 1993; Okura et al., 1988). De inhibitie van tyrosine kinases en topoisomerasen kan echter niet de oorzaak zijn van de preventieve bescherming van genisteïne *in vivo* omdat zelfs een soja-rijk dieet aanleiding geeft tot concentraties van dit isoflavon lager dan $6 \cdot 10^{-6}$ M (Setchell et al., 1997; Xu et al., 1995; Adlercreutz et al., 1993; Xu et al., 1994).

Naast deze potentiële eigenschappen bezitten isoflavononen echter ook een anti-oxidatieve activiteit (Ruiz-Larrea et al., 1997; Hodgson et al., 1996; Chin-Dusting, 2001; Wiseman et al., 2000). Ze hebben immers de capaciteit om te fungeren als waterstof- of electronendonor en kunnen op die manier vrije radicalen onschadelijk maken. Bij oxidatieve stress, het gevolg van een onevenwicht tussen pro- en antioxidanten in het lichaam, worden reactieve zuurstof species (ROS, Reactive Oxygen Species) gevormd. Deze vrije radicalen zijn erg reactief en proberen een elektron te vangen om hun structuur te stabiliseren. Op deze wijze kunnen vrije radicalen lipiden in celmembranen, proteïnen in enzymen en genetisch materiaal ernstig beschadigen. Oxidatieve schade aan het genetisch materiaal wordt beschouwd als een mogelijke oorzaak van ons verouderingsproces en van een aantal ziektes zoals onder andere kanker en hart- en vaatziekten. Nutritionele antioxidanten, zoals isoflavononen, kunnen de oxido-reductie balans in evenwicht houden in de organen en zo oxidatieve stress voorkomen.

2.5. Klinische effecten van isoflavonen consumptie

Culturele verschillen in de consumptie van sojaproducten resulteren in een enorme variatie in de inname van isoflavonen. De isoflavonen consumptie varieert in oosterse landen van 25 tot 50 mg / dag, terwijl in het Westen de gemiddelde inname kleiner is dan 1 mg / dag (Adlercreutz et al., 1993). In Azië, waar de isoflavonen consumptie relatief hoog is, komen de zogenaamde ‘Westerse’ ziekten, zoals borst-, endometrium-, colon- en prostaatkanker veel minder voor (Adlercreutz & Mazur, 1997).

2.5.1. Afname van cardiovasculaire ziektes

Hart- en vaatziekten zijn de voornaamste doodsoorzaak in vele Westerse landen, waaronder België. De isoflavonen hebben een invloed op verschillende factoren die in relatie staan met het ontstaan van deze aandoening (Clarkson, 2002).

2.5.1.1. Effect op het cholesterolgehalte

Epidemiologische en klinische studies hebben aangetoond dat hoge niveaus van totaal cholesterol, LDL-cholesterol en triglyceriden en lage HDL-cholesterol gehalten in het bloed belangrijke factoren zijn in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Of de isoflavonen een rol spelen in de cholesterolreductie blijft echter een onderwerp van discussie. Uit de literatuur blijkt dat geïsoleerde soja isoflavonen geen cholesterolverlagend effect hebben (Nestel et al., 1997; Hodgson et al., 1998; Anthony et al., 2002; Clarkson et al., 2002). Er is wel een vermoeden van een synergetisch effect tussen de eiwitten en de isoflavonen in soja. In een studie door Crouse et al. (1999) werd aangetoond dat de afname van LDL- en VLDL-cholesterol en de toename van HDL-cholesterol groter was in soja eiwit dat een hogere concentratie isoflavonen bevatte (Fig. 4). Deze resultaten werden bevestigd door Merz-Demlow et al. (2000), Wangen et al. (2001) en Puska et al. (2002). Studies met transgene muizen suggereren dat de gunstige effecten van isoflavonen op de cholesterolreductie bewerkstelligd worden door een stimulatie van de LDL-receptor activiteit (Kirk et al., 1998).

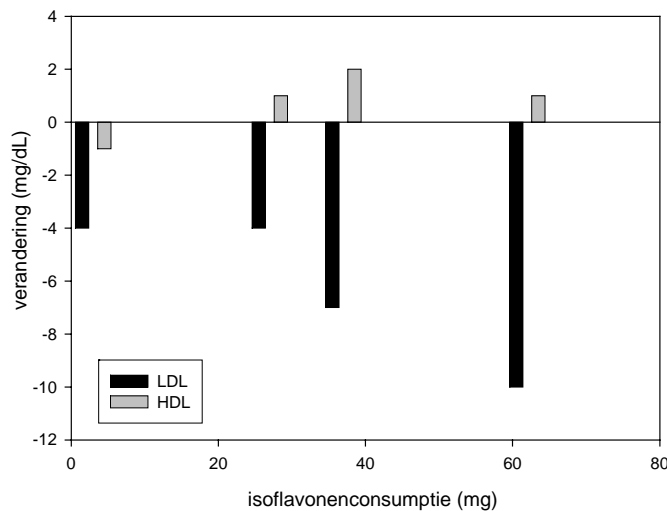


Fig. 4 Invloed van de isoflavonenconsumptie op HDL- en LDL-cholesterol (naar Crouse et al., 1999)

2.5.1.2. Andere cardiovasculaire effecten van isoflavonen

De isoflavonen kunnen de incidentie van cardiovasculaire ziektes ook beïnvloeden op een manier die niet gerelateerd is met de plasmalipiden en lipoproteïnen concentraties.

Het is geweten dat de isoflavonen een veel grotere affiniteit hebben voor ER- β dan voor ER- α . Daardoor wordt gesuggereerd dat ze sterkere effecten hebben in weefsels waar veel ER- β aanwezig is, zoals in het cardiovasculair systeem. Het blijkt dat de isoflavonen zo een directe invloed kunnen uitoefenen op de aderwand (Makela et al., 1999).

In een aantal experimenten werd het effect op de bloeddruk geobserveerd. Er werd aangetoond dat een toenemend isoflavonengehalte bij vrouwen resulteert in een verlaging van de diastolische bloeddruk. Er werd bij mannen echter geen effect waargenomen (Washburn et al., 1999; Crouse et al., 1999; Hodgson et al., 1999).

Isoflavonen blijken ook de vasculaire functies, zoals vasculaire dilatatie en elasticiteit, te verbeteren (Nestel et al., 1997; Honore et al., 1997; Steinberg et al., 2003).

Een ander belangrijk mechanisme waarmee isoflavonen het risico op cardiovasculaire ziektes kunnen reduceren, is via hun effect op de bloedplaatjes. Studies op dieren hebben laten suggereren dat isoflavonen de activatie (Murphy et al., 1993; Kuruvilla et al., 1993) en de aggregatie (Asahi et al., 1992; McNicol, 1993) van de plaatjes kunnen inhiberen en het serotoninegehalte kunnen reduceren (Helmeste & Tang, 1995). Dit kan bijdragen tot een

afname in vasospasme (vernauwing van de bloedvaten) en thrombose (Williams & Clarkson, 1998; Schoene & Guidry, 1999).

Daarnaast kunnen isoflavonen, door hun antioxidatief vermogen, de oxidatie van LDL-cholesterol reduceren. De resulterende afname van geoxideerde LDL deeltjes, welke beschouwd worden als meer atherogeen, kan zo het risico op atherosclerose verminderen (Hodgson et al., 1996; Witztum & Steinberg, 1991; Anderson et al., 1999; Tikkanen et al., 1998; Wiseman et al., 2000).

Tenslotte hebben *in vitro* studies laten vermoeden dat isoflavonen ook de zachte spiercellen beïnvloeden die betrokken zijn in de promotie en progressie van atherosclerose (Makela et al., 1999; Shimokado, 1995; Shimokado, 1994; Fujio, 1993).

2.5.2. Afname van de osteoporose

Osteoporose is wereldwijd een groot gezondheidsprobleem en het aantal voorvallen neemt alsmear toe naarmate de vergrijzing van de bevolking zich voortzet. De ziekte wordt gekenmerkt door een verhoogde beenderafbraak waardoor de structuur van het been fragieler wordt en breuken sneller optreden.

Het calciumgehalte van het beendergestel is in voortdurend hormonaal gecontroleerd dynamisch evenwicht. Controle berust enerzijds op de synthese van peptide hormonen *calcitonine* en *parathyroïd hormoon* (PTH) in of bij de schildklier en anderzijds op de werking van geslachtshormonen (vooral oestrogenen) gemedieerd door *cytokines* en *somatomedine*. Een verstoorde regulatie door een afname aan oestrogenen brengt de balans tussen osteoblasten (calcium incorporerende cellen) en osteoclasten (calcium mobiliserende cellen) uit evenwicht met een netto beenderverlies tot gevolg (Van Camp & Demeyer, 2001-2002).

Ouderdomsosteoporose komt voor bij zowel mannen als vrouwen, maar bij vrouwen wordt het proces aanzienlijk bevorderd in de menopauze. Dit is te wijten aan een afname van de circulerende plasma oestrogenen. Gemiddeld 25 % van de vrouwen in deze leeftijdsgroep heeft te kampen met osteoporose. (Barnes, 2003).

Isoflavonen blijken, omwille van hun gelijkaardige structuur aan die van oestradiol, hun steentje bij te dragen in de strijd tegen osteoporose. Ipriflavon, een geneesmiddel dat ontwikkeld werd om osteoporose te behandelen, bevat ook isoflavonen (Agnusdei et al., 1989; Gennari et al., 1998). Het geneesmiddel wordt in het lichaam gemetaboliseerd tot

actieve bestanddelen, zoals o.a. daidzeïne. Zowel *in vitro* studies (Arjmandi et al., 1998a; Arjmandi et al., 1998b; Arjmandi et al., 1996; Williams et al., 1998; Anderson & Garner, 1997), waarbij men cellulaire culturen van osteoblasten en osteoclasten gebruikt, als *in vivo* studies (Potter et al., 1998; Alekel et al., 2000; Somekawa et al., 2001; Lydeking-Olsen et al., 2002), tonen aan dat soja isoflavonen het osteoporoseproces gunstig beïnvloeden.

2.5.3. Afname van menopauzale symptomen

De afname van vrouwelijke hormonen gedurende de menopauze wordt vaak vergezeld door een aantal ongemakken, zoals warmteopwellingen (vapeurs) en wispelturigheid, veroorzaakt door een gereduceerde oestrogenen productie. Ook het risico op osteoporose en cardiovasculaire ziekten neemt aanzienlijk toe. Daarom wordt vaak een hormonetherapie (HRT, Hormone Replacement Therapy) voorgesteld. Deze therapie is echter niet erg populair omwille van de mogelijke neveneffecten, zoals toegenomen risico op borst- en endometrium kanker (Colditz, 1999; Pichar et al., 1998).

De sterkte en de frequentie van de menopauzale symptomen zijn opmerkelijk lager in Aziatische vrouwen dan in Westerse (Adlercreutz & Hamalainen, 1992). De hoge isoflavonen consumptie in Oosterse landen heeft hier wellicht iets mee te maken. Daarom worden isoflavonen voorgesteld als potentieel alternatief voor HRT om menopauzale symptomen te reduceren. Zoals reeds eerder vermeld, hebben deze plantaardige hormonen een gelijkaardige structuur als de oestrogenen, maar een veel lagere activiteit. In menopauzale vrouwen, binden de isoflavonen op de oestrogeen receptoren en oefenen zo een zwak oestrogeen effect uit. Het is deze zwakke oestrogene activiteit die verantwoordelijk is voor de gunstige effecten op menopauzale symptomen. Er zijn heel wat publicaties die dit aantonen (Murkies, 1995; Nagata et al., 2001b; Brzezinski et al., 1997). Nochtans is er ook een studie die geen verschil met de placebo vertoont (Quella, 2000). In dit experiment werden de isoflavonen echter toegediend via een tablet. Dit sluit dus niet uit dat soja isoflavonen, via een andere toedieningswijze zoals bijvoorbeeld via de voeding, wel een gunstig effect kunnen hebben.

2.5.4. Afname van kanker

In België krijgt één persoon op twee kanker, ongeveer één op vier sterft eraan. Reden genoeg om alles in het werk te stellen om deze ziekte te trachten voorkomen. Verschillende kankers ontstaan door inwerking van externe factoren zoals het leefmilieu. Als individu kan men echter weinig veranderen aan de werkomstandigheden of de leefomgeving. Over de voedingsgewoonten daarentegen, heeft men wel controle. De waarneming dat borst- en prostaat kanker veel minder voorkomt in Aziatische landen, waar grote hoeveelheden sojaproducten geconsumeerd worden, heeft geleid tot uitgebreid onderzoek naar de potentiële beschermende effecten van isoflavonen.

2.5.4.1. Borstkanker

De initiële interesse in de anti-kanker effecten van soja was voornamelijk gefocust op borstkanker. Dit enthousiasme was gebaseerd op volgende bevindingen (Anderson et al., 1999):

- de lage borstkankermortaliteit in Azië, waar veel soja wordt geconsumeerd
- de inhibitie van chemisch geïnduceerde borstkanker bij sojaconsumptie in dierenproeven
- de potentiële anti-oestrogene effecten van soja isoflavonen

Verschillende epidemiologische data ondersteunen het idee dat de opname van isoflavonen bij volwassen vrouwen het borstkanker risico reduceert (Ingram, 1997; Messina, 1997; Wu, 1998; Lee, 1991; Adlercreutz et al., 2000). Het blijkt dat de isoflavonen de menstruele cyclus verlengen en de opwelling van LH (luteïniserend hormoon) en FSH (follikel stimulerend hormoon) halverwege de cyclus onderdrukken, met als gevolg een afname van het risico op borstkanker. De resultaten hieromtrent zijn echter enorm variabel (Cassidy et al., 1994; Duncan, 1999). Er is een vermoeden dat de isoflavonen voornamelijk tijdens de vroege levensjaren een beschermend effect hebben. Dierenproeven hebben aangetoond dat een blootstelling aan isoflavonen, voor een korte tijd gedurende de neonatale of prepuberale periode, de ontwikkeling van borstkanker op latere leeftijd reduceert (Fritz et al., 1998; Badger et al., 2002; Lamartiniere et al., 2002). De bescherming wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de oestrogene activiteit van isoflavonen, wat resulteert in borstcel differentiatie waardoor het borstweefsel resistenter wordt tegen carcinogene aanvallen in later

leven (Lamartiniere, 2000). Er werd in recente studies ook aangetoond dat isoflavonen het oestrogene metabolisme gunstig kunnen beïnvloeden, met een afname in het risico op borstkanker tot gevolg (Lu et al., 2000a; Lu et al., 2000b).

2.5.4.2. Prostaatkanker

Prostaatkanker is een van de meest voorkomende kankers bij mannen. Er zijn echter opvallende verschillen in de prostaatkanker mortaliteit in de wereld. In Japan en enkele andere Oosterse landen is de prostaatkanker mortaliteit aanzienlijk lager, niettegenstaande hetzelfde voorkomen van latente en kleine of niet-infiltratieve prostaatcarcinomen als in Westerse landen (Adlercreutz et al., 1993). Het is merkwaardig dat de kanker toch ontwikkelt bij een opmerkelijk groot aantal Japanse mannen. De tumoren zijn echter meestal zodanig klein dat ze klinisch insignificant zijn. Eveneens zeer opmerkelijk is dat bij Japanners die migreren naar de Verenigde Staten de incidentie van deze vorm van kanker sterk stijgt, wat aantoont dat omgevingsfactoren zoals voeding en leefwijze een belangrijkere rol spelen dan genetische factoren (Shimizu, 1991). Er moeten dus een of meerdere factoren aanwezig zijn in de Japanse cultuur die de groei vertragen en/of de aanvang van de prostaat tumoren verlaten. De vertraging in de klinische verschijning van prostaat tumoren van zelfs maar enkele jaren kan een significante publieke gezondheidsimpact hebben, aangezien prostaatkanker over het algemeen een ziekte is van oudere mannen. Mannen zouden bijgevolg sterven met, in plaats van door, hun kanker.

Er werd aangetoond dat genisteïne de groei van zowel androgeen (testosteron) afhankelijke als onafhankelijke prostaatkankercellen *in vitro* inhibeert (Peterson, 1993). Genisteïne is een potente anti-carcinogeen en werkt tegen de meeste kankerceltypes. Er zijn echter relatief hoge concentraties genisteïne nodig om de groei *in vitro* te inhiberen, zodat de relevantie van deze resultaten in vraag kan gesteld worden. Het blijkt echter dat genisteïne veel potenter is *in vivo* dan *in vitro* (Zhou, 1999).

Dalu et al. (1998) bestudeerden niet de prostaattumoren op zich, maar de effecten van genisteïne op het niveau van de receptoren in de prostaat van een rat. Ze vonden dat het aantal oestrogene receptoren aanzienlijk steeg in kankercellen. Daaruit kon men vermoeden dat een reductie van deze receptoren het risico op prostaatkanker wellicht zou kunnen reduceren. Deze hypothese werd bevestigd door het feit dat het aantal receptoren in genisteïne gevoede ratten aanzienlijk afnam in vergelijking met deze in ratten die gevoed werden met een typisch laboratorium dieet (Dalu et al., 1998).

2.5.4.3. Andere kankers

Niet enkel in hormoon afhankelijke maar ook in hormoon onafhankelijke kankers spelen de isoflavonen een rol. Ze hebben een inhiberend effect op een aantal enzymen die tussenkomen in het carcinogeen proces. Genisteïne is een krachtige inhibitor van het tyrosine-kinase, DNA topo-isomerasen en andere enzymen. Genisteïne verhoogt ook de *in vitro* concentratie van TGF beta (Transforming Growth Factor beta), die een inhiberend effect heeft op de groei van kankercellen (Messina, 1994; Messina, 1999). Daarnaast heeft genisteïne niet alleen een direct effect op de proliferatie van tumoren maar ook een indirect effect, door de inhibitie van angiogenese (Fotsis et al., 1993). In een aantal studies werd aangetoond dat genisteïne de groei van bijna alle types kankercellen *in vitro* inhibeert (Supko, 1995). Isoflavonen kunnen zo een significante beschermende rol spelen bij verschillende kankers. Verdere klinische studies zijn nodig om deze effecten te verhelderen.

Er bestaat dus een variëteit aan potentiële mechanismen waarmee isoflavonen het kankerproces kunnen inhiberen. De resultaten van de experimenten, die werden uitgevoerd om de klinische responsen van soja diëten na te gaan, zijn echter nogal variabel. In het volgende hoofdstuk zal duidelijk worden dat het erkennen van een 'equolproducer status' in deze gevallen van essentieel belang is.

3. Equol

3.1. Algemeen

In 1932 werd door Marrian en Haslewood voor het eerst de chemische structuur van equol (7-hydroxy-3(4'-hydroxyfenyl)-chroman of 4',7-isoflavandiol) ontrafeld. Het metaboliet werd toen geïsoleerd uit de urine van paarden, vandaar de naam equol (*equine* = van paarden). Het werd pas in 1982 in menselijke urine gedetecteerd (Axelson et al., 1982). Equol is eigenlijk geen fyto-oestrogeen omdat het niet als dusdanig voorkomt in planten, maar door de darmbiota in het gastro-intestinale kanaal gevormd wordt uit daidzeïne (Fig. 6) (Setchell et al., 2002b).

Alhoewel bij typische laboratoriumdieren (muizen, ratten en apen) consistent een hoge concentratie equol werd gedetecteerd, is slechts 30 tot 35 % van de bevolking in staat om

meer dan enkele sporen equol te vormen (Sathyamoorthy & Wang, 1997; Setchell et al., 2002b; Atkinson et al., 2003). Men spreekt van equolproducenten (producers, excretors of responders) en niet-producenten (non-producers, -excretors of -responders).

In schapen wordt formonetine (een gemethoxyleerde precursor van daidzeïne) uit klaver door rumenbacteriën gedemethyleerd tot daidzeïne en verder tot equol. Dit leidde in 1946 in West Australië tot de zogenaamde ‘klaverziekte’ waarbij de schapen onvruchtbaar werden (Fig. 5) (Bennetts et al., 1946; Adams, 1990; Setchell et al., 2002b). De veiligheid van sojaconsumptie bij mensen werd daardoor onterecht in vraag gesteld. De inname van isoflavonen die de klaverziekte veroorzaakten bedroeg 20 – 100 g/d, heel wat meer dan de 15 – 50 mg/d die typisch opgenomen wordt bij humane sojaconsumptie. Om deze hoge inname te bereiken zouden volwassenen dagelijks meer dan 1000 L sojamelk, 8600 sojaburgers of 360 kg tofu moeten consumeren.

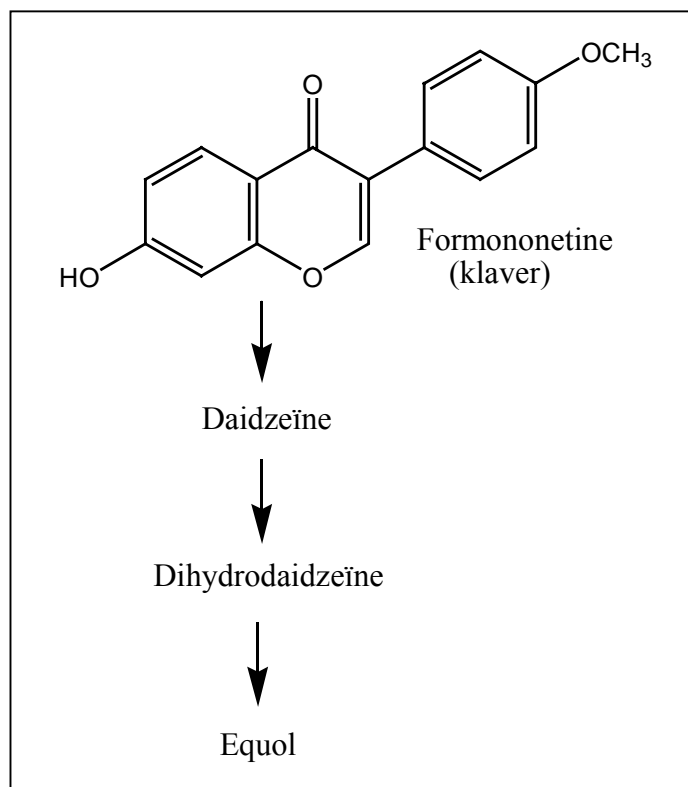


Fig. 5 De omzetting van formonetine tot equol door rumenbacteriën in schapen (naar Setchell et al., 2002b)

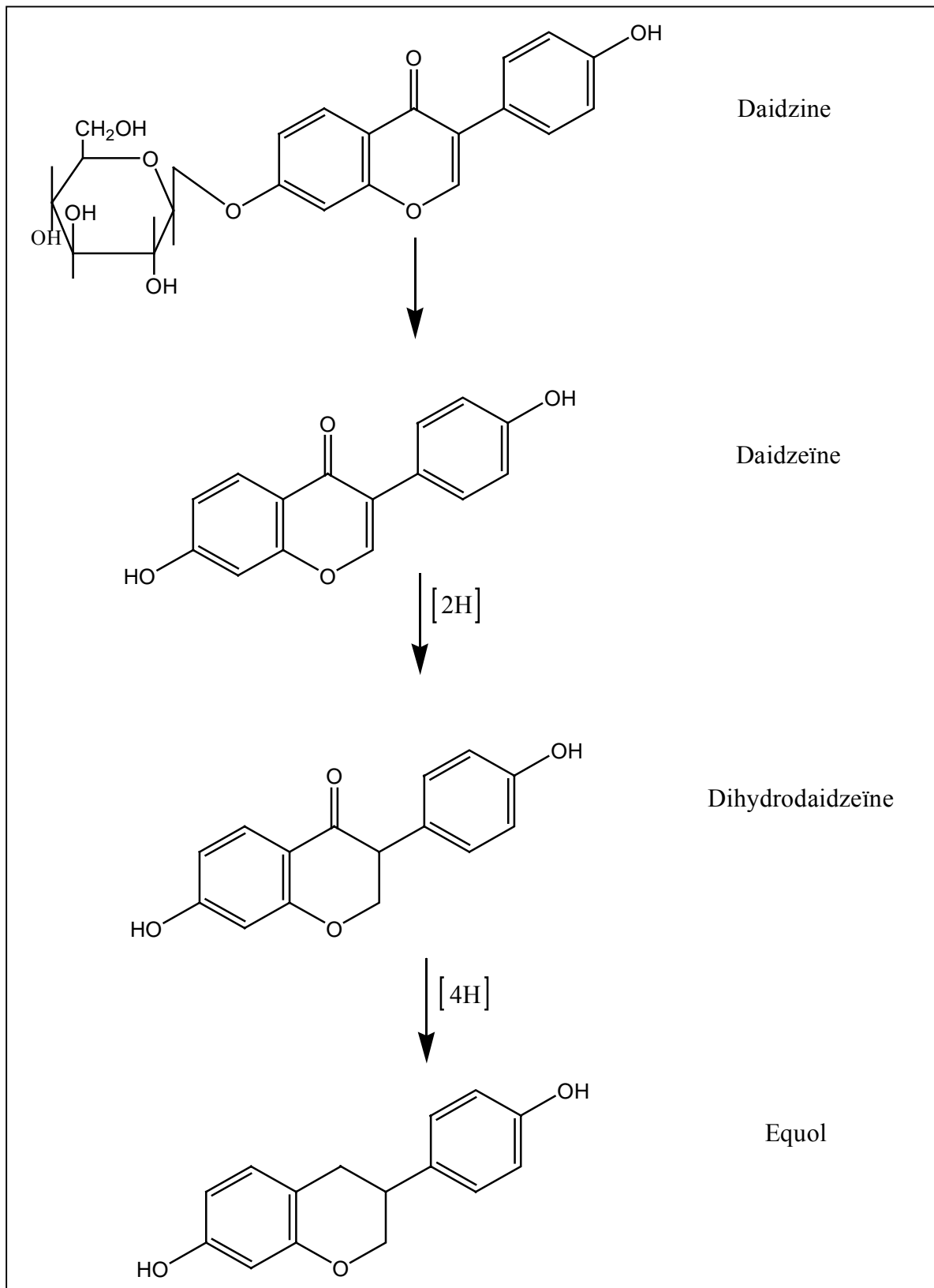


Fig. 6 Omzetting van daidzine tot equol door de intestinale bacteriën (naar Tsangalis et al., 2002)

3.2. Biologische eigenschappen van equol

Door het ontbreken van de dubbele binding in de heterocyclische ring bezit equol een chiraal koolstofatoom (Fig. 7) (Setchell et al., 2002b). Deze unieke eigenschap is niet terug te vinden bij andere isoflavonen, waar de dubbele binding wel aanwezig is.

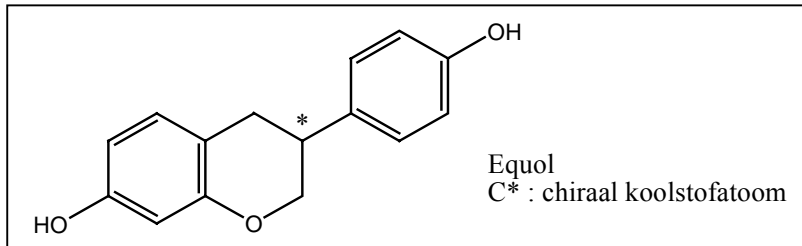


Fig. 7 De chemische structuur van equol (naar Tsangalis et al., 2002)

Hierdoor kunnen twee optische isomeren onderscheiden worden: een R- en een S-enantiomeer. Ze hebben een verschillende conformatie, wat een invloed heeft op de binding met de oestrogenreceptor. Er werd aangetoond dat in mensen enkel het optisch actieve S-enantiomeer gevormd wordt. Deze vorm bezit, in tegenstelling tot het R-enantiomeer, een significante affiniteit voor ER- β . Na de ontdekking dat er twee soorten oestrogen receptoren waren, is er een duidelijker inzicht gekomen in de oestrogene werking van de isoflavonen. Equol heeft een hogere bindingsaffiniteit voor beide oestrogen receptoren dan zijn precursor daidzeïne, en induceert de transcriptie sterker dan om het even welk isoflavon (Muthyala et al., 2004). Daarnaast is ook aangetoond dat equol trager wordt geëxcreteerd dan zijn precursor, wat in combinatie met de hogere oestrogene capaciteit kan resulteren in grotere fysiologische effecten in equolproducenten die isoflavonen consumeren (Slavin et al., 1998).

3.3. De cruciale rol van intestinale microbiota

De vorming van equol is ten volle afhankelijk van de darmbiota. Er is geen equol detecteerbaar bij kiemvrije dieren of baby's die een nog weinig ontwikkelde darmbiota bezitten (Setchell et al., 1997; Setchell et al., 1998) en na de toediening van antibiotica daalt de equolproductie aanzienlijk (Blair et al., 2003). *In vitro* incubatie van daidzeïne met faecale flora van een equolproducent resulteerde in de conversie van daidzeïne naar equol terwijl de

incubatie met de faecale flora van een equol niet-producent geen equol opleverde. Het tussenproduct dihydrodaizeïne werd echter wel bij kiemvrije ratten gedetecteerd na het voeden met een soja-isoflavonen bevattend dieet (Bowey et al., 2003). Dit deed de auteurs suggereren dat deze dihydro-derivaten gevormd kunnen worden tijdens processen in het (zoog)dier, voornamelijk cytochroom P450-gemedieerde processen. Aangezien het gehalte aan dihydro-derivaten in ratten geïnoculeerd met faecaal materiaal afkomstig van een equolproducent hoger was dan in de kiemvrije dieren, werd toch besloten dat de darmbacteriën wel een rol spelen in hun vorming. Er werd door Hur et al. (2000) immers ook dihydrodaidzeïne productie vastgesteld door bacteriën *in vitro*. Eens equol gevormd is, lijkt het metabolisch inert. Naast glucuronidatie en een verwaarloosbare sulfatatie, ondergaat het geen verdere biotransformatie (Setchell et al., 2002b). Het grote verschil tussen de equolproducenten en niet-producenten (van 150 tot 900 keer hogere concentratie) is waarschijnlijk te wijten aan de verscheidenheid van colonbacteriën tussen de verschillende individuen. Het kan gaan om een intrinsiek verschil of het kan genetisch bepaald zijn (Sathyamoorthy & Wang, 1997). Ook vrijstelling van de micro-organismen aan isoflavonen gedurende een volledige maand, resulteert niet in een stijging van equolproductie. Er is dus geen metabolische aanpassing van de micro-organismen aan daidzeïne. Dit toont aan dat de incompetentie om equol te produceren een gevolg is van het ontbreken van specifieke bacteriën in de darm (Bowey et al., 2003).

3.4. Equolproducenten versus equol niet-producenten

Slechts 30-35 % van de ‘Westerse’ bevolking is in staat equol te vormen na consumptie van soja. Het percentage equolproducenten in het Oosten werd tot heden nog niet bepaald.

Bij het toedienen van puur daidzeïne verandert de mogelijkheid tot equolvorming niet (Setchell et al., 2001). Dit schakelt de voedselmatrix als mogelijke invloedsfactor uit. De grens tussen equolproducenten en niet-producenten is empirisch vastgesteld. Volgens Setchell et al. (2002b) is < 40 nmol/L in het plasma een goede cut-off waarde voor een niet-producent en > 83 nmol/L in het plasma en > 1000 nmol/L in de urine voor equolproducenten.

De hormonale gevolgen van equol zijn een eerste maal waargenomen door het vaststellen van een stijging van de duur van de menstruele cyclus als gevolg van equolproductie na de consumptie van isoflavonen. (Cassidy et al., 1994; Cassidy et al., 1995). In 2000 werd door

Duncan et al. aangetoond dat de hormoonspiegels van equolproducenten eveneens opmerkelijke verschillen vertonen, zoals een algemeen lagere concentratie aan oestrogenen, prolactine en androgenen en een hogere concentratie aan FSH (follikel stimulerend hormoon) en SHBG (sex hormone binding globuline) (Duncan et al., 2000). Deze hormoonspiegels zijn typisch beschermend tegen borstkanker.

3.5. Invloedsfactoren op equolproductie

Ondanks de verschillende hypothesen die werden vooropgesteld om de inter-individuele verschillen in equolproductie te verklaren, blijft het onduidelijk waarom sommige mensen equol kunnen produceren en andere niet. De samenstelling van de intestinale microbiota, de intestinale verblijftijd en de variabiliteit in de redoxpotentiaal van het colon kunnen bijdragen in de variatie van equolproductie in mensen (Atkinson et al., 2003). Deze condities worden echter beïnvloed door het voedingspatroon. Het dieet wordt daarom door een aantal auteurs geassocieerd met het equol productie fenotype. Uit studies door Cassidy (Setchell & Cassidy, 1999) waarbij een *in vitro* model van de menselijke colon fermentatie werd gebruikt, bleek dat de conversie van daidzeïne naar equol door een menselijke faecale cultuur kon worden gemanipuleerd. Een hoog niet-zetmeel polysaccharide milieu, dat bacteriële fermentatie stimuleert, leidde tot een snelle en complete omzetting van daidzeïne naar equol. Onder lage koolhydraat condities daarentegen, werd equol niet gevormd. Dit laat veronderstellen dat het dieet ook een belangrijke rol speelt in de conversie van daidzeïne naar equol (Xu et al., 1994). Uit onderzoek is gebleken dat equolproducenten minder vet consumeren en meer koolhydraten, plantaardige proteïnen en voedingsvezels als energiebron gebruiken in vergelijking met niet-producenten. (Rowland et al., 2000; Lampe et al., 1998). Er werd verondersteld dat voedingsvezel de groei en / of de activiteit stimuleert van bacteriële populaties die verantwoordelijk zijn voor de equolproductie in de colon. Dit werd echter niet bevestigd door Lampe et al. (2001). Er is duidelijk nog verder onderzoek vereist naar de specifieke componenten in het dieet die de bacteriële conversie van daidzeïne naar equol kunnen beïnvloeden omdat er in de huidige data nog tegenstrijdigheden voorkomen. Een belangrijk fenomeen is echter dat, met uitsluiting van overmatig antibioticagebruik, een equolproducent steeds een equolproducent blijft (Setchell et al., 2002a; Lampe et al., 2001). Maar deze theorie wordt sinds kort in vraag gesteld (Adlercreutz, persoonlijke communicatie).

Setchell en zijn medewerkers (2002b) geloven dat het mogelijk is om een niet-equolproducent om te vormen naar een producent door middel van prebiotica en probiotica. Deze hypothese is tot op heden echter nog niet bewezen.

Tamura et al. (2002) gingen het effect na van enerzijds een soja-isoflavonendieet en anderzijds een caseïne-isoflavonendieet op de microbiota bij volwassen muizen. Het aantal lactobacilli was groter in het soja-isoflavonendieet dan in het caseïne-isoflavonendieet. De intestinale microbiota vormen een barrière tegen pathogenen. Lactobacilli in het bijzonder inhiberen de groei van vele intestinale pathogenen zoals *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,... Het blijkt dus dat sojaproteïnen gunstiger zijn dan caseïne proteïnen voor de intestinale bescherming. Ook de concentratie aan equol was significant groter bij de groep van het soja-isoflavonendieet (13,78µM t.o.v. 6,78µM bij het caseïne-isoflavonendieet). Dit zou het gevolg zijn van een verschil in samenstelling van de darmbiota (Tamura et al., 2002). Dit steunt de visie van Bowey et al. (2003) die beweerde dat het verschil in equolproductie het gevolg is van een verschil in bacteriële samenstelling en niet van metabolische aanpassing van de bacteriën aan daidzeïne.

3.6. Equolproducerende bacteriën

De zoektocht naar de equolproducerende bacteriën is een uitdaging gezien het groot aantal verschillende bacteriën in het darmkanaal. Hieronder worden de pogingen van enkele onderzoekers vermeld, maar tot op heden werd(en) de verantwoordelijke bacterie(n) nog niet bij de kraag gegrepen.

Hur et al. (2000) onderzochten humane faecale stalen op equolproducerende bacteriën. Ze voerden een *in vitro* fermentatie uit met o.a. daidzeïne onder anoxische omstandigheden wat aanleiding gaf tot de vorming van o.a. dihydrodaidzeïne en equol (Chang & Nair, 1995). De stam met de hoogste glucosidaseactiviteit (HGH21) werd geselecteerd voor verdere studie op de hydrolyse van natuurlijke isoflavon glycosides en op de capaciteit om het isoflavon daidzeïne om te vormen (Hur et al., 2000). Er werd één gram-positieve stam (HGH6) gevonden. Deze had ook glucosidaseactiviteit, maar niet zo sterk als de HGH21. HGH6 was in staat om de dubbele binding tussen C-2 en C-3 in daidzeïne en genisteïne te reduceren, met vorming van respectievelijk dihydrodaidzeïne en dihydrogenisteïne. HGH6 was echter niet in

staat om de dubbele binding van andere flavonoïden te reduceren. Blijkbaar is de reductie van de dubbele binding specifiek voor isoflavonen. Een vergelijkbare reductie door *Clostridium paraputrificum* van deoxycorticosteron tot tetrahydrocorticosteron was reeds in 1975 door Bokkenheuser et al. aangetoond. Deze *C. paraputrificans* was eveneens niet in staat tot reductie van daidzeïne tot dihydrodaidzeïne. De HGH21 bacterie werd geïdentificeerd als *Escherichia coli* maar de gram-positieve bacterie HGH6 kon niet verder worden geïdentificeerd. De volledige faecale stalen waren in staat om equol te vormen uit daidzeïne maar men slaagde er niet in om een bacterie te isoleren die de conversie van daidzeïne naar equol kon uitvoeren. Dit kan erop wijzen dat het volledig proces door meer dan één bacterie wordt gerealiseerd. Deze stelling wordt verdedigd door Lampe et al. (2002) die aantoonde dat significante hoeveelheden dihydrodaidzeïne, maar geen equol, werden geproduceerd na toediening van ampicilline. Ook Atkinson et al. (2004) constateerde dat sommige antibiotica de equolproductie inhiberen maar geen effect hebben op de vorming van dihydrodaidzeïne. Hier kan echter terug ingespeeld worden op de vraag in hoeverre de bacteriën verantwoordelijk zijn voor de reductie van daidzeïne tot dihydrodaidzeïne. Het kan echter ook zijn dat één bacterie alle stappen uitvoert, maar deze bacterie niet gevonden werd of niet in cultuur te brengen is of dat de bacterie de omzetting niet kan uitvoeren *in vitro*.

Ueno et al. (2001) beweren de bacteriën te hebben gevonden bij gezonde Japanse volwassenen, na het eten van 70 g tofu. De faecale biota werden in cultuur gebracht en geïdentificeerd. Het zou gaan om drie stammen: de gram-positieve *Streptococcus intermedius* spp. en *Ruminococcus productus* spp. en de gram-negatieve *Bacteroides ovatus* spp.

Er is een sterk vermoeden dat de omzetting door bifidobacteriën zou gebeuren, omdat een toenemend gehalte aan koolhydraten de betrokken bacteriën stimuleren (Lampe et al., 1998). Ohta en zijn medewerkers (2002) hebben een proef gedaan waarbij ratten en muizen 4 verschillende diëten consumeerden:

- Een gezuiverd controle dieet.
- Een dieet waaraan 5% fructooligosaccharide (FOS) werd toegevoegd.
- Een dieet waaraan 0,2% isoflavonen werden toegevoegd.
- Een dieet waarbij 0,2% isoflavonen en 5% FOS gecombineerd werden.

FOS is een onverteerbaar suiker dat de groei van bifidobacteriën in het intestinale kanaal stimuleert (bifidogene factor). De concentratie aan β -glucosidase geproduceerd door de

bifidobacteriën in het colon steeg aanzienlijk wanneer er FOS aanwezig was in het dieet. Aangezien β -glucosidase zorgt voor de hydrolyse van de geconjugeerde isoflavonen, toont dit aan dat FOS de intestinale absorptie van de aglyconen kan stimuleren. De biobeschikbaarheid van de isoflavonen wordt dus verhoogd. Door het isoflavonenbevattend dieet waren de concentraties aan genisteïne en daidzeïne significant gestegen, maar er was geen verschil merkbaar indien er combinatie was met FOS of niet. De equolconcentratie vertoonde echter een sterke stijging bij combinatie met FOS. Deze resultaten tonen aan dat toevoeging van FOS niet alleen de omzetting van glycoside naar aglycon bevordert maar eveneens van het aglycon daidzeïne naar equol. Het vermoeden dat de bifidobacteriën een rol spelen in deze omzetting neemt hierdoor sterk toe.

Tsangalis et al. (2002) onderzochten eveneens de mogelijkheid van bifidobacteriën om equol te vormen. Equol werd gevormd uit zijn precursor daidzeïne gedurende de exponentiële groei (tussen 12 en 24 uur) van *Bifidobacterium pseudolongum*, *B. longum-a* en *B. animalis* in sojamelk. De hoogste concentratie werd gevormd bij de fermentatie met *Bifidobacterium animalis* na 24 uur. Deze bacterie had ook de hoogste concentratie daidzeïne gevormd uit daidzin (Tsangalis et al., 2002). Op deze manier blijken Tsangalis et al. (2002) argumenten te hebben geleverd dat bifidobacteriën instaan voor de vorming van equol.

3.7. Klinische effecten van equol

Verschillende recente voeding interventie studies die de gezondheidseffecten van soja isoflavonen bestudeerden, zinspelen op het potentieel belang van equol omwille van de vaststelling dat maximale klinische responsen op soja diëten werden geobserveerd bij mensen die goede equolproducenten waren. De grotere efficiëntie van equol is voornamelijk te danken aan de superieure antioxydatieve en oestrogene activiteit en de betere absorptie ten opzichte van zijn precursor (Setchell et al., 2002b; Sathyamoorthy & Wang, 1997). Het is nu duidelijk dat het opdelen van de proefpersonen in twee subpopulaties op basis van het vermogen om al dan niet equol te produceren een mogelijke sleutel is om de variabiliteit van de effecten van soja diëten ter behandeling of ter preventie van hormoonafhankelijke ziektes te verklaren. Het ontbreken van deze opdeling in vorige klinische studies is hoogstwaarschijnlijk voor een deel verantwoordelijk voor de variabele resultaten.

3.7.1. Symptomen van de menopauze

Epidemiologisch onderzoek door Nagata et al. (2001b) gaf aanleiding tot de vaststelling dat het optreden van warmteopwellingen (vapeurs) omgekeerd gecorreleerd is met de isoflavonen inname. Na een onderzoek bij 180 Japanse vrouwen bleek dat slechts bij 5% regelmatig vapeurs voorkwamen (Uchiyama et al., 2001). Nochtans lag de inname van isoflavonen lager dan de courant gebruikte dosis in klinische studies. Meer dan 50% waren equolproducenten. De equolproducenten konden het meest voordeel halen uit de consumptie van isoflavonen. Voorgaande studies hadden nooit nagegaan of de vrouwen equolproducenten waren of niet.

3.7.2. Osteoporose

Tal van studies hebben aangetoond dat isoflavonen inderdaad het ontkalken van de beenderen inhibeert. Osteoporose wordt nagegaan aan de hand van de meting van de BMD (bone mineral density) en de BMC (bone mineral content). Het is echter aangewezen dat de studies voldoende lang duren, bij voorkeur langer dan 1 jaar (Lydeking-Olsen et al., 2002). Ook hier blijkt dat equolproducenten een sterkere stijging vertonen van de BMD en de BMC dan niet-producenten.

3.7.3. Cholesterolgehalte

Anderson et al. (1995) kwamen tot de conclusie dat soja het grootste hypocholesterolemisch effect heeft in equolproducenten. Er werd bij deze groep zowel een afname in LDL als in plasma triglyceriden vastgesteld.

3.7.4. Vasculaire reactiviteit (Williams & Suparto, 2003)

Genisteïne, maar niet daidzeïne, reduceert arteriële constrictor responsen in vrouwelijke muizen door een ER afhankelijk mechanisme. Er werd bij mannelijke muizen echter geen reductie waargenomen. Equol daarentegen, veroorzaakt ook een aanzienlijke reductie van de constrictor responsen in het mannelijke wild type, maar niet in mutanten waarvan het ER- β werd uitgeschakeld. Er kan daaruit afgeleid worden dat enkel equol vasoactieve effecten heeft bij het mannelijke geslacht en dat deze effecten hoogstwaarschijnlijk voor een deel bemiddeld worden door de ER- β . Bij genisteïne is de invloed op de vasculaire reactiviteit blijkbaar geslachtsspecifiek. Uit deze resultaten kan besloten worden dat mannelijke equolproducenten een voordeel hebben ten opzichte van hun niet-producerende geslachtsgenoten.

3.7.5. Borstkanker

Verschillende studies tonen aan dat het vermogen om equol te produceren bij vrouwen gepaard gaat met een gereduceerd risico op borstkanker, zowel door effecten op het endogeen hormoonniveau als op het oestrogeen metabolisme (Atkinson et al, 2003; Sathyamoorthy & wang, 1997).

De hormoonspiegels van equol producenten en niet-producenten vertonen opmerkelijke verschillen. De producenten hebben een lagere concentratie aan vrij circulerende oestrogenen en ze hebben een hogere concentratie aan FSH (follikel stimulerend hormoon) en SHBG (sex hormone binding globulin) (Adlercreutz et al., 1987). Deze verschillen komen voor bij elk isoflavonenbevattend dieet en zijn dus onafhankelijk van de ingenomen hoeveelheid isoflavonen. Deze hormoonspiegels hebben een typisch beschermend effect tegen borstkanker. Adlercreutz et al. toonden in 1982 aan dat borstkankerpatiënten over het algemeen minder equol produceren dan hun gezonde vrouwelijke leeftijdsgenoten. *In vitro* is aangetoond dat equol een zwakke inhibitor is van aromatase, een enzym dat oestrogeensynthese katalyseert en een stimulant is voor SHBG-synthese in bepaalde leverkankercellen (Duncan et al., 2000).

Atkinson et al. (2003) toonden aan dat equol excretie, maar niet de totale isoflavonen excretie, positief gecorreleert is met de 2-OH E₁:16 α -OH E₁ verhouding. De hogere urinaire excretie van het 2-hydroxyestron relatief ten opzichte van het 16 α -hydroxyestron werd geassocieerd

met een gereduceerd risico op borstkanker. Dit laat vermoeden dat het bacterieprofiel in het colon dat geassocieerd is met equolproductie het oestrogeen metabolisme op positieve wijze beïnvloedt, waardoor het risico op borstkanker afneemt. Er moet echter nog onderzocht worden of de hogere 2-OH E₁:16α-OH E₁ verhouding resulteert uit de actie van specifieke darmbacteriën geassocieerd met het equol-productie fenotype, of dat equol zelf het oestrogeen metabolisme beïnvloedt.

3.7.6. Prostaatkanker

In 2002 werd door Akaza et al. aangetoond dat equolproductie bij prostaatkankerpatiënten opmerkelijk lager ligt dan bij hun gezonde mannelijke leeftijdsgenoten. Deze waarneming suggereert een positieve invloed van equol op prostaatkanker.

Uit een recente studie (Lund et al., 2004) blijkt dat equol een unieke anti-androgene activiteit bezit. Equol kan specifiek binden aan 5-α dihydrotestosteron (DHT) en zo de activiteit ervan belemmeren in fysiologische processen. DHT heeft immers een trofisch effect op de prostaatklier en kan zo prostaatkanker stimuleren. Er werd aangetoond dat equol een gewichtsafname van de prostaat en de epididymis veroorzaakt zonder een invloed op het gewicht van andere lichaamsdelen. Equol is ook in staat om het inhibitorisch effect van DHT op plasma LH te blokkeren. In een experiment met gecastreerde mannelijke ratten hadden de DHT behandelde mannetjes een laag gehalte LH, terwijl diegene die zowel met DHT en equol werden behandeld een hoog LH gehalte hadden dat gelijkaardig was aan het niveau van de controle. Het vermogen van equol om de activiteit van DHT te inhiberen biedt de opportuniteit om equol in de toekomst te gebruiken in de behandeling van androgeen gemedieerde ziekten.

Er wordt gesuggereerd dat prostaatkanker tijdens de ontwikkeling evolueert van een hoog gedifferentieerd naar een laag gedifferentieerd niveau. In deze context werd aangetoond dat het percentage equolproducenten lager was in laag gedifferentieerde prostaatkanker patiënten (Akaza et al., 2002; Sakr et al., 1993). Dit wijst op de mogelijke inhibitorische rol van equol in de vooruitgang van prostaatkanker. De equolproductiestatus is dus een belangrijke factor die de impact van soja isoflavonen consumptie op prostaatkanker beïnvloedt.

3.7.7. Anti-oxidatief effect

Equol deelt samen met de andere flavonoïden de capaciteit om te fungeren als een waterstof- of electronendonor en kan daardoor vrije radicalen onschadelijk maken. Het metaboliet heeft echter de grootste antioxidatieve activiteit van alle isoflavonen (Arora et al., 1998; Mitchell et al., 1998; Hodgson et al., 1996; Hwang et al., 2003; Wiseman et al., 2000). Antioxidanten kunnen de oxido-reductie balans in evenwicht houden in de organen en zo oxidatieve stress voorkomen. Een equolproducent kan bijgevolg beter weerstand bieden tegen oxidatieve stress, en daarmee gepaard gaande aandoeningen, dan zijn niet producerende medemens (Setchell et al., 2002b).

Ongeveer twintig jaar na de eerste identificatie van equol in menselijke urine en bloed en de ontdekking dat het was geassocieerd met soja consumptie, komt men terug bij het begin. De erkenning van de equolproductiestatus was duidelijk het ontbrekende stukje van de cirkel. Dit moet dan ook de basis zijn waarmee men verder de klinische werking van soja onderzoekt.

4. De intestinale microbiota

4.1. Inleiding

De dikke darm of het colon is meer dan alleen een orgaan dat instaat voor de excretie van afvalproducten en de absorptie en secretie van zouten en water. Het is nu duidelijk dat het ook een belangrijke rol speelt in de vertering van koolhydraten en eiwitten die niet verteerd worden in de dunne darm. Deze voedselcomponenten worden in de dikke darm gemetaboliseerd door anaërobe bacteriën via een proces dat fermentatie genoemd wordt. In de voorbije tiental jaren werd de aandacht vooral gericht op het verband tussen bepaalde darmfuncties en de gezondheid. De rol van de darmbiota is hierbij van doorslaggevend belang.

Zoals eerder vermeld, is ook de equolproductie compleet afhankelijk van de darmbiota. Vandaar dat het de moeite loont om in een extra hoofdstuk het colon en de intestinale biota eens onder de loep te nemen.

4.2. Anatomie van de dikke darm (Cummings, 1997)

Voedsel komt via de slokdarm, maag en dunne darm uiteindelijk in de dikke darm terecht, het laatste deel van het spijsverteringskanaal. Het colon heeft een gemiddelde lengte van 150 cm en een oppervlakte van 1275 cm². De gemiddelde darminhoud bedraagt 222 g, waarvan 36 g droge stof en 186 g water. Het vochtgehalte daalt van 85 % in het caecum tot 77 % in het rectum en de pH stijgt van 5,8 tot 6,5. De verblijftijd varieert van 24 tot 54 uur, afhankelijk van het dieet.

4.3. Samenstelling van de darmbiota

Het colon is veruit de meest gekoloniseerde regio van het verteringskanaal. Het aantal bacteriën kan oplopen tot 10¹² per gram darminhoud (Gibson & Roberfroid, 1995). De menselijke dikke darm is een complex ecosysteem dat meer dan 50 genera en honderden species herbergt. Negenennegentig procent van de biomassa wordt echter vertegenwoordigd door 30 à 40 species die behoren tot 5 à 6 genera.

De ingewanden van de pasgeborene zijn vrij van micro-organismen. Tijdens de eerste levensdagen vindt in het maagdarmkanaal kolonisatie plaats door micro-organismen die toevallig in de omgeving aanwezig zijn. Tussen de zevende en de tiende levensdag begint bij kinderen die borstvoeding krijgen de kolonisatie van de darm door bifidobacteriën. Bij deze baby's kan het aantal bifidobacteriën oplopen tot 99 % van de totale microbiota dankzij de bifidogene factoren, zoals oligosacchariden en glycoproteïnen, die aanwezig zijn in de moedermelk. De bifidobacteriën beschermen de pasgeborene tegen potentiële pathogene bacteriën. Baby's die worden gevoed met aangepaste flesvoeding op basis van koemelk ontwikkelen een gemengde darmflora van voornamelijk bifidobacteriën, *Bacteroides*, enterobacteriën en streptococci (Fanaro et al., 2003). Aanvankelijk overheersen de facultatief anaërobe stammen zoals *Escherichia coli* of enterococci. Deze bacteriën creëren een sterk gereduceerd milieu en maken zo de groei van strict anaëroben mogelijk. In de loop van het eerste levensjaar stabiliseert de darmbiota zich en vertoont geleidelijk de samenstelling van de volwassen biota (Fig. 8). Wanneer een persoon ouder wordt, kan zowel het microbiële spectrum als de metabole activiteiten van zijn of haar darmbacteriën wijzigen. Bij ouderen bijvoorbeeld vermindert de concentratie van bifidobacteriën, terwijl de populatie

van *Clostridium perfringens* duidelijk toeneemt. Dit wordt veroorzaakt door vele factoren, onder andere door een gewijzigd voedingspatroon en het meer voorkomen van spijsverteringsaandoeningen.

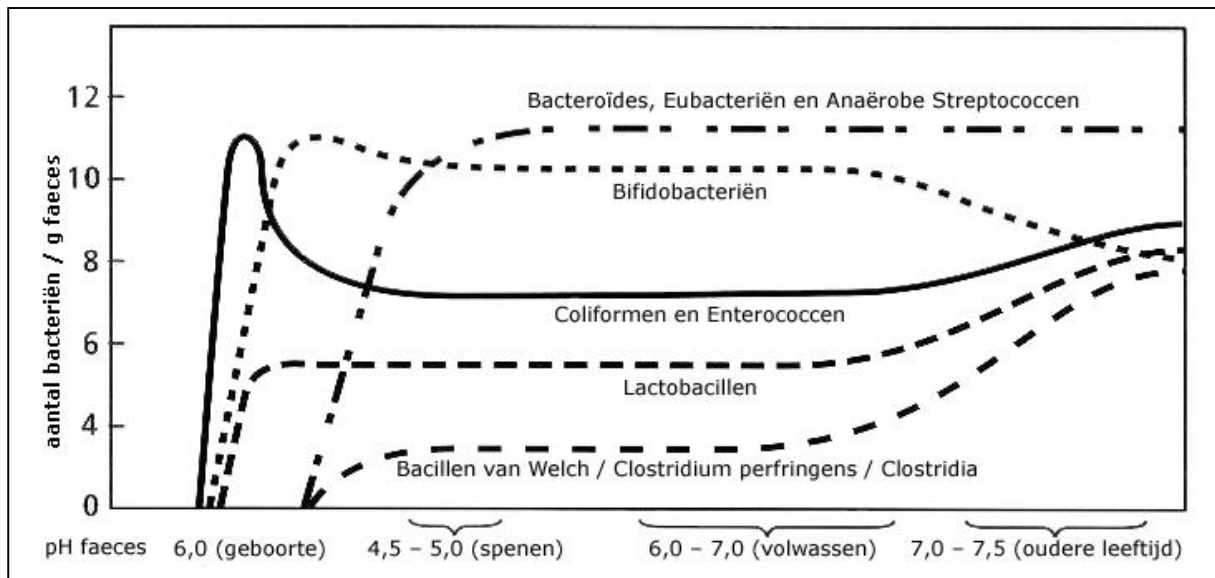


Fig. 8 Evolutie van de intestinale biota met de leeftijd (Mitsuoka, 1982)

De activiteit van colonbacteriën wordt beïnvloed door talrijke factoren zoals substraatbeschikbaarheid, redoxpotentiaal, pH, O₂-druk en de verdeling in het colon (Cummings & Macfarlane, 1991). De micro-organismen in het proximale (rechter) colon hebben bijvoorbeeld een veel groter aanbod aan voedingsstoffen en groeien bijgevolg sneller met een daling in de pH en een intense korte-ketenvetzuurproductie (KKVZ, zie verder) tot gevolg. In het distale (linker) colon is de substraatbeschikbaarheid veel lager waardoor deze bacteriën trager groeien en de pH terug stijgt tot een neutrale waarde. Dit toont nogmaals de hoge graad van heterogeniteit van het intestinaal microbiële ecosysteem.

4.4. Fermentatie

4.4.1. Substraten voor fermentatie (Cummings, 1997)

Fermentatie wordt gestuurd door de hoeveelheid en het type substraat dat beschikbaar is voor de colonflora. In tegenstelling tot herkauwers, waar het hele dieet de fermentatiekamer binnenkomt, moet de colon het stellen met de resten die niet zijn verteerd en geabsorbeerd in

de dunne darm. De functie van de dikke darm is dus nauw gerelateerd aan de ‘verteringsfylosofie’ in de dunne darm. De voornaamste substraten voor fermentatie worden voorgesteld in Tabel 3.

Tabel 3 Beschikbare substraten voor fermentatie in het menselijk colon (Cummings, 1997)

Type substraat		Hoeveelheid (g/dag)
Koolhydraten	Resistent zetmeel	5-35
	Niet-zetmeel polysacchariden	10-25
	Oligosacchariden	2-8
	Suikers en suikeralcolholen	2-5
	Synthetische koolhydraten, zoals lactulose, pyrodextrines, gemodificeerde cellulose	polydextrose, niet gekend
	Totaal	20-60
Eiwitten	Voedingseiwit (N x 6,25)	1-12
	Endogeen, bv. pancreasenzymen en andere secreties	4-8
	Ureum, nitraat	0,5
	Totaal	5-20
Andere		? 3-5
	Mucus	niet gekend
	Microbiël recyclage	niet gekend
	Afgeschifderde epitheelcellen	niet gekend
	Organische zuren	niet gekend

De voornaamste substraten voor bacteriële groei zijn de voedingskoolhydraten die ontsnappen aan de vertering in de dunne darm. Tussen 20 en 60 g/d koolhydraten bereiken het colon. Er wordt geschat dat 5 tot 35 g/d resistent zetmeel bijdraagt als de voornaamste fractie van het beschikbaar fermenteerbaar substraat, gevolgd door 10 tot 25 g/d niet-zetmeel polysacchariden, 2 tot 5 g/d niet geabsorbeerde suikers en 2 tot 8 g/d oligosacchariden. Het grootste deel van de eenvoudige suikers en oligosacchariden wordt echter geabsorbeerd door de dunne darm. Maar enkele suikers zoals lactose, raffinose, stachyose, fructooligosacchariden (zoals oligofructose en inuline) zijn in staat om de dikke darm intact te bereiken. Daarnaast worden vele voedseladditieven en suikeralcoholen, zoals sorbitol en xylitol, niet geabsorbeerd in de dunne darm. Tenslotte is er ook een bijdrage van 2 tot 3 g/d endogene koolhydraten.

De eiwitfractie maakt een kleiner deel uit van de restmassa die de dikke darm binnenkomt. Daarvan is ongeveer 1 tot 12 g/d voedingseiwit en 4 tot 8 g/d van endogene oorsprong, zoals pancreasenzymen.

4.4.2. Regionale verschillen

Er werd al vermeld dat er verschillen zijn tussen het caecum en het rectum in de concentraties korte-ketenvetzuren, vochtgehalte en pH. Dit wordt verklaard door het feit dat het caecum en de rechterzijde van het colon bevoorraad wordt door een relatief hoge concentratie koolhydraten die voornamelijk gefermenteerd worden tot korte-ketenvetzuren. Naarmate de voedselresten verder schuiven daalt de verhouding van de koolhydraten ten opzichte van de eiwitten, waardoor de eiwitafbraak en aminozuurfermentatie geleidelijk gaat overheersen. In het rectum en de linkerzijde van het colon accumuleren vooral vertakte-ketenvetzuren, fenolen en amines, en vertonen een aanzienlijk aantal bacteriën methanogene en sulfaatreducerende eigenschappen. Deze contrasten worden samengevat in Fig. 9.

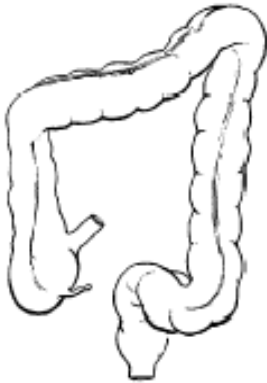
<p>Rechterkant</p> <ul style="list-style-type: none"> koolhydraatrijk hoog vochtgehalte veel korte-ketenvetzuren lage pH verblijftijd van 6-16 uur bacteriële groei voornamelijk H₂ en CO₂ 		<p>Linkerkant</p> <ul style="list-style-type: none"> rijk aan eiwitten weinig vrij water minder korte-ketenvetzuren neutrale pH verblijftijd van 12 tot 36 uur tragere bacteriële groei H₂, CO₂ en CH₄ amines, fenolen en ammoniak
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fig. 9 Regionale verschillen in de colonfunctie van de mens (naar Cummings, 1997)

4.4.3. Korte-ketenvetzuren (KKVZ)

4.4.3.1. Fysiologische effecten van KKVZ

Korte-ketenvetzuren (SFCA, short chain fatty acids) zijn de belangrijkste eindproducten van bacteriële fermentatie. Slechts ongeveer 5% van de KKVZ die in het colon worden geproduceerd, wordt uitgescheiden met de faeces; de rest wordt gemetaboliseerd door de gastheer. De KKVZ productie in het colon bedraagt ongeveer 400 mmol per dag, met een waarschijnlijke variatie van 150 tot 600 mmol per dag (Cummings & Macfarlane, 1991). Deze vetzuren dragen niet wezenlijk bij aan de energiebehoeften van het individu aangezien slechts tot 240 kcal per dag afkomstig zijn van fermentatie, circa 10% van de dagelijkse energiebehoeften. Korte-ketenvetzuren zijn echter van belang in talrijke andere processen, aangezien ze een invloed hebben op het transport in de epitheelcellen, het colonocyt metabolisme, groei en differentiatie, hepatische controle van vetten en koolhydraten, en energie leveren aan spieren, nieren, hart en hersenen.

4.4.3.2. KKVZ spectrum

De belangrijkste KKVZ die resulteren van zowel koolhydraat als aminozuur fermentatie zijn acetaat, propionaat en butyraat. Formaat, valeraat, caproaat en de vertakte-ketenvetzuren isobutyraat, 2-methyl-butyraat en isovaleraat, die gevormd worden gedurende het katabolisme van vertakte-ketenaminozuren, komen in kleinere hoeveelheden voor (Macfarlane & Macfarlane, 2003). Andere fermentatieproducten, zoals lactaat, ethanol en succinaat, die intermediären zijn in het globaal fermentatieproces, worden gemetaboliseerd tot KKVZ door 'cross-feeding' species in het ecosysteem en accumuleren over het algemeen niet in significante hoeveelheden de darm (Gibson & Roberfroid, 1995).

4.4.3.3. Invloedsfactoren op de KKVZ productie

De vorming van korte-ketenvetzuren door intestinale bacteriën wordt gereguleerd door vele omgevings-, voedings-, gastheer- en microbiologische factoren, maar in brede termen bepalen vooral de substraatbeschikbaarheid, het bacteriële spectrum en de intestinale verblijftijd de hoeveelheid en het type KKVZ dat geproduceerd wordt in gezonde individuen. De meerderheid van de KKVZ in de darm worden, voornamelijk in het proximale colon, afgeleid van bacteriële afbraak van complexe koolhydraten, maar de bijdrage van eiwitten en peptiden

in de KKVZ productie stijgt naarmate de voedselresten verderschuiven doorheen de darm. Bacterieel H_2 metabolisme beïnvloedt ook de manier waarop KKVZ worden gemaakt. Dit volgt uit het feit dat bij de aanwezigheid van anorganische electronen acceptors (nitraat en sulfaat) meer geoxideerde KKVZ, zoals acetaat, gevormd worden ten koste van meer gereduceerde vetzuren zoals butyraat.

4.4.4. H_2 metabolisme

4.4.4.1. Inleiding

Gasproductie maakt een integraal deel uit van de fermentatie. Figuur 10 toont de gemiddelde samenstelling van het intestinaal gas (Levitt, 1971).

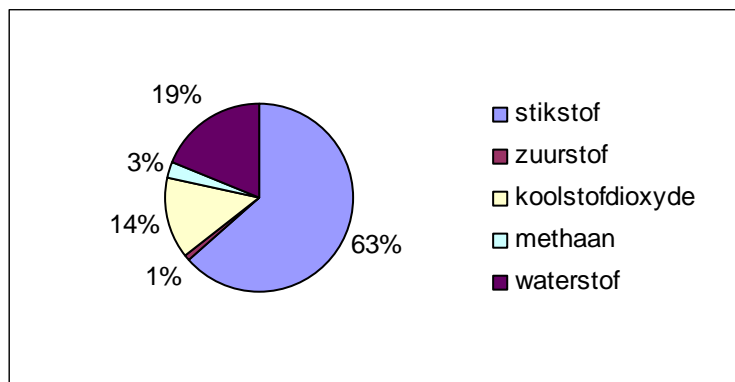


Fig. 10 Samenstelling van het intestinaal gas (naar Levitt, 1971)

De dagelijkse totale gasproductie bij fermentatie varieert, voornamelijk in relatie tot het dieet, met waarden van 0,5 tot 4 liter per dag (Levitt, 1971; Christl et al., 1992). Een aantal studies tonen dat de consumptie van bonen, vruchtensappen, granen, spruiten en voedingsvezel de gasproductie aanzienlijk verhoogd, net zoals de opname van niet-absorbeerbare suikers zoals lactitol en lactulose en andere laag molecuair gewicht koolhydraten (Cummings, 1997). Naast de vrijstelling via de ‘flatus’, wordt een aanzienlijk deel van de gassen geabsorbeerd en geëxcreteerd via de ademhaling.

Koolstofdioxyde afkomstig van fermentatie equilibreert met de bicarbonaatvoorraad in het lichaam en de vrijstelling via de ademhaling is verwaarloosbaar. Waterstof daarentegen, is uniek voor fermentatie. Het wordt in het colon gevormd door bacteriën om te beschikken over reducerende equivalenten gedurende fermentatie. De vorming is grotendeels het resultaat van

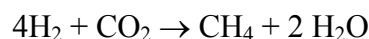
de oxidatie van pyruvaat, formaat, gereduceerde pyridine nucleotides (NADH, NADPH) en gereduceerde ferredoxines.

Er wordt maar een heel kleine hoeveelheid waterstof teruggevonden in de dikke darm in vergelijking met de verwachte stoichiometrische waarden. Dit kan verklaard worden door het feit dat er, naast de excretie als waterstofgas, een aantal alternatieve pathways bestaan voor de vrijstelling of het gebruik van waterstof. Deze pathways omvatten methanogenese, acetogenese, nitraat en sulfaat reductie, lactaat en ethanol vorming, en de incorporatie van reducerende equivalenten in de biomassa (Cummings, 1997).

De hoeveelheid waterstof is ook gerelateerd aan het type vetzuur dat gevormd wordt. Gedurende fermentatie tot meer geoxideerde producten, zoals acetaat, wordt H₂ gegenereerd als electronendonor terwijl de vorming van meer gereduceerde producten zoals propionaat een netto waterstof consumptie vergt.

4.4.4.2. Methanogenese

Methaanvorming bij mensen is nog een groter raadsel dan de H₂ productie. In studies bij de Westerse bevolking was er maar bij 30 tot 50 % van de proefpersonen CH₄ in de adem detecteerbaar (Mckay et al., 1985; Pitt et al., 1980). De methanogene bacteriën (MB) in de dikke darm hebben een obligate behoefte aan H₂. De voornaamste CH₄-producerende soort is *Methanobrevibacter smithii* die CO₂ reduceert met H₂ volgens de volgende vergelijking (Miller et al., 1984):



Methanosphaera stadtmanae kan ook geïsoleerd worden uit sommige faecale stalen en deze soort combineert methanol met H₂ zoals getoond in de vergelijking (Miller et al., 1982):



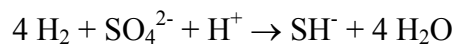
Onderzoek heeft aangetoond dat CH₄ productie vooral in het distale colon voorkomt (Macfarlane et al., 1992). Kinderen jonger dan twee jaar excreteren geen CH₄. De productie stijgt langzaam tot een maximum bij ongeveer tien jaar. Er is een sterke associatie in CH₄ excretor status tussen familieleden en er wordt opmerkelijk meer CH₄ productie gedetecteerd bij mensen met darmkanker (Cummings, 1997). De methaanproductie is echter, in contrast

met de H₂ productie, niet onderhevig aan variatie in functie van het dieet (Steggarda et al. 1966).

In tegenstelling tot herkauwers, lijkt de methanogenese bij mensen de KKVZ productie niet significant te beïnvloeden. De molaire verhoudingen van acetaat, propionaat en butyraat zijn gelijkaardig in methanogene en niet-methanogene individuen (Cummings, 1997).

4.4.4.3. Sulfaatreductie

Een andere alternatieve pathway voor de verwijdering van H₂, gegenereerd door fermentatie in het colon, is de reductie van sulfaat tot sulfide door dissimilatorische sulfaat reducerende bacteriën (SRB). Ze gebruiken H₂ volgens de vergelijking:



Deze anaërobe bacteriën werden voor het eerst geïsoleerd uit menselijke faeces in 1977. Het voornaamste genus is *Desulfovibrio*, dat 64 tot 81 % van alle SRB omvat die geïsoleerd werden in recentere studies (Gibson et al., 1993). Deze stammen zijn in staat om gasvormig waterstof als electronendonor te gebruiken voor de reductie van sulfaat tot sulfide en zijn zo verantwoordelijk voor een substantiële consumptie van H₂ in het colon. Sulfaatreducerende bacteriën hebben, net zoals de methanogene bacteriën, een voorkeur voor groei in het distale colon (Gibson et al., 1988; Macfarlane et al., 1992). Het is daarom niet verwonderlijk dat deze twee groepen in competitie treden voor het mutuele groeisubstraat H₂. Er werd aangetoond dat toediening van sulfaat aan gezonde methanogene individuen een inhibitie van de methaanexcretie veroorzaakt en dat de SRB toenemen in deze proefpersonen waar aanvankelijk een laag aantal SRB aanwezig was (Christl et al., 1992). Alhoewel veel verschillende electronendonors potentieel beschikbaar zijn in het colon en als dusdanig kunnen dienen voor sulfaatreductie, zijn species die behoren tot de genera *Desulfovibrio* en *Desulfobulbus* efficiënte H₂ verbruikende bacteriën (Gibson et al., 1990). In een competitieve omgeving zoals het colon waar H₂ het limiterend substraat is, zijn SRB in staat om de partiële druk van H₂ te verlagen tot een niveau waarbij de MB niet meer efficiënt kunnen concurreren. Dit proces kan natuurlijk enkel doorgaan wanneer voldoende electronen acceptor (SO₄²⁻) beschikbaar is. Studies met zuivere culturen hebben aangetoond dat SRB een veel grotere substraataffiniteit hebben voor H₂ dan methanogenen. (voor *Desulfovibrio vulgaris* K_s = 1 mmol/L; voor *Methanobrevibacter smithii* K_s = 6 mmol/L).

Er bestaat dus duidelijk een sterke inverse relatie tussen methanogenese en sulfaatreductie, op voorwaarde dat er voldoende sulfaat aanwezig is. De sulfaatbeschikbaarheid speelt dus ongetwijfeld een sleutelrol in het waterstofverbruik. Daarnaast blijken ook andere factoren zoals pH, bacteriële spreiding in het colon en nutritionele status van de individuen een rol te spelen.

Dissimilatorische sulfaatreductie is echter een klinisch ongewenste methode om H₂ te verwijderen omdat het eindproduct, H₂S, erg toxisch is voor de colonische mucosale barrière en het cellulair metabolisme kan schaden (Cummins, 1997). Methaan daarentegen, is relatief schadeloos en wordt gemakkelijk verdreven.

4.4.4.4. Acetogenese

De situatie wordt verder gecompliceerd door het bestaan van andere potentiële pathways voor H₂ verwijdering door colonische bacteriën. Homoacetogene bacteriën zijn in staat om 2 mol CO₂ te reduceren tot acetaat aan de hand van H₂ (Nollet et al., 1996; Leclerc et al., 1997):



Acetogenese is echter energetisch minder gunstig dan sulfaatreductie of methanogenese, waardoor acetogene bacteriën, onder normale omstandigheden, uit het veld geslagen worden door sulfaatreducerende of methanogene bacteriën (Breznak & Kane, 1990; Wolin & Miller, 1993). Daarom wordt een significante acetogene activiteit enkel verwacht in omstandigheden die ongunstig zijn voor methanogenese of sulfaatreductie (Nollet et al., 1996).

5. Doelstelling van dit eindwerk

Er bestaat een variëteit aan potentiële mechanismen waarmee isoflavonen een positief effect uitoefenen op een aantal chronische ziekten zoals borst- en prostaatkanker, cardiovasculaire aandoeningen, osteoporose en postmenopausale verschijnselen. De resultaten van de experimenten, die werden uitgevoerd om de klinische responsen van soja diëten na te gaan, zijn echter nogal variabel. Recente voedingsinterventiestudies zinspelen op het potentieel belang van equol omwille van de vaststelling dat maximale klinische responsen op soja diëten werden geobserveerd bij mensen die goede equolproducenten waren. Het is nu duidelijk dat het opdelen van de proefpersonen in twee subpopulaties op basis van het vermogen om al dan niet equol te vormen een mogelijke sleutel is om de variabiliteit van de effecten van soja diëten ter behandeling of ter preventie van hormoonafhankelijke ziekten te verklaren. Recent is de wetenschap steeds meer interesse gaan tonen in equol omwille van de superieure antioxidatieve en oestrogene werking en de betere absorptie ten opzichte van zijn precursor. Sommige onderzoekers zijn ervan overtuigd dat de positieve effecten van de consumptie van soja hoofdzakelijk aan dit metaboliet te danken zijn. Er is echter maar 35 % van de Westerse bevolking in staat om equol aan te maken. Dit weerspiegelt de grote interindividuele variabiliteit in samenstelling en activiteit van de darmbiota. De identiteit van de verantwoordelijke bacteriën, de microbiële-ecologische mechanismen en de dieetfactoren die deze omzetting beïnvloeden zijn tot op heden nog niet opgehelderd en maken voorwerp uit van intensief en diepgaand onderzoek.

Er werd in LabMET recent een microbiële consortium geïsoleerd dat in staat is om op een efficiënte manier daidzeïne uit soja om te zetten tot equol, en dat tevens gemakkelijk bewaard, opgekweekt en overgeënt kan worden. Deze bacteriën werden nog niet geïdentificeerd. Daarom zullen de species in een eerste fase van dit eindwerk geïdentificeerd worden via sequencerings van 16S rDNA fragmenten. Identificatie kan al enig licht werpen op metabole eigenschappen van de species die kunnen gerelateerd zijn met de equolproductie.

In een tweede fase zal, aan de hand van het equolproducerend consortium, nagegaan worden welke factoren het equolproductieproces kunnen beïnvloeden. Dit zal onderzocht worden door het consortium te laten opgroeien in aanwezigheid van daidzeïne waarbij diverse factoren zullen

gevarieerd worden om een optimale equolproductie te bereiken. Ook de relatie tussen de equolproductie en de verschillende pathways in het colon om waterstof te verwijderen zal nagegaan worden door koolstofdioxide, sulfaat en nitraat toe te dienen aan het groeimedium. Deze karakterisatie van de invloedsfactoren zal leiden tot relevante kennis omtrent het equolproducerend consortium die kan aangewend worden bij de opheldering van de pathway en de verdere isolatie van de verantwoordelijke bacteriële species via een combinatie van microbiële en chemische analytiek. Eenmaal de optimale omstandigheden voor equolproductie zullen gekend zijn, kan er immers onder gerichte voorwaarden gewerkt worden waarbij deze bacteriën bevoordeeld worden.

In een derde fase van dit eindwerk zullen tenslotte de slaagkansen van het consortium als probioticum geëvalueerd worden. Dit potentieel probioticum zal in de praktijk kunnen gebruikt worden om de equolproductie bij de Westerse bevolking te optimaliseren waardoor mogelijks een groter deel van de populatie zal kunnen genieten van de weldadige effecten van equol.

Om als probioticum te kunnen gebruikt worden, dienen de bacteriën de maagzuur en galzouten - barrière te overwinnen en eenmaal in de darm moeten ze kunnen concurreren met de daar aanwezige bacteriën. Daartoe zal de resistentie tegen maagzuur en galzouten beoordeeld worden en zal onderzocht worden of de bacteriën nog steeds equol vormen bij incubatie in aanwezigheid van autochtone colonbiota. Tenslotte zal nagegaan worden of het consortium nog equol vormt na lyofilisatie. De mogelijkheid tot lyofilisatie biedt immers heel wat voordelen, zowel op het gebied van bewaring als voor praktische implementatie.

Deel II

Materialiaal & methoden

1. Identificatie van een equolproducerend consortium

1.1. Microbiota

1.1.1. Isolatie van een equolproducerend consortium

Er werd recent een equolproducerend consortium geïsoleerd in LabMET. Hiervoor werden vier Australische faecale stalen (BP01, BP06, BP33 en BP41) geïncubeerd bij 37°C in een BH1a-medium (= Brain Heart Infusion + 0,5 g/L cysteïne) met daidzeïne. Bij één staal (BP41) werd na een paar dagen equol gedetecteerd. Uit dit staal werd een equolproducerend consortium geïsoleerd via een combinatie van uitplating, overenting en equolanalyse.

1.1.2. Opkweek van het consortium

De equolproducerende cultuur werd in de -80°C diepvries bewaard met 40 % glycerol als cryoprotectans. Na licht ontdooien werd 100 µL van deze cultuur steriel overgebracht in een geautoclaveerd penicillineflesje met 10 mL BH1a medium. Na inoculatie werd het medium gespoeld met stikstof en gedurende 48 uur bij 37°C geïncubeerd.

1.2. Technieken

1.2.1. DNA-extractie

1.2.1.1. Principe

De eerste stap in de moleculaire analyse is DNA extractie van de stalen. Hierbij werd gebruik gemaakt van een protocol voor DNA extractie uit slib en grond (Boon et al., 2000). Het totaal genomisch DNA werd geëxtraheerd door een opeenvolging van een mechanische, enzymatische en chemische lyse van de bacteriële cellen. De mechanische lyse gebeurde door de grond heftig te schudden in een ‘bead beater’ in aanwezigheid van glaspereels. Dit werd gevolgd door een enzymatische lyse door de werking van het lysozyme dat de mucopeptidenlaag in de celwand aantast. Tenslotte werden de eiwitten gedeneureerd door het

toevoegen van een surfactans, zoals natriumdodecylsulfaat (SDS), met een chemische lyse tot gevolg.

1.2.1.2. Gebruikte reagentia

- Tris-HCl 10 mM (pH 9)
- Lysozyme (50 mg lysozyme / mL Tris-HCl)
- SDS (natriumdodecylsulfaat, 20 %)
- CHCl₃-IAA (chloroform - isoamylalcohol, 24/1)
- CH₃COO.NH₄ 8M (ammoniumacetaat)
- 100 % isopropanol
- steriel gedestilleerd water

1.2.1.3. Procedure

Fysische lyse

- Meng 2 mL bacteriesuspensie met 4 mL Tris-HCl 10 mM (pH 9) in een 10mL tube (polypropyleen).
- Schud de buisjes intens manueel.
- Voeg 3 g glaspereels toe (0,10-0,11 mm diameter, Braun Biotech International, Melsungen, Duitsland).
- Schud de tubes mechanisch met een bead beater (Braun Biotech International, Melsungen, Duitsland): 3 x 90 seconden met telkens 10 seconden tussenpauze om oververhitting te vermijden.

Enzymatische lyse

- Voeg 160 µL lysozyme toe aan de tubes.
- Meng 10 minuten zachtjes op een schudder (150 tpm).

Chemische lyse

- Voeg 300 µL SDS (20 %) toe en schudt manueel voorzichtig gedurende 5 minuten (anders wordt het DNA teveel gefractioneerd).

Opzuivering van het DNA

- Voeg 1 mL ammoniumacetaat (8M) toe.
- Centrifugeer gedurende 15 minuten bij 4°C aan 7000 tpm.
- Breng het supernatans in een nieuwe tube (10 mL) en voeg 4mL CHCl₃-IAA toe (neerslaan van eiwitten).
- Schud manueel tot een homogene oplossing verkregen wordt (melkachtig uitzicht).
- Centrifugeer gedurende 15 minuten bij 4°C aan 7000 tpm.
- Breng de waterfase in een nieuwe tube (10mL) en voeg 0,8 volumes (t.o.v. waterfase) 100 % isopropanol toe.
- Meng intens en laat minimum 1 uur precipiteren bij –20 °C (precipitatie van het DNA in de suspensie).
- Centrifugeer gedurende 25 minuten bij 4°C aan 10500 tpm (neerslaan van het DNA).
- Laat de pellet (na afgieten van het supernatans) drogen bij kamertemperatuur gedurende minimum 15 minuten.
- Voeg afhankelijk van de grootte van de pellet +/- 250 µL steriel gedestilleerd water toe om de pellet terug op te lossen.
- Bewaar de oplossing bij –20°C.

1.2.2. Agarose gel elektroforese

1.2.2.1. Principe

Om de aanwezigheid van DNA in een oplossing te verifiëren, maakt men gebruik van gel elektroforese.

Agarose is een polyssacharide dat uit zeewier gewonnen wordt. Bij de bereiding van de gel wordt de agarose opgekookt in een TAE buffer, waarna het mengsel uitgegoten wordt in een houder en stolt. In neutraal tot licht alkalisch milieu zijn de fosfaatgroepen van het DNA gedissocieerd en dus negatief geladen. Door het aanleggen van een elektrisch veld over een agarose gel zal het (negatief) geladen DNA migreren in de richting van de positieve pool. De gel is een netwerk van agarose strengen en de snelheid van migratie doorheen de gel wordt bepaald door de afmetingen van het DNA, de porositeit van de gel en de sterkte van het elektrisch veld. De porositeit van de gel is afhankelijk van de concentratie aan agarose.

Gedurende de migratie doorheen de gel wordt het DNA gescheiden op basis van zijn lengte. Grote moleculen bewegen moeilijker door de gel en bevinden zich dus bovenaan.

Het DNA kan gevisualiseerd worden door ethidium bromide toe te voegen aan de gel. Dit mutageen product intercaleert tussen de baseparen van het dubbelstrengig DNA en fluoresceert oranje-rood bij belichting met ultraviolet licht (590 nm). Hierdoor wordt het DNA-patroon visueel zichtbaar en kan het bandenpatroon fotografisch vastgelegd worden.

Om de grootte van de DNA-fragmenten te kennen, worden DNA-lengtemerkers gebruikt. Dit zijn stukken DNA met gekende sequentie die geknipt zijn door een bepaald restrictie-enzym. Door het feit dat hun sequentie gekend is, kent men ook de grootte van de geknipte DNA-fragmenten en kunnen deze bij een agarosegel-elektroforese gebruikt worden als referentie.

1.2.2.2. Benodigdheden

- Agarose (Gibco BRL, Ultra pure agarose electrophoresis grade).
- TAE-buffer: Tris Acetaat EDTA-buffer, verdunnen tot 0,5 x (Applichem, Darmstadt, Duitsland)
- Ethidiumbromide (EtBr, 10 mg/mL, Bio Rad, Hercules, CA, USA). Deze stof is mutageen en waarschijnlijk ook carcinogeen.
- Ladingsbuffer: 0,25 % broomfenolblauw (maakt zichtbaar hoever het DNA in de gel gemigreerd is) en 40 % (w/v) sucrose (werkt verzwarend en zorgt dat het DNA in de uitsparingen van de gel zinkt bij het laden) in H₂O.

1.2.2.3. Procedure

- Voeg aan de TAE buffer 1 % (van het totaalvolume) agarose toe en kook op tot een heldere oplossing bekomen wordt.
- Laat afkoelen tot handwarm en voeg 2µL per 100 µL ethidium bromide toe.
- Meng goed en giet de oplossing in een gelhouder voorzien van een kam en laat de gel gedurende 20 minuten polymeriseren.
- Verwijder na stollen de kam uit de gel zodat uitsparingen in de gel achterblijven waarin het DNA geladen kan worden.
- Plaats de gel en houder in het elektroforesetoestel, gevuld met TAE buffer (0,5x).

- Vermeng 5 μ L van het te scheiden DNA met 2 μ L ladingsbuffer en breng het mengsel in de uitsparingen van de gel.
- Leg een stroom aan van 100 V zodat de positieve pool zich het verst van de DNA stalen bevindt. Op deze wijze migreren de stalen door de gel in de richting van de positieve pool. Laat het DNA ongeveer 20 minuten migreren.
- Na scheiding wordt het DNA gevisualiseerd via UV belichting van het intercalerende ethidium bromide. Het DNA wordt hierdoor zichtbaar als horizontale banden. Met een videocamerasysteem (Vilber Lourmat, Marne-La-Valée, Frankrijk) kan de gel gefotografeerd worden en opgeslagen worden in de computer of op thermisch papier afgedrukt worden (P90E printer, Mitsubishi, Japan)

1.2.3. PCR

1.2.3.1. Principe

De *polymerase chain reaction* (PCR) is een cyclisch, exponentieel *in vitro* DNA amplificatieproces waarbij het fenomeen van *in vivo* DNA-replicatie wordt nagebootst. Hierbij zijn volgende componenten noodzakelijk:

- Enkelstrengige DNA-template(s)
- Primers: korte oligonucleotiden (15 à 30 basen) complementair met de uiteinden van de sequentie die men wil amplificeren
- Deoxyribonucleosidetrifosfaten (dNTP's)
- DNA-polymerase

Een enkelstrengige DNA-template kan gemakkelijk door warmtedenaturatie bekomen worden. De introductie van een hittebestendig DNA-polymerase, geïsoleerd uit thermofiele bacteriën zoals *Thermus aquaticus*, heeft automatisatie van de cycli mogelijk gemaakt. Elke cyclus vergt drie verschillende temperatuurstadia:

1. Denaturatie van de DNA-duplex bij 92 tot 96°C
2. Hybridisatie (*annealing*) van de specifieke primers met de complementaire sequenties van het DNA bij 45 tot 72 °C. De primers worden in overmaat toegevoegd.
3. Extensie van de primers aan hun 3' uiteinde door de werking van het DNA-polymerase dat nucleotiden incorporeert die bij het begin van de reactie worden toegevoegd. Deze verlenging gebeurt bij 72°C.

Deze driedelige cyclus wordt 25 à 40 keer herhaald. De syntheseproducten uit elke cyclus dienen als template (PCR substraat) voor de primers van de volgende cyclus. Zo wordt de hoeveelheid template met elke cyclus vergroot. Herhaalde cycli van amplificatie leiden theoretisch tot een exponentiële synthese van een DNA-fragment waarvan de uiteinden gedefinieerd worden door de 5'-uiteinden van de respectievelijke primers betrokken in de reactie. Dit wordt geïllustreerd in Fig.11.

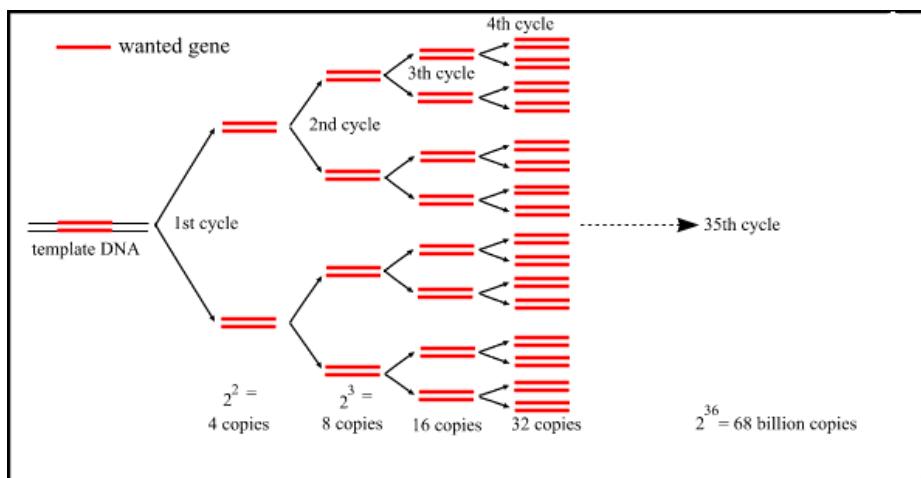


Fig. 11 Het exponentieel amplificatieproces tijdens de Polymerase Chain Reaction

1.2.3.2. Reagentia

Om afwijkingen ten gevolgen van het pipetteren van zeer klein volumes te voorkomen werd een 'PCR mastermix' aangemaakt. De samenstelling ervan is opgenomen in Tabel 4.

Tabel 4 Samenstelling van 100 µl master mix

Component	volume (µl)
Nuclease-vrij water	83,25
Reactiebuffer (10X)	10
500 mM KCl	
100 mM Tris-HCl (pH 9)	
1,0 % Triton® X-100	
15 mM MgCl ₂	
Nucleotide-mix (elk 10 mM)	2
Primer 1 (25 µM)	2
Primer 2 (25 µM)	2
Bovine serum albumine (BSA, 160 µg/mL)	0,25
Taq-polymerase (5 U/µl)	0,5
Totaal volume	100

1.2.3.3. Werkwijze

In elk epje werd 24 µL van de mastermix gebracht en 1 µL DNA. Ter controle werd er ook aan een epje geen DNA toegevoegd. Amplificatie in dit epje wijst op contaminatie met vreemd DNA. De epjes werden in het PCR-toestel gebracht en naargelang de primers werd een programma (Tabel 5) gekozen.

Tabel 5 PCR programma's

DNA-sequentie	Primers	Temperatuur-tijd programma
16S rDNA	63F, 518R	a) 94°C, 5'
TdnQ	tdnQ1F, tdnQ1R	b) 95°C, 1' / 52°C, 1' / 72°C, 1' (29X) c) 72°C, 10'
IncPα	<i>trfA1</i> 1, <i>trfA1</i> 2	a) 94°C, 5'
IncPβ	<i>trfA2</i> 1, <i>trfA2</i> 2	b) 94°C, 1' / 57°C, 1' / 72°C, 1' (35X) c) 72°C, 10'
CCD	CCDb, CCDe	a) 96°C, 2' b) 96°C, 1' / 48°C, 1' / 72°C, 1' (35X) c) 72°C, 6'
Afhankelijk van ingevoegd fragment	M13F, M13R	a) 94°C, 5' b) 95°C, 1' / 53°C, 1' / 72°C, 1' (30X) c) 72°C, 10'

Om te controleren of de amplificatie correct heeft plaatsgevonden, werd 5 µL van het PCR product op een agarosegel geladen samen met een lengtemerker. Dit geeft duiding over de lengte van het geamplificeerde product. Het syntheseproduct werd bewaard bij -20°C.

1.2.4. Denaturerende gradiënt gel elektroforese (DGGE)

1.2.4.1. Principe

DGGE is een elektroforetische scheidingstechniek waarbij in een polyacrylamide matrix een denaturerende gradiënt aangelegd wordt. Hierdoor wordt het dubbelstrengig DNA onderworpen aan een stijgende denaturerende omgeving waardoor het begint te dissociëren. De denaturerende bestanddelen, ureum en formamide, verzadigen de waterstofbruggen tussen de complementaire basen op de twee DNA strengen. Omdat GC-basenparen verbonden zijn via drie waterstofbruggen en AT-basenparen maar contact maken via twee bruggen, worden GC-paren moeilijker gescheiden en vereist de scheiding een hogere concentratie denaturerende agentia. Naargelang de sequentie (GC %) van het fragment zal het dus hoger of lager in de gel beginnen dissociëren. De dissociatie gaat gepaard met een uitzetting van de molecule waardoor de elektroforetische mobiliteit en dus de migratiesnelheid afneemt. Fragmenten met een zelfde lengte maar verschillende DNA sequentie eindigen dus op verschillende hoogte in de gel. Sequenties met een hoog GC-gehalte worden hierbij dus onderaan de gel teruggevonden na scheiding.

Om volledige scheiding van de strengen te verhinderen (wat aanleiding kan geven tot twee zichtbare banden) wordt aan een uiteinde tijdens de PCR amplificatie een GC-klem ingebouwd. Dit is een fragmentje met heel hoog GC % dat nooit volledig dissocieert. Hierdoor worden de complementaire strengen samengehouden.

Na de scheiding kan men de banden zichtbaar maken met SYBR Green. Meestal wordt gebruik gemaakt van primers die het 16S rRNA-gen amplificeren. Dit gen is aanwezig in alle bacteriën en bestaat uit geconserveerde en variabele delen. Dankzij deze variabele delen is het mogelijk om een onderscheid te maken tussen verschillende bacteriën. De primers amplificeren deze variabele delen tot DNA-fragmenten met dezelfde lengte maar met een verschillende basepaarsequentie. Na scheiding op een denaturerende gel bekomt men een bandenpatroon waarin iedere band in principe overeenstemt met 1 species.

1.2.4.2. Materiaal

Om de gels te maken wordt gebruik gemaakt van 3 oplossingen met verschillende concentratie aan denaturerende agentia. De samenstelling van de oplossingen die gebruikt worden bij de bereiding van een 8 % polyacrylamide gel met een denaturerende gradiënt die oploopt van 45 % tot 60 % wordt gegeven in Tabel 6.

Tabel 6 De samenstelling van de oplossingen die gebruikt worden bij de bereiding van een 8 % polyacrylamide gel met een denaturerende gradiënt die oploopt van 45 % tot 60 %

Component	0 %	45 %	60 %
Acrylamide (40 %) (mL)	10	10	10
BisAA (2 %) (mL)	2,5	2,5	2,5
TAE (50 x) (mL)	1	1	1
Ureum (g)	-	9,4	12,5
Formamide	-	9	12

- Ammoniumpersulfaat (APS) (Bio Rad, Hercules, CA, USA): 0,1 g in 1 mL milli-Q water
- TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethyleendiamine) (Applichem, Darmstadt, Duitsland)
- Gradient Delivery System, Bio Rad model 475 (Bio Rad, Hercules, CA, USA)
- 2 glasplaten met spacers en klemmen
- DGGE toestel, Bio Rad D Gene System (Bio Rad, Hercules, CA, USA)
- 1x TAE buffer om het toestel te vullen (Applichem, Darmstadt, Duitsland)
- SYBR Green I nucleic acid stain (FMC Bioproducts, Maine, USA)

1.2.4.3. Procedure

Bereiding van de gel

De glazen platen en de spacers worden gereinigd met milli-Q water, vervolgens met ethanol en dan terug met milli-Q water. De glazen worden met stofvrije doekjes nauwkeurig afgedroogd. De spacers worden tussen de platen geplaatst en vastgehouden in de klemmen. De afstand tussen de spacers wordt geregeld met een blad met gecalibreerde breedte. De onderkant wordt met tape afgeplakt en het geheel wordt waterpas gezet.

Vervolgens wordt de bodemgel bereid:

- 1 mL 60 % denaturatie-oplossing
- 10 μ L APS (10 %, vers aangemaakt)
- 1 μ L TEMED (4°C)

De bodemgel wordt met behulp van een pipet snel tussen de platen gebracht. De gel moet tenminste gedurende 1 uur polymeriseren, afgeschermd van het licht met aluminiumfolie (licht verhindert de polymerisatie).

Hierna wordt de eigenlijke polyacrylamide gel gemaakt:

- Breng 10 mL van de vers aangemaakte 60 % en 45 % gradiënt oplossingen in een 10 mL tube en voeg bij beide oplossingen 100 μ L APS en 10 μ L TEMED.
- Meng de tubes goed en zuig de vloeistof snel op met de geschikte spuit; eventuele luchtballen moet hierbij verwijderd worden.
- Breng de spuit in de lagere van een roterend wiel (Gradient Delivery System) zodanig dat de spuit met de hoogste gradiënt het verst verwijderd is (Fig. 12)

BOVENAANZICHT

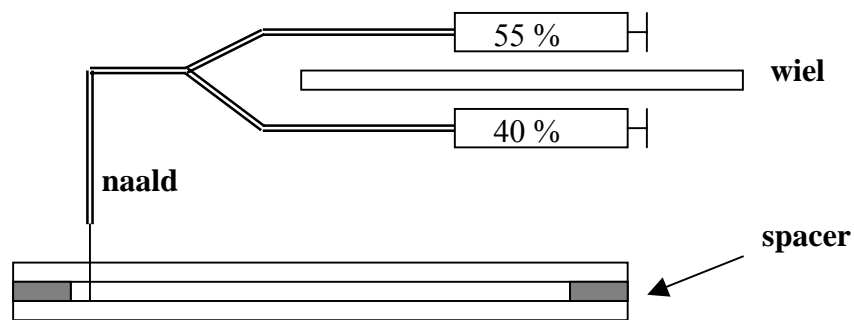


Fig. 12 Schematische voorstelling van opstelling bij de gelbereiding

- Door het wiel voorzichtig en gelijkmatig te draaien worden de twee spuit geleid (de hoogste gradiënt sneller) waarbij een gelijkmatige gradiënt in de gel bekomen wordt.
- Laat de gel gedurende 2 uur polymeriseren, afgeschermd van het licht.

Als een dunne film ureum gevormd is op de gel, wordt die verwijderd met een stofvrij doekje.

Tenslotte wordt de stacking gel aangemaakt:

- 2 mL 0 % denaturatie oplossing
- 2 μ L TEMED
- 20 μ L APS (10 %)

Na mengen wordt het geheel tussen de platen gebracht en in de vers gegoten laag wordt een kam aangebracht. Na ongeveer 1 uur polymerisatie in donkere omstandigheden kan de kam verwijderd worden en ontstaan uitsparingen in de gel waarin het DNA kan geladen worden.

Laden en lopen van de gel

Het DGGE toestel wordt gevuld met 1x TAE buffer en voorverwarmd bij 60°C gedurende 1 uur. Het plakband en de gelkam worden voorzichtig verwijderd. De slotjes worden gereinigd met milli-Q water, waarna de gel in de houder wordt gebracht en ondergedompeld wordt in het toestel. De gel wordt gedeïoniseerd in het apparaat gedurende 1 uur bij 75 V en bij 60 °C. Vervolgens wordt de gel uit het apparaat gehaald en worden de slotjes gereinigd met 1x TAE buffer. De gel wordt geladen met 10 μ L PCR staal, vermengd met 10 μ L ladingsbuffer per slotje. Vervolgens wordt de gel terug in het apparaat geplaatst en wordt gedurende 10 minuten een spanning van 75 V aangelegd. Deze stap zorgt ervoor dat het DNA in de gel getrokken wordt en niet kan wegdiffunderen. Dan vermindert men het voltage en laat men de gel 16 uur lopen bij 38 V en bij 60°C.

Ontwikkeling van de gel

Voor de ontwikkeling van de DGGE gels wordt gebruik gemaakt van SYBR Green I kleuring.

- Verwijder de gel voorzichtig van de glasplaten
- Kleur de gel 20 minuten in een bad met 200 mL 1x TAE buffer en 16 μ L SYBR Green I.
- Onder een UV lamp kunnen de bandjes gevisualiseerd worden en onmiddellijk gefotografeerd worden (de fluorescentie neemt af met de tijd).

1.2.5. Klonering en sequentieanalyse van geamplificeerde 16S rDNA fragmenten

1.2.5.1. Principe

Na amplificatie van het 16S rDNA door PCR bekomt men een mengsel dat DNA fragmenten bevat met een zelfde lengte maar met verschillende sequentie.

Bij de kloneringsreactie worden de PCR-producten in een TOPO TA Cloning® vector (Invitrogen) ingebouwd op een specifieke plaats. Een vector is een synthetisch plasmide, afgeleid van een bacterieel plasmide, waarin een DNA-fragment ingebouwd kan worden. Elke vector bevat maar 1 insert. Deze vectoren worden via chemische transformatie in bijgeleverde competente *E. Coli* cellen getransformeerd. De vector bevat een insertieplaats met 3' deoxythymidine (T) uiteinden. Dit is nodig omdat het bij PCR gebruikte *Taq* DNA polymerase aan het 3' uiteinde een extra deoxyadenosine (A) inbouwt (terminaal transferase activiteit). Zo ontstaan complementaire uiteinden wat het inbouwen vergemakkelijkt. De vector bevat een Ampicilline en een Kanamycine resistentiegen dat cellen die de vector opgenomen hebben resistent maakt tegen beide antibiotica. Op deze wijze is selectie van de transformanten op een medium met een van beide antibiotica mogelijk.

De insertieplaats bevindt zich in het *lacZ* α -gen dat codeert voor het β -galactosidase gen. Dit is betrokken bij het lactosemetabolisme en zet X-gal (5-broom-4-chloor-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) om tot een blauw eindproduct. Kolonies die opgroeien op een medium met X-gal verkrijgen op deze manier een blauwe kleur. Insertie van een fragment in het gen verhindert de productie van een functioneel enzym. De positieve klonen (de kolonies die vector + fragment bevatten) zijn dus te onderscheiden van deze die enkel de vector opnemen doordat ze wit blijven in aanwezigheid van X-gal terwijl de kolonies met enkel de vector blauw worden. Na oppikken kunnen de klonen opgegroeid worden in proefbuizen. Hierdoor verkrijgt men een *in vivo* vermenigvuldiging van afzonderlijke PCR fragmenten.

1.2.5.2. Benodigdheden

- PCR-product
- LB-platen met 50 μ L/mL ampicilline en 20 μ g/mL X-gal (vóór gebruik bij 37°C brengen)
- TOPO® TA CLONING kit

- Glycerol 40 %
- M13 primers

1.2.5.3. Procedure

TOPO cloning reactie

- Breng 2 μL PCR-product in 2 μl steriel water en voeg daarbij 1 μL TOPO[®] clonings vector.
- Meng voorzichtig en incubeer 5 min bij kamertemperatuur.
- Meng 1 μL 6x TOPO[®] cloning stop oplossing toe en meng voorzichtig (10 s).
- Incubeer dit mengsel 30 min op ijs.

Chemische transformatie

- Breng 2 μL TOPO[®] cloning reactie in een vial met 50 μl One Shot[®] cellen.
- Meng voorzichtig en incubeer 30 min op ijs.
- Plaats de cellen gedurende 30 min bij 42°C en zet ze daarna onmiddellijk op ijs.
- Voeg 250 μL SOC medium toe.
- Schud de tube 30 min horizontaal bij 37°C.
- Strijk 25 tot 100 μL van die cellen uit op LB-platen met Ampicilline en X-gal.
- Incubeer overnacht bij 37°C.

Isolatie van de positieve klonen

- Streepent witte kolonies op een LB-medium met Ampicilline en X-gal.
- Kweek deze kolonies overnacht in vloeibaar LB medium met 50 mg/mL Ampicilline bij 37°C.

DNA extractie en amplificatie van kloon DNA

Het DNA werd geëxtraheerd uit de klonen door ze op te koken. Het beste resultaat wordt bekomen door de cultuur eerst in te vriezen bij -18°C en dan gedurende 10 minuten in kokend water te brengen. Door de temperatuurschock treedt lyse op van de celwand en door de hoge temperatuur vindt denaturatie plaats.

Om specifiek het ingebrachte fragment te amplificeren via PCR werd een M13f en M13r primer bijgeleverd die aan weerszijden van het fragment hybridiseren en het tussenliggende fragment vermeerderen (Tabel 7).

Tabel 7 Primers en programma die gebruikt werden om het gekloonde DNA te amplificeren; het ingebrachte DNA werd specifiek vermeerderd met op de vector hybridiserende M13 primers

Primers	Programma
M13f (GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G)	1. 5'; 94°C
M13r (CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC)	2. 1'; 95°C / 1'; 53°C / 2'; 72°C (30 x)
	3. 10'; 72°C

Sequentiebepaling van de klonen

De sequentie van de gekloneerde PCR fragmenten werd bepaald door ITT Biotech (Bielefeld, Duitsland).

Zoeken naar verwante sequenties in gegevensbanken

Sequenties van gekloneerde PCR fragmenten werden vergeleken met sequenties in de NCBI nucleotiden databank via de BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

1.3. Proefopzet

1.3.1. Isolatie via uitplating

Om de verschillende species uit het consortium te isoleren werden ze herhaaldelijk uitgeplaat en overgeënt tot afzonderlijke kolonies werden bekomen die slechts één species bevatten. Hierbij werd het opgekweekt consortium, na een aangepaste verdunning, uitgeplaat op BHla-

medium en gedurende 3 dagen onder een anaërobe atmosfeer geïncubeerd bij 37°C. De bekomen kolonies werden na 3 dagen afzonderlijk overgeënt in vloeibaar BHIa-medium. Na 2 dagen werden de bacteriën opnieuw uitgeplaat. Deze procedure werd een aantal maal herhaald om zuivere kolonies te garanderen. Het 16S rDNA van de geïsoleerde bacteriën werd na amplificatie gecontroleerd op zuiverheid via DGGE. De PCR fragmenten waarvan na scheiding op DGGE slechts één band verschijnt, wijzen immers op een geslaagde isolatie omdat in principe iedere band overeenstemt met één species. De PCR producten die verschillende banden gaven werden geselecteerd. Daarvan werd de sequentie bepaald door ITT Biotech (Bielefeld, Duitsland). Sequenties van gekloneerde PCR fragmenten werden vergeleken met sequenties in de NCBI nucleotiden databank via de BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

1.3.2. Isolatie via klonering

De species die niet konden geïsoleerd worden via uitplatingstechnieken, werden geïsoleerd via klonering. Het DNA van het equolproducerend consortium werd geamplificeerd en gekloneerd in *E. coli* met het TOPO TA Cloning® systeem. De positieve klonen werden in vloeibaar LB-medium opgekweekt. Twintig µL werd bij 180 µL steriel gedestilleerd water gevoegd en 10 minuten opgekookt. Vervolgens werden 2 PCR's uitgevoerd. Eerst met de primerset M13f/M13r om het insert te amplificeren en vervolgens met de primerset PRBA338fGC/P518r om uit het insert de gewenste fragmenten te bekomen. PCR fragmenten werden op DGGE gel gelopen (8 % Acrylamide en een 60 % - 40 % gradiënt) en de PCR producten die verschillende banden gaven werden geselecteerd. Daarvan werd de sequentie bepaald door ITT Biotech (Bielefeld, Duitsland). Sequenties van gekloneerde PCR fragmenten werden vergeleken met sequenties in de NCBI nucleotiden databank via de BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2. Karakterisatie van een equolproducerend consortium

2.1. Microbiota

2.1.1. Opkweek van het consortium

De equolproducerende cultuur werd in de -80°C diepvries bewaard met 40 % glycerol als cryoprotectans. Na licht ontdooien werd 100 µL van deze cultuur steriel overgebracht in een geautoclaveerd penicillineflesje met 10 mL BHIa medium. Na inoculatie werd het medium anaëroob gemaakt en gedurende 48 uur bij 37°C geïncubeerd.

2.1.2. Incubatie van het consortium

De opgekweekte cultuur werd na 48 uur overgebracht in penicillineflesjes met steriel BHIa-medium waaraan, afhankelijk van de experimentele opzet, daidzeïne en andere componenten werden toegevoegd. De flesjes werden anaëroob gemaakt en geïncubeerd bij 37°C. Het metabolisme van het consortium werd opgevolgd door dagelijkse staalname.

2.2. Technieken

2.2.1. Kwantitatieve analyse van de isoflavonen met de HPLC

2.2.1.1. Principe

Isoflavonen kunnen kwantitatief geanalyseerd worden met een HPLC-toestel (High Performance Liquid Chromatography-toestel). Dit toestel scheidt de te onderzoeken componenten van elkaar door ze in een mobiele vloeibare fase over een vaste stationaire fase te leiden in een 'reversed phase' kolom, voorzien van een geschikte voorkolom. Deze kolom bestaat uit een apolaire pakking. Hierdoor blijven verbindingen langer weerhouden in de kolom en hebben een langere retentietijd naarmate ze hydrofober zijn. Sterk hydrofiele verbindingen hebben bijgevolg de kortste retentietijd.

2.2.1.2. Het HPLC-toestel

Het HPLC-toestel bestond uit een autosampler ASI-100 (Dionex), die tot 117 stalen kan injecteren. Bij elk staal werd 20 μ L geïnjecteerd. Het pompsysteem (Dionex P580) bestond uit 4 solventreservoirs waardoor solvent en buffer tegen een vooraf ingesteld debiet constant door de kolom konden gestuurd worden (isocratische elutie). In het pompsysteem was een ontgasser voor buffer en solvent ingebouwd. De detector was een Dionex UVD 340S, welke bij 4 verschillende golflengtes kan meten. Voor de equolmeting werd gebruik gemaakt van een fluorescentiemeter.

De gebruikte HPLC-kolom was een Genesis C18 kolom (Jones Chromatography Ltd. FL15960E), met een lengte van 15 cm en een binnendiameter van 3 mm. De pakking bestond uit octadecylsilaangel. De kolom werd tijdens de analyse op een constante temperatuur van 28°C gehouden.

2.2.1.3. Procedure

- *Extractie van de isoflavonen*

De isoflavonen werden uit het medium geïsoleerd via een etherextractie. In een plasticen proefbuis werd 1 mL staal overgebracht waaraan 1 mL ether werd toegevoegd en ongeveer 400 mg zout (om de fasescheiding duidelijk te maken). Dit tweefasensysteem werd gedurende 2 minuten geroteerd en gedurende 3 minuten bij 3000 tpm gecentrifugeerd. Daarna werd de etherfase met een pasteurpipet afgepipeteerd en in een ander proefbuisje overgebracht. Dit werd driemaal herhaald om er zeker van te zijn dat alle equol in de etherfase zat. Deze etherfractie werd drooggedampt door de open proefbuis in een warmwaterbad bij 37°C te plaatsen. De rest werd heropgelost in 0,5 mL van een 50 % DMSO (dimethylsulfoxide) / 50 % ethanol oplossing. Na 2 minuten centrifugatie bij 13000 tpm werd 0,4 mL oplossing overgebracht in HPLC-vial.

- *HPLC-methode voor isoflavonen*

Het HPLC-toestel werd bestuurd via Dionex Chromeleon software. Er werd gebruik gemaakt van een specifiek programma voor equol.

De mobiele fase bestond terug uit twee solventen: 0,1 % azijnzuur in een mengsel van methanol en acetonitrile (2 : 1) (hydrofoob, solvent A) en 0,1 % azijnzuur in milliQwater (hydrofiel, solvent B). Het opstartprogramma liet gedurende 45 minuten het debiet oplopen tot 1,5 mL/min met een verhouding van 50/50. Van elk staal werd 20 µL geïnjecteerd en de analyse duurde 10 minuten.

2.2.1.4. Verwerking van de resultaten

De U.V.-detector stelt de concentratie van elke verbinding in het eluent vast. Als gevolg van de voortschrijdende tijd kan dit voor elke verbinding grafisch als een piek worden voorgesteld. Elke component wordt, naast een bepaalde retentietijd, bovendien ook gekenmerkt door een specifiek profiel (Fig. 13).

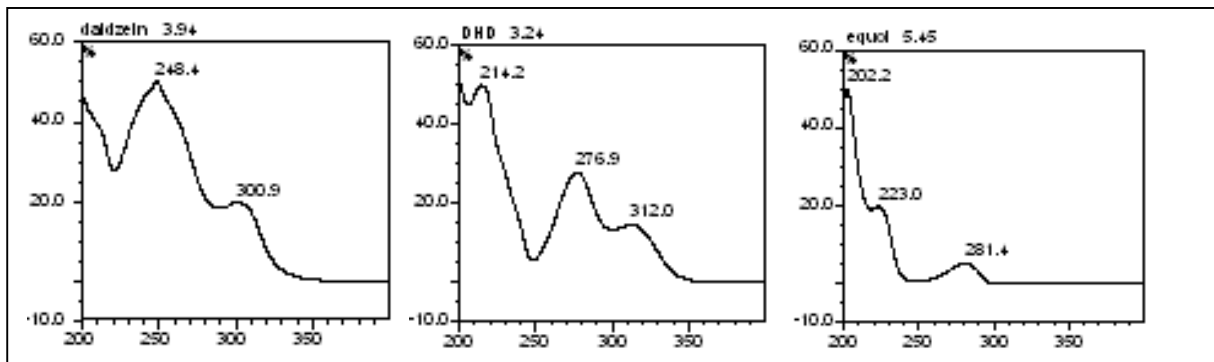


Fig. 13 Het HPLC profiel van respectievelijk daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol

De oppervlakte onder de piek is een maat voor de concentratie in de oorspronkelijke oplossing. Door het invoeren van een standaardreeks van equol en daidzeïne met gekende concentraties vóór de eigenlijke meting, wordt het toestel voorzien van het juiste referentiekader om de concentraties kwantitatief weer te geven.

2.2.2. Vetzuuranalyse

2.2.2.1. Principe

Bij een vetzuuranalyse worden de vetzuren in een staal, na extractie, bepaald via gaschromatografie.

2.2.2.2. Gaschromatograaf

De gaschromatograaf was uitgerust met een 'Flame Ionization Detector' (FID) (Carlo Erba Fractovap 4160, Milaan, Italië). De gebruikte capillaire kolom was een Econo-CapTMEC-1000 (Alltech, Lokeren Belgium) (30 m x 0,52 mm x 0,25 µm). De temperatuur van de kolom bedroeg 135°C en deze van de detector en de injector 175°C. Het dragergas was stikstofgas en had een snelheid van 10 mL/min.

2.2.2.3. Procedure

Aan 2 mL staal werd 0,5 mL zwavelzuur, 400 µL inwendige standaard (2-methylhexanoacid), ongeveer 400 mg zout (om de scheiding tussen waterfase en etherfase duidelijker te maken) en 2 mL diethylether toegevoegd. Daarna werd dit geheel gedurende 2 minuten geroteerd en gedurende 3 minuten bij 3000 tpm gecentrifugeerd. Met een pasteurpipet werd de etherfase afgepipeteerd en in een GC-flesje gebracht waarna het geanalyseerd werd in de gaschromatograaf.

2.2.3.4. Verwerking van de resultaten

De aanwezige vetzuren werden automatisch aan de hand van een standaardreeks gekwantificeerd en in een excell bestand geïmporteerd.

2.2.3. Ionen chromatografie (IC)

2.2.3.1. Principe

Ionen uitwisseling steunt op de substitutie van positief of negatief geladen ionen aan het oppervlak van een matrix. In het geval van anionen chromatografie wordt gebruik gemaakt van een positief geladen hars, verzadigd met CO_3^{2-} -ionen. Bij injectie van een staal worden deze CO_3^{2-} -ionen tijdelijk vervangen door andere in het staal aanwezige ionen. Er wordt echter continu eluent over de kolom gestuurd zodat de binding constant verbroken wordt. Afhankelijk van de aard van de anionen, worden ze een aantal keer gebonden aan het hars waarna ze de kolom verlaten, gepaard gaande met detectie.

2.2.3.2. Toestel

Er werd gebruik gemaakt van een IC 761 compact toestel van Metrohm. De aanwezige kolom was een metrosep A supp 5.

2.2.3.3. Procedure

De stalen werden vooraf gefiltreerd en in IC-vials gebracht. Ze werden, indien nodig, verdund zodat de te bepalen anionenconcentratie kleiner was dan 100 mg/L. Na opstart van het IC toestel werden de stalen aan de hand van een autosampler geïnjecteerd.

2.2.3.4. Verwerking van de resultaten

De bekomen chromatogrammen werden via kalibratie herleid naar de anionenconcentraties.

2.2.4. Decimale uitplatingstechniek

2.2.4.2. Principe

De uitplatingstechniek is één van de meest gebruikte methoden voor het tellen van levende cellen. Ze gaat uit van het principe dat één cel op een agar-voedingsmedium aanleiding geeft

tot het ontstaan van één kolonie. Daardoor wordt verondersteld dat het aantal kolonies dat op een petriplaat geteld wordt overeenkomt met het aantal cellen dat oorspronkelijk in het staal aanwezig was. Het aantal cellen wordt daarom ook weergegeven als aantal kolonievormende eenheden (KVE) of colony forming units (CFU).

2.2.4.3. Procedure

- *Verdunningsreeksen*

Het oorspronkelijke staal moet meestal verdund worden omdat het aantal cellen te talrijk zou zijn om accurate tellingen uit te voeren. Hierbij werd telkens 9 mL fysiologische oplossing aangebracht in een reeks steriele proefbuizen. In de eerste proefbuis werd 1 mL van de bacteriële suspensie gebracht zodat de oorspronkelijke celconcentratie 10 keer (=1 log-eenheid) afnam. Na vortexen werd uit deze verdunning 1 mL overgebracht naar een volgende proefbuis. De behandeling werd herhaald tot de gewenste verdunning bereikt werd. De verdunningen werden zodanig gekozen om 15-150 kolonies te bekomen op een strijkplaat en 30-300 in een gietplaat.

- *Strijkplaten*

Hierbij werd 100 μ L van de suspensie uitgestreken op een agarplaat. Deze platen kunnen gebruikt worden voor zowel aërobe als anaërobe bacteriën. De anaërobe platen werden gedurende 3 dagen in een anaërobe jar geplaatst bij 37°C. De aërobe platen werden gedurende 24 uur geïncubeerd.

- *Gietplaten*

Vloeibare agar werd gemengd met 1 mL bacteriële suspensie. Na stollen werden ze gedurende 3 dagen onder een anaërobe atmosfeer geïncubeerd bij 37°C.

2.2.4.4. Verwerking van de resultaten

Het aantal cellen dat aanwezig was in het oorspronkelijk staal werd als volgt berekend:

$\text{Aantal KVE/mL} = \frac{\text{aantal getelde kolonies}}{\text{volume inoculum* x verdunning}}$	* gietplaat: 1 mL * strijkplaat: 0,1 mL
------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------

2.2.5. Methaan analyse

2.2.5.1. Principe

De methaanvorming werd gedetecteerd met behulp van een gaschromatograaf. Het principe van de gaschromatografie steunt op het verschil in verdeling van verbindingen tussen een vloeibare of vaste stationaire fase en een gasvormige mobiele fase.

2.2.5.2. Toestel

Er werd gebruikt gemaakt van een Intersmat IGC 120 MB gaschromatograaf, verbonden aan een Hewlett-Packard 3395 integrator. De chromatograaf was uitgerust met een dual kolom systeem, bestaande uit een in serie geconnecteerde Poropak (50-80 mesh) kolom. De kolomtemperatuur was isotherm op 30°C en het draaggas was helium met een debiet van 20 mL per minuut.

2.2.5.3. Procedure

Er werd 1 mL van de headspace van de penicilline flesjes met een spuit geïnjecteerd in de gaschromatograaf. De gassen werden, na scheiding in de Poropak kolom, naar een catharometer detector geleid.

2.2.5.4. Verwerking van de resultaten

Uit de retentietijd van de pieken in het bekomen chromatogram kon afgeleid worden of er methaan werd gevormd in de headspace.

2.3. Proefopzet

2.3.1. Stabiliteit van daidzeïne in afwezigheid van microbiota

Om de stabiliteit van daidzeïne te evalueren in afwezigheid van microbiota, werden 6 penicillineflesjes met steriel BHIa-medium en 25 ppm daidzeïne anaëroob bij 37°C geïncubeerd. Drie flesjes werden met stikstof gespoeld en drie met waterstof. De daidzeïne concentratie werd dagelijks gemeten via HPLC.

2.3.2. Stabiliteit van equol in aanwezigheid van microbiota

Om de stabiliteit van equol te evalueren in aanwezigheid van microbiota, werd er 500 µL van het opgekweekt consortium in 10 mL BHIa-medium met 25 ppm equol gebracht. Na spoeling met N₂ werden de penicillineflesjes gedurende 3 weken geïncubeerd bij 37°C. De equolconcentratie werd wekelijks gemeten via HPLC.

2.3.3. De invloed van waterstof en KKVZ op de equolproductie

Om de productie van equol te bestuderen in functie van N₂ of H₂ enerzijds en acetaat, propionaat of butyraat anderzijds werden acht verschillende combinaties opgezet (Tabel 8). Het medium werd bereid door 25 ppm daidzeïne toe te voegen aan BHIa-medium. Afhankelijk van de opzet werd er ook 15 g/L acetaat, propionaat of butyraat toegevoegd. Er werd telkens 500 µL van het opgekweekt consortium in een penicillineflesje gebracht met 50 mL medium. Daarna werd gespoeld met N₂ of H₂.

Tabel 8 Voorstelling van de 8 verschillende experimentele combinaties

flushing met N ₂	flushing met H ₂
controle	controle
acetaat	acetaat
propionaat	propionaat
butyraat	butyraat

De penicillineflesjes werden gedurende twee weken bij 37°C geïncubeerd. Er werden dagelijks stalen genomen voor de analyse van isoflavonen en vluchtige vetzuren, pH-meting en uitplating.

2.3.3. *Het belang van de waterstofconcentratie*

Het equolproducerend consortium werd gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium. Van deze opgekweekte cultuur werd telkens 1 mL overgebracht in penicillineflesjes van 120 ml met 20 ml BHIIa-medium waaraan 25 ppm daidzeïne werd toegevoegd. Na spoeling werd in de resterende headspace van 100 mL een welbepaald percentage stikstof vervangen door waterstof (Tabel 9). De flesjes werden gedurende acht dagen geïncubeerd bij 37°C. De equolproductie werd opgevolgd via HPLC-analyse van de dagelijkse staalnames.

Tabel 9 Weergave van de verschillende combinaties van waterstof en stikstof in de headspace

Proefopzet	ppmV H ₂	% H ₂	% N ₂
1	0	0	100
2	1000	0,1	99,9
3	10000	1	99
4	100000	10	90
5	1000000	100	0

2.3.4. *Incubatie in afwezigheid van waterstof*

Het equolproducerend consortium werd gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium. Van deze opgekweekte cultuur werd telkens 1,5 mL overgebracht in penicillineflesjes met 30 mL BHIIa-medium met 25 ppm daidzeïne waaraan al dan niet 10 g/L palladium (bindt het waterstof zodat het niet meer beschikbaar is) werd toegevoegd. Er werd telkens met N₂ gespoeld. De equolproductie werd bepaald via HPLC.

2.3.5. *Sulfaat, nitraat en koolstofdioxide reductie*

Het equolproducerend consortium werd gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium. Van deze opgekweekte cultuur werd telkens 1,5 mL overgebracht in penicillineflesjes met 30 mL BHIIa-medium met 25 ppm daidzeïne waaraan de overeenkomstige electronenacceptor (1

g/L SO_4^{2-} , 3 g/L SO_4^{2-} , 1 g/L NO_3^- , 3 g/L NO_3^-) werd toegevoegd. Er werd telkens met H_2 gespoeld. De controle werd zowel met H_2 als met N_2 gespoeld en om de CO_2 reductie na te gaan werd 20 % van het H_2 in de headspace vervangen door CO_2 . De equolproductie werd bepaald via HPLC. De concentratie van SO_4^{2-} en NO_3^- en NO_2^- werd via IC gemeten en de omzetting van CO_2 naar CH_4 via gaschromatografie. Er werd ook nagegaan of de vorming van acetaat bevorderd wordt bij toevoeging van CO_2 aan de headspace. Hiervoor werd de vetzuuranalyse techniek gebruikt.

2.3.6. Duur van de equolproductie bij een eenmalige toediening van nutriënten

Het equolproducerend consortium werd gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium. Van deze opgekweekte cultuur werd telkens 1,5 mL overgebracht in penicillineflesjes met 30 mL BHIIa-medium met 25 ppm daidzeïne. Deze flesjes werden met H_2 gespoeld en geïncubeerd bij 37°C . De equolproductie werd dagelijks gemeten via HPLC. Om de 2 dagen werd vers daidzeïne steriel toegevoegd. Er werd na een week ook vers waterstofgas toegevoegd om limitatie te vermijden. Dit experiment werd gestopt wanneer er geen afbraak meer van daidzeïne, en daarmee gepaard gaande vorming van equol, gedetecteerd werd.

2.3.8. Invloed van een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne op de equolproductie

Om de invloed van een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne op de equolproductie na te gaan, werd het equolproducerend consortium gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium waaraan al dan niet daidzeïne werd toegevoegd. Van deze twee opgekweekte culturen werd telkens 1,5 mL overgebracht in penicillineflesjes met 30 mL BHIIa-medium waaraan 25 ppm daidzeïne werd toegevoegd. De flesjes werden anaëroob gemaakt via stikstofspoeling en vervolgens in de 37°C incubator geplaatst. De equolproductie werd bepaald via HPLC.

2.3.9. Lokalisatie van de enzymen betrokken bij de equolproductie

Er werd nagegaan of de enzymen die betrokken zijn bij de equolproductie al dan niet geëxcreteerd worden door de verantwoordelijke bacteriën. Daartoe werd het equolproducerend consortium na opkweek geïncubeerd in BHIIa-medium met daidzeïne tot er equolproductie werd vastgesteld. Het medium werd vervolgens gedurende 10 minuten gecentrifugeerd aan 10000 tpm, waarna het supernatans filtersteriel werd gemaakt. Na toevoeging van 25 ppm daidzeïne werd deze steriele oplossing terug anaëroob geïncubeerd bij 37°C en het daidzeïne metabolisme werd opgevolgd via HPLC.

2.3.10. Synergisme

Om na te gaan of de equolproducerende bacteriën positief beïnvloed worden door componenten die geproduceerd worden door andere leden van het consortium, m.a.w of er een synergisme is, werd het consortium geïncubeerd in BHIIa-medium waaraan al dan niet steriel supernatans van het reeds opgekweekte consortium werd toegevoegd. Dit supernatans werd op een zelfde manier bekomen als bij het vorig experiment, maar ditmaal werd er geen daidzeïne toegevoegd tijdens de incubatie. Er werd 1 mL van het equolproducerend consortium (2 dagen opgekweekt, idem als bij de andere proefopzetten) overgebracht in penicillineflesjes met 10 mL van deze steriele oplossing en 10 mL dubbel geconcentreerd BHIIa-medium met daidzeïne. Als controle werd het consortium geïncubeerd in 20 mL gewoon BHIIa-medium met daidzeïne. De equolproductie werd gemeten via HPLC.

3. Toepassing als probioticum

3.1. Equolproductie in aanwezigheid van autochtone colonmicrobiota

Zowel het equolproducerend consortium als de autochtone colonmicrobiota werd 2 dagen opgekweekt in BHIIa. Er werd gebruik gemaakt van de 3 faecale culturen waarbij reeds eerder geen equolproductie werd vastgesteld, namelijk BP01, BP06 en BP33 (zie 1.1.1.). Na

opkweek werden deze culturen in een welbepaalde verhouding overgebracht in steriele proefbuisjes (Tabel 10).

Tabel 10 Toegevoegde volumes van het consortium en de faecale cultuur bij de verschillende proefopzetten

Percentage consortium	0 %	1 %	5 %	25 %	50 %	75 %	100 %
Consortium (mL)	0	0,1	0,5	2,5	5	7,5	10
Faecale cultuur (mL)	10	9,9	9,5	7,5	5	2,5	0

Deze 10 mL combinaties werden gedurende 10 minuten afgecentrifugeerd bij 3000 tpm. De pellets werden vervolgens opgelost in 10 mL BHIa-medium met 25 ppm daidzeïne. De bekomen bacteriële oplossingen werden in steriele penicillineflesjes gebracht en gespoeld met stikstof. De flesjes werden geïncubeerd bij 37°C en het daidzeïne metabolisme werd opgevolgd via HPLC. Zowel de vorming van equol als van *O*-DMA werd gemeten.

3.2. Resistentie tegen maagzuur

Er werd telkens 10 mL van het opgekweekt equolproducerend consortium gedurende 10 minuten bij 3000 tpm afgecentrifuceerd. De pellets werden vervolgens terug opgelost in 10 mL steriel BHI medium met 25 ppm daidzeïne waaraan al dan niet HCl werd toegevoegd. De concentratie HCl was zodanig dat de pH, net zoals in de maag, tot 2 werd gereduceerd. De penicillineflesjes werden gespoeld met stikstof en gedurende 2 uren geïncubeerd bij 37°C. Vervolgens werden de media waaraan HCl werd toegevoegd terug geneutraliseerd met steriel NaOH. De penicillineflesjes werden daarna verder geïncubeerd en het daidzeïne metabolisme werd opgevolgd via HPLC analyse.

3.3. Resistentie tegen galzouten

Er werd telkens 10 mL van het opgekweekt equolproducerend consortium gedurende 10 minuten bij 3000 tpm afgecentrifuceerd. De pellets werden vervolgens terug opgelost in 10 mL steriel BHI medium met 25 ppm daidzeïne waaraan 5 g/L galzouten (Oxgall, Difco™) werden toegevoegd terwijl bij de controle geen galzouten werden toegevoegd. De

penicillineflesjes werden gespoeld met stikstof en geïncubeerd bij 37°C. Het daidzeïne metabolisme werd opgevolgd via HPLC analyse.

3.4. Impact van FOS op de microbiota

3.4.1. Impact op het equolproducerend consortium

Het equolproducerend consortium werd gedurende twee dagen opgekweekt in BHIIa-medium. Van deze opgekweekte cultuur werd telkens 1,5 mL overgebracht in penicillineflesjes met 30 mL BHIIa-medium en 25 ppm daidzeïne waaraan al dan niet 10 g/L FOS (fructo-oligosacchariden) werd toegevoegd. Er werd telkens met N₂ gespoeld. De equolproductie werd bepaald via HPLC.

3.4.2. Impact op de darmbiota, gesupplementeerd met het consortium

Er werd terug gebruik gemaakt van de faecale culturen BP01, BP06 en BP33 waaraan respectievelijk 0, 1, 50 of 100 % van het equolproducerend consortium werd toegevoegd. Er werd telkens 10 mL van deze combinaties gedurende 10 minuten afgecentrifugeerd bij 3000 tpm. De pellets werden vervolgens terug opgelost in 10 mL BHIIa-medium met 25 ppm daidzeïne waaraan al dan niet 10 g/L FOS werd toegevoegd. De bekomen bacteriële oplossingen werden in steriele penicillineflesjes gebracht en gespoeld met stikstof. De flesjes werden geïncubeerd bij 37°C en de equol en *O*-DMA productie werd opgevolgd via HPLC.

3.5. Equolproductie na lyofilisatie

Stalen van het consortium die reeds 2 en 5 dagen waren geïncubeerd werden gelyofiliseerd om na te gaan of ze nadien, na opkweek van het gevriesdroogde product, nog in staat zijn om equol te produceren. De lyofilisatie werd in het Laboratorium voor Microbiologie (BCCM/LMG Bacteria Collection) in de Ledeganck uitgevoerd.

Na centrifugatie van de stalen werden telkens 0,1 g cellen (natgewicht) gesuspendeerd in 1 mL cryoprotectans met volgende samenstelling:

- 100 mL paardenserum (Oxoid SR35)
- 837,5 mg nutrient broth (Oxoid n° 2)
- 10 g watervrij glucose (Merck n° 8337)
- 33,5 mL gedestilleerd water
- 0,05 g cysteïne-hydrochloride

Het paardenserum werd tweemaal gefiltreerd over een papierfilter. Het nutrient broth en de glucose werden opgelost in het gedestilleerd water en vervolgens toegevoegd aan het gefilterd paardenserum. Deze oplossing werd tweemaal gefilterd (Millipore papierfilter) voor een finale filter-sterilisatie (Millipore 0,45µm). Het cryoprotectans werd tijdens het gebruik op ijs gezet en werd bewaard bij 6°C.

Na suspensie werden de lyo-buisjes in een anaërobe kast gevuld. Deze werden tenslotte in de lyofilisator gestoken en een specifiek temperatuur-tijd-druk-programma werd opgestart, waarbij de stalen eerst werden ingevroren waarna het ijs in een vacuümomgeving werd gesublimeerd.

De gevriesdroogde culturen werden vervolgens terug geactiveerd door ze op te lossen in 10 mL BHIa medium met daidzeïne. De penicillineflesjes werden anaëroob gemaakt en geïncubeerd bij 37°C. De equolproductie werd opgevolgd via HPLC.

4. Statistische verwerking

Om betrouwbare resultaten te verkrijgen, werden al de experimenten in het drievoud uitgevoerd. Drie herhalingen zijn immers een minimumvereiste om de resultaten statistisch te kunnen verwerken en om de reproduceerbaarheid van de resultaten te kunnen beoordelen. Voor de statistische verwerking werd gebruik gemaakt van Splus en Sigmaplot. Hierbij werd een P-waarde $\leq 0,05$ als significant verschillend aanzien.

De standaarddeviatie werd telkens berekend om de variatie van de resultaten aan te duiden. In de grafieken werd de gemiddelde waarde samen met de standaarddeviatie voorgesteld.

Deel III

Resultaten

1. Identificatie van een equolproducerend consortium

1.1. Isolatie via uitplating

Na DGGE van de geamplificeerde 16S rDNA fragmenten van de geïsoleerde species werden de stalen die aanleiding gaven tot verschillende bandjes geselecteerd. Daarvan werd de sequentie bepaald door ITT Biotech (Bielefeld, Duitsland). Deze sequenties werden vergeleken met sequenties in de NCBI nucleotiden databank via de BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Dit leidde tot de identificatie van *Lactobacillus mucosae* en *Enterococcus faecium*. Er is 96 % homologie vereist om een bacterie met zekerheid te kunnen identificeren als een bepaald species. De sequenties van de 16S rDNA fragmenten van deze bacteriën vertonen beiden 99 % homologie met deze in de NCBI-databank en kunnen in bijlage 1 geraadpleegd worden.

1.2. Isolatie via klonering

Omdat de overige twee bacteriën uit het consortium niet konden geïsoleerd worden via een eenvoudige uitplatingstechniek werd een kloneringstechniek toegepast. Na DGGE van de geamplificeerde 16S rDNA fragmenten van de geïsoleerde species werden de stalen die aanleiding gaven tot verschillende bandjes geselecteerd. Sequencing van deze stalen leidde tot de identificatie van *Fingoldia magna* (vroeger *Peptostreptococcus magnus*). De sequentie van het 16S rDNA fragment van deze bacterie vertoont 99 % homologie met deze in de databank. De vierde bacterie uit het consortium kon echter niet geïdentificeerd worden omdat ze met geen enkel species meer dan 96 % homologie vertoont. Ze blijkt wel sterk verwant te zijn met *Veillonella* spp. omdat de 16S rDNA fragmenten voor 95 % overeenkomen met de sequenties van deze species (Tabel 11). De sequenties van de gekloneerde PCR fragmenten kunnen in bijlage 2 geraadpleegd worden.

Tabel 11 Overzicht van de lengte en het percentage homologie van de sequenties van de species waarmee de niet-identificeerbare bacterie het best mee overeenkomt

Species	Lengte 16S rDNA fragment (bp)	% homologie
<i>Veillonella parvula</i>	1513	95
<i>Veillonella dispar</i>	1513	95
<i>Veillonella atypica</i>	1513	95
<i>Veillonella cavae</i>	1402	95
<i>Veillonella criceti</i>	1492	95
<i>Veillonella ratti</i>	1396	95
<i>Veillonella rodentum</i>	1307	95
<i>Dialister invisus</i>	1524	93
<i>Allisonella histaminiformans</i>	1537	91
<i>Dialister pneumosinters</i>	1504	91
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	1416	90

In Fig. 14 wordt een overzicht getoond van de resultaten van de DGGE analyse van de 4 species. De eerste 3 laantjes tonen het DGGE profiel van het volledig consortium respectievelijk na 2 dagen en na 5 dagen incubatie in BHIa en na 5 dagen incubatie in MRS, een selectief medium voor melkzuurbacteriën. De andere 4 laantjes tonen het DGGE profiel van respectievelijk de *Veillonella*-verwante bacterie, *Finnegoldia magna*, *Lactobacillus mucosae* en *Enterococcus faecium*.

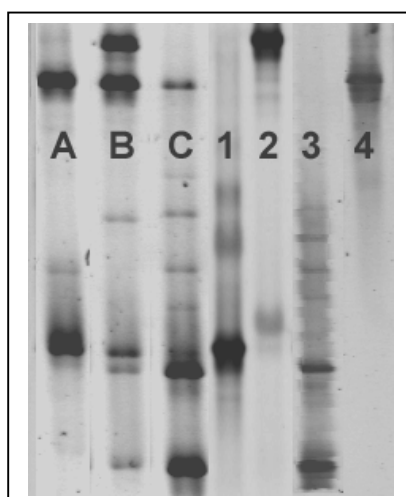


Fig. 14 DGGE profiel van A = volledig consortium, 2 dagen geïncubeerd in BHIa, B = volledig consortium, 5 dagen geïncubeerd in BHIa, C = volledig consortium, 5 dagen geïncubeerd in MRS, 1 = *Veillonella*-verwant species, 2 = *Finnegoldia magna*, 3 = *Lactobacillus mucosae* en 4 = *Enterococcus faecium*

2. Karakterisatie van een equolproducerend consortium

2.1. Stabiliteit van daidzeïne in afwezigheid van microbiota

De evolutie van de concentratie daidzeïne in afwezigheid van microbiota wordt in Fig. 15 voorgesteld. Er werd geen dihydrodaidzeïne en equol in het medium gedetecteerd.

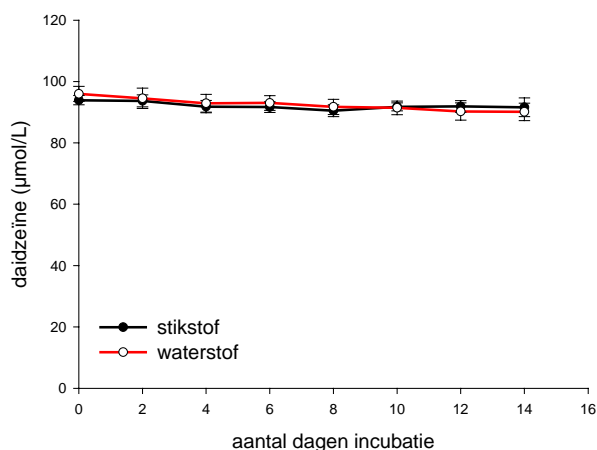


Fig. 15 De evolutie van de concentratie daidzeïne in afwezigheid van microbiota (µmol/L)

Hieruit blijkt dat er, zowel bij spoeling van de headspace met stikstof als met waterstof, in afwezigheid van microbiota geen significante afbraak is van daidzeïne en dat er geen dihydrodaidzeïne en equol gevormd wordt.

2.2. Stabiliteit van equol in aanwezigheid van microbiota

De equolconcentratie bleef nagenoeg constant gedurende incubatie met het consortium ($100,2 \pm 4,3$ µmol/L equol). Hieruit blijkt dat equol niet verder gemetaboliseerd wordt door het consortium.

2.3. De invloed van waterstof en KKVZ op de equolproductie

2.3.1. Equolproductie

De gemeten omzetting van daidzeïne naar equol via dihydrodaidzeïne wordt in Fig. 17 voorgesteld. Gedurende 7 dagen werden elke 24 uur stalen geanalyseerd via HPLC. Omdat er na 7 dagen nog niet overall een maximale equolproductie werd bereikt, werd er een bijkomende meting gedaan na 14 dagen.

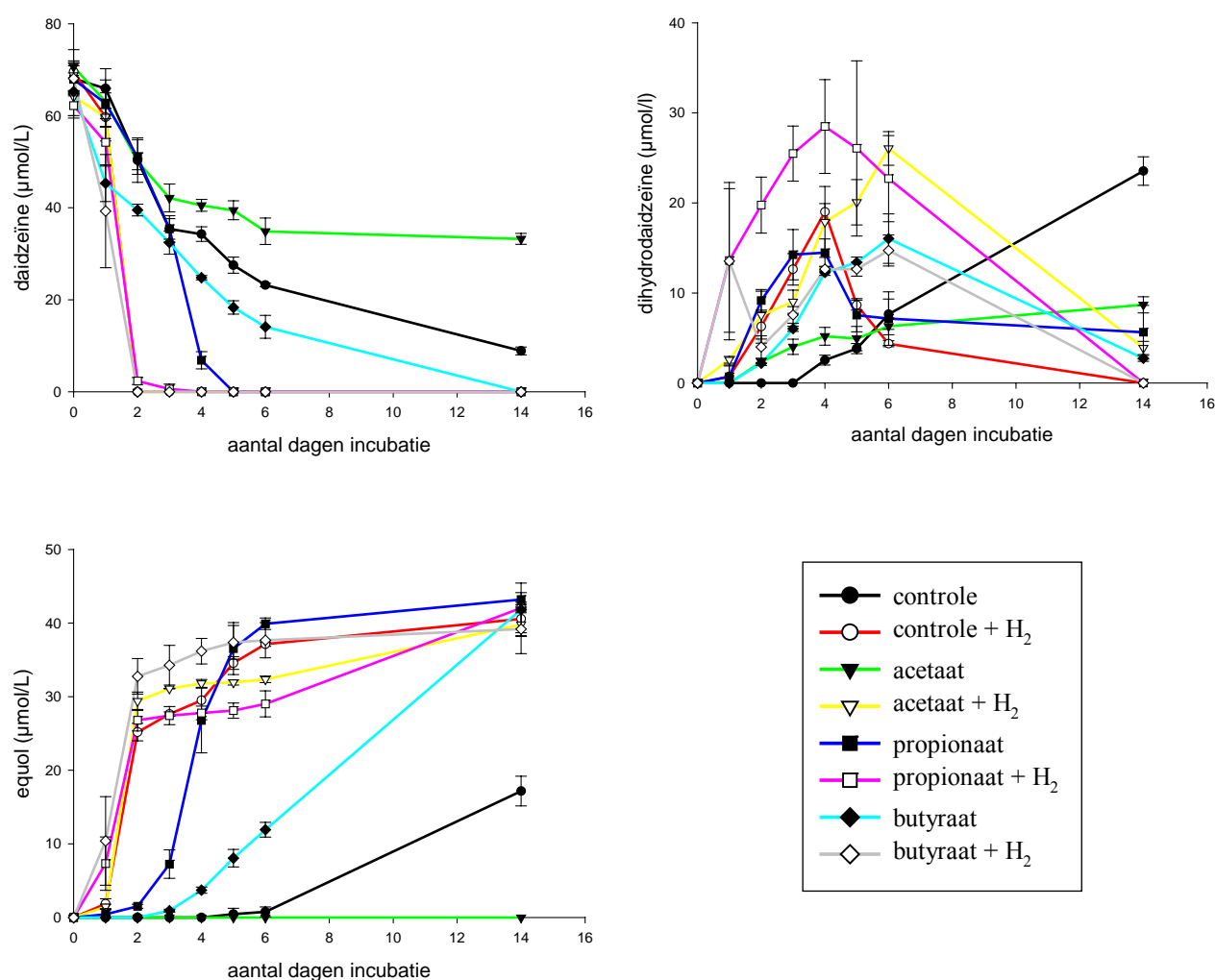


Fig. 17 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden (μmol/L)

Deze resultaten tonen duidelijk het bevorderend effect van waterstof aan: in alle vier de gevallen is er in combinatie met H₂ een opmerkelijk snellere omzetting. Zelfs bij het acetaatmedium, waar zonder H₂ geen equol wordt geproduceerd, is er in combinatie met H₂ al na 1 dag een omzetting waarneembaar. Ook propionaat en in mindere mate butyraat hebben, in de afwezigheid van H₂, een positief effect in vergelijking met de controle. Bij de media waaraan deze zouten werden toegevoegd is er, net zoals bij H₂, een snellere omzetting. De maximale productie wordt echter niet beïnvloed door deze factoren. Bij het medium met acetaat daarentegen, werd geen equol gevormd. Wanneer de headspace gespoeld werd met waterstof was er echter, net zoals bij de andere media met waterstof in de headspace, reeds na één dag equolvorming waarneembaar.

Om een ANOVA-test uit te mogen voeren moeten de varianties van de afhankelijke variabelen gelijk zijn. Omdat de equolvorming bij de controle heel traag en in het medium met acetaat zelfs niet op gang kwam, kon geen ANOVA-test toegepast worden om significante verschillen tussen de equolproductie in de verschillende media aan te tonen. Een ANOVA-test kan immers niet uitgevoerd worden op data met nullen (variantie ook gelijk aan nul, dus verschillend van de andere data). Ook het gebruik van een log-lineair model bleek te weinig krachtig te zijn voor deze data. Om de waarden van de equolproductie toch statistisch te kunnen beoordelen werden ze met SigmaPlot aan een logistisch model gefit. Deze gefitte grafieken kunnen in bijlage geraadpleegd worden (bijlage 3).

$$y = \frac{y_{\max}}{1 + (x/x_{50})^b}$$

Via SigmaPlot werden de parameters voor de maximale productie (y_{\max}) en de tijd waarbij de helft van de maximale productie wordt bereikt (x_{50}) berekend. Deze worden voorgesteld in Fig. 18. De parameters van het medium met acetaat zonder waterstof werden niet opgenomen in de grafiek omdat deze data een Y_{\max} van nul en een oneindig grote X_{50} opleveren. Eveneens moet opgemerkt worden dat de maximale equolvorming bij de controle zonder waterstof na 14 dagen waarschijnlijk nog niet bereikt werd, wat een slechte fitting aan het logistische model kan impliceren.

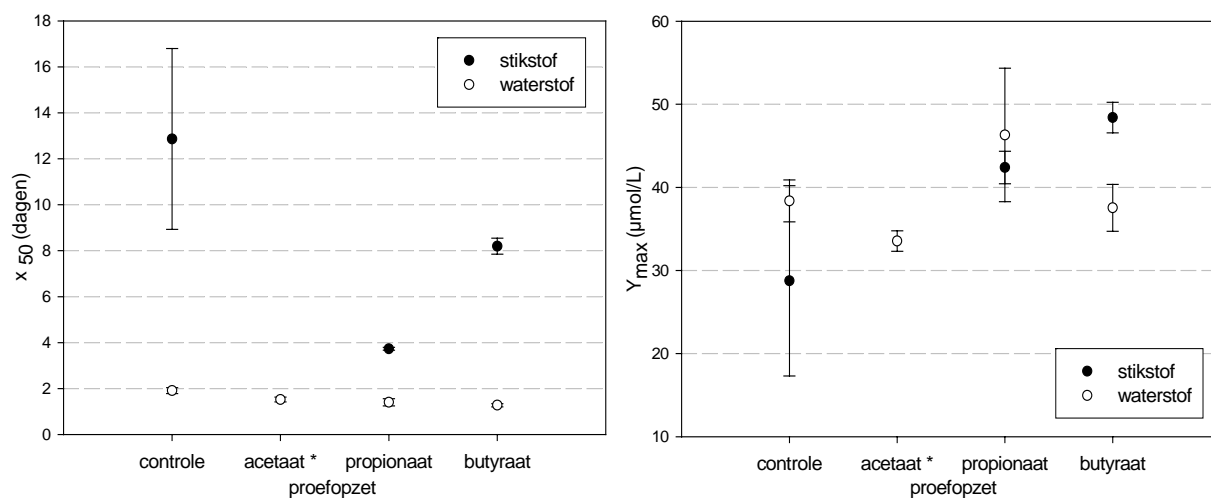


Fig. 18. Voorstelling van de parameters voor de tijd waarbij de helft van de maximale productie wordt bereikt (x_{50}) en de maximale equolproductie (y_{max}) bij de verschillende experimentele omstandigheden; * de proefopzet met acetaat in afwezigheid van waterstof heeft een oneindig grote x_{50} en een Y_{max} van 0 en werd daarom niet opgenomen in de grafiek

De eerste grafiek toont duidelijk dat de equolvorming versneld wordt in aanwezigheid van waterstof. De x_{50} wordt, onafhankelijk van de KKVZ supplementatie, immers gereduceerd tot 1 à 2 dagen. In afwezigheid van waterstof blijkt propionaat, en in mindere mate butyraat, ook voor een daling van de x_{50} te zorgen.

Uit de tweede grafiek kan afgeleid worden dat er, rekening houdend met de standaardafwijkingen, geen significante verschillen zijn tussen de maximale equolproductie bij de verschillende experimentele omstandigheden (met uitzondering van acetaat in afwezigheid van waterstof).

Om het effect van waterstof, onafhankelijk van de korte-ketenvetzuren, te kunnen beoordelen werd een gepaarde T-test uitgevoerd. Hierbij werden de parameters van de proefopzetten zonder waterstof vergeleken met hun tegenhanger waarbij wel waterstof werd toegevoegd. Deze test bevestigde dat waterstof de snelheid van de equolvorming (x_{50} , $p = 0,03$) beïnvloedt, maar niet zorgt voor een hoger maximum (y_{max} , $p = 0,89$).

2.3.2. Vluchtige vetzuren

De resultaten van de vluchtige vetzuur analyse zijn weergegeven in bijlage 4.

Er werden telkens relatief grote hoeveelheden azijnzuur gevormd. Vooral bij de controle, zowel met en zonder spoeling van H₂, was er een aanzienlijke hoeveelheid azijnzuur aanwezig na een incubatietijd van 7 dagen. Er werd nergens isovaleriaanzuur, valeriaanzuur, isocapronzuur of capronzuur geproduceerd. Bij de media waaraan een organisch zuur werd toegevoegd, was de afbraak van het respectievelijk zuur aanvankelijk groter dan de productie waardoor de hoeveelheid afnam. Na een aantal dagen oversteeg de productie echter de afbraak met een stijgend profiel voor gevolg.

De invloed van waterstof op de KKVZ productie werd aan de hand van Splus beoordeeld bij het consortium dat geïncubeerd werd zonder toegevoegde zuren (Tabel 12). De gemeten waarden zijn normaal verdeeld en hebben een gelijke variantie, zodat een tweezijdige student T-test kon uitgevoerd worden (bijlage5).

Tabel 12 KKVZ-concentratie (mg/L) na 7 dagen incubatie van het consortium met en zonder H₂; * p<0,05, ** p<0,01 volgens de 2-zijdige student t-test

headspace	gemiddelde		standaardafwijking		p-waarde
	N ₂	H ₂	N ₂	H ₂	
acetaat	1263	1372	52	27	0,016*
propionaat	39	6	0,9	0,8	0**
butyraat	10	4	1,8	0,7	0,005**

Hieruit blijkt dat er in aanwezigheid van waterstof meer acetaat, maar minder propionaat en butyraat gevormd wordt.

2.3.3. pH-profiel

In Fig. 19 wordt het pH-profiel gedurende de incubatie weergegeven. Er is een kleine variatie tussen de gemeten pH-waarden bij de verschillende experimentele omstandigheden, maar er is geen correlatie tussen de pH en het soort gas in de headspace. De supplementatie met korte-ketenvetzuren leidde ook niet tot een karakteristiek pH-profiel.

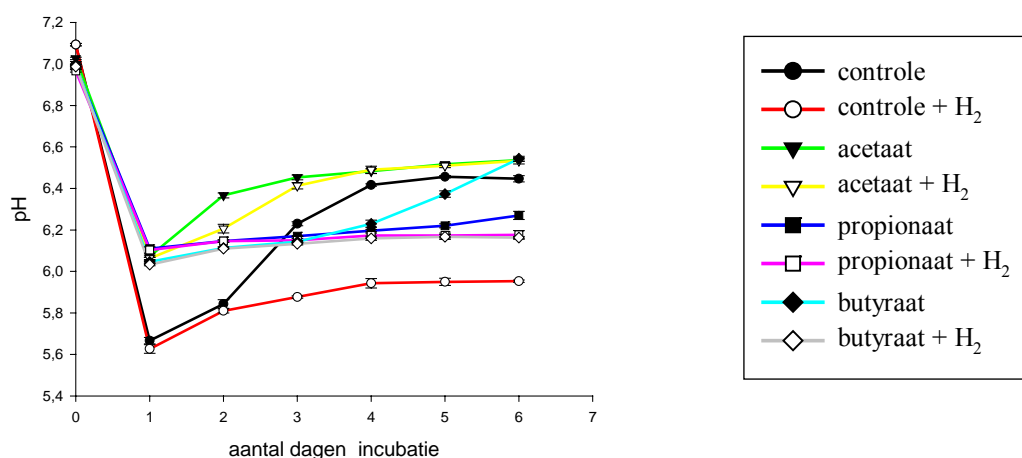


Fig. 19 pH-profiel van de 8 verschillende experimentele combinaties gedurende de incubatie

2.3.4. Celdensiteit

Met de resultaten van de uitplantingen werden onderstaande groeicurven bekomen.

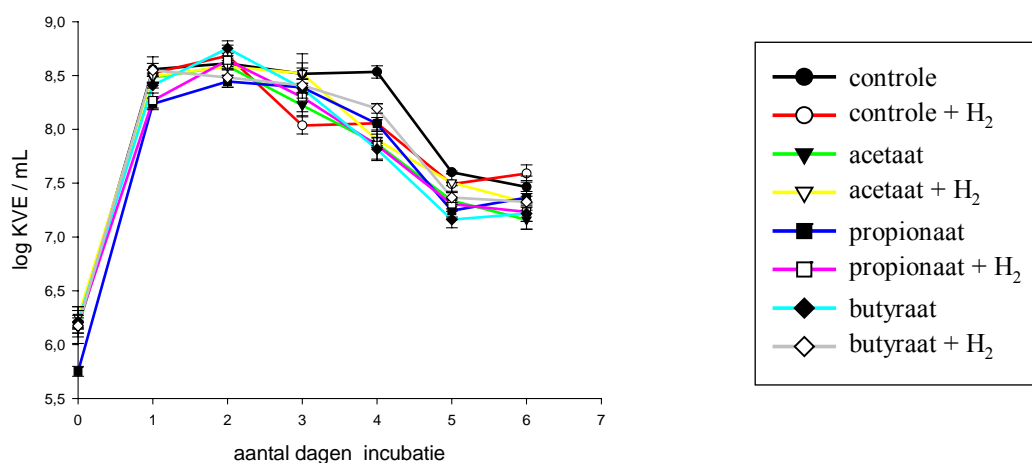


Fig. 20 Groeicurven van het consortium bij de verschillende experimentele combinaties

Er was achtereenvolgens een exponentiële, een stationaire en een afstervingsfase te onderscheiden. De verschillende experimentele omstandigheden hadden blijkbaar geen invloed op de totale anaërobe groei.

2.4. Het belang van de waterstofconcentratie

De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden wordt in Fig. 21 voorgesteld.

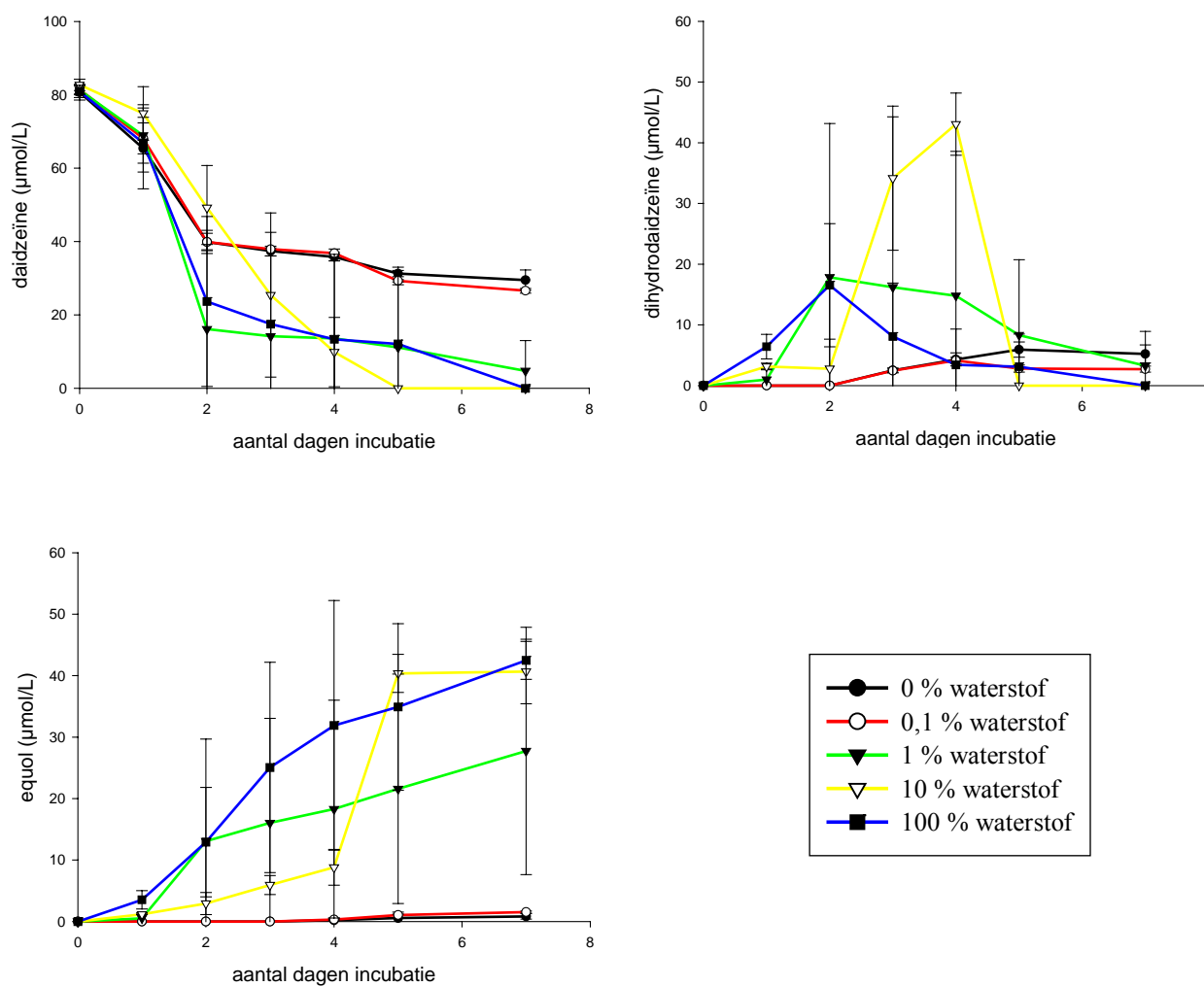


Fig. 21 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden (µmol/L)

Hieruit kan afgeleid worden dat 0,1 % waterstof nagenoeg geen bevorderend effect heeft. Bij 1 % waterstof is er al een duidelijke positieve invloed op de equolproductie waarneembaar, maar na acht dagen was er minder equol in het medium aanwezig dan bij een concentratie van 10 en 100 % waterstof. Bij deze twee laatste proefopzetten werd na acht dagen telkens ongeveer 40 µmol/L equol gedetecteerd. Bij 100 % waterstof kwam de equolproductie wel

sneller op dreef dan bij 10 % waterstof, waar pas na vijf dagen de equolproductie aanzienlijk versneld werd.

Om deze resultaten statistisch te kunnen beoordelen, werden de data gefit aan het best passend model. Ditmaal leverde een sigmoïdaal model de beste fitting op. Deze gefitte grafieken kunnen in bijlage geraadpleegd worden (bijlage 6).

$$y = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{b}}}$$

Via Sigmaplot werden de parameters voor de maximale productie (y_{\max}) en de tijd waarbij de helft van de maximale productie wordt bereikt (x_{50}) berekend. Deze worden voorgesteld in Fig. 22. Er moet echter opgemerkt worden dat de maximale equolvorming bij de eerste 3 experimentele omstandigheden na 14 dagen waarschijnlijk nog niet bereikt werd, wat zich uit in een grote standaardafwijking van de parameters.

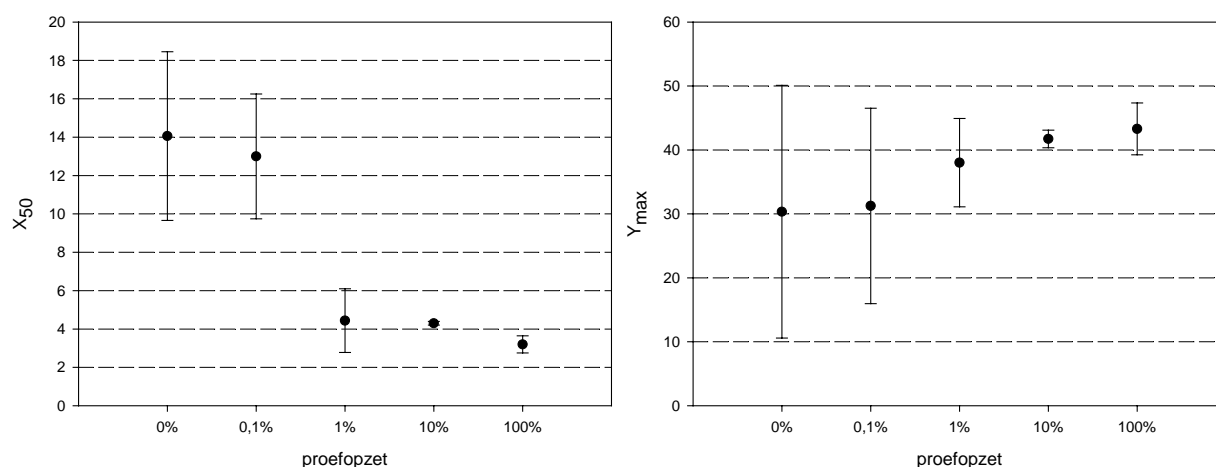


Fig. 22 Voorstelling van de parameters voor de tijd waarbij de helft van de maximale productie wordt bereikt (x_{50}) en de maximale equolproductie (y_{\max}) bij verschillende concentraties waterstof in de headspace

De visuele voorstelling van x_{50} bevestigt dat de equolvorming pas aanzienlijk versneld wordt vanaf 1 % waterstof in de headspace. De waarden van y_{\max} moeten met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden omdat de parameters van eerste drie experimentele omstandigheden, zoals hierboven reeds vermeld, een grote standaardafwijking hebben. Er is evenwel een positieve correlatie tussen de maximale equolproductie en het percentage waterstof zichtbaar.

2.5. Incubatie in afwezigheid van waterstof

De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium in aan- of afwezigheid van palladium wordt in Fig. 23 voorgesteld.

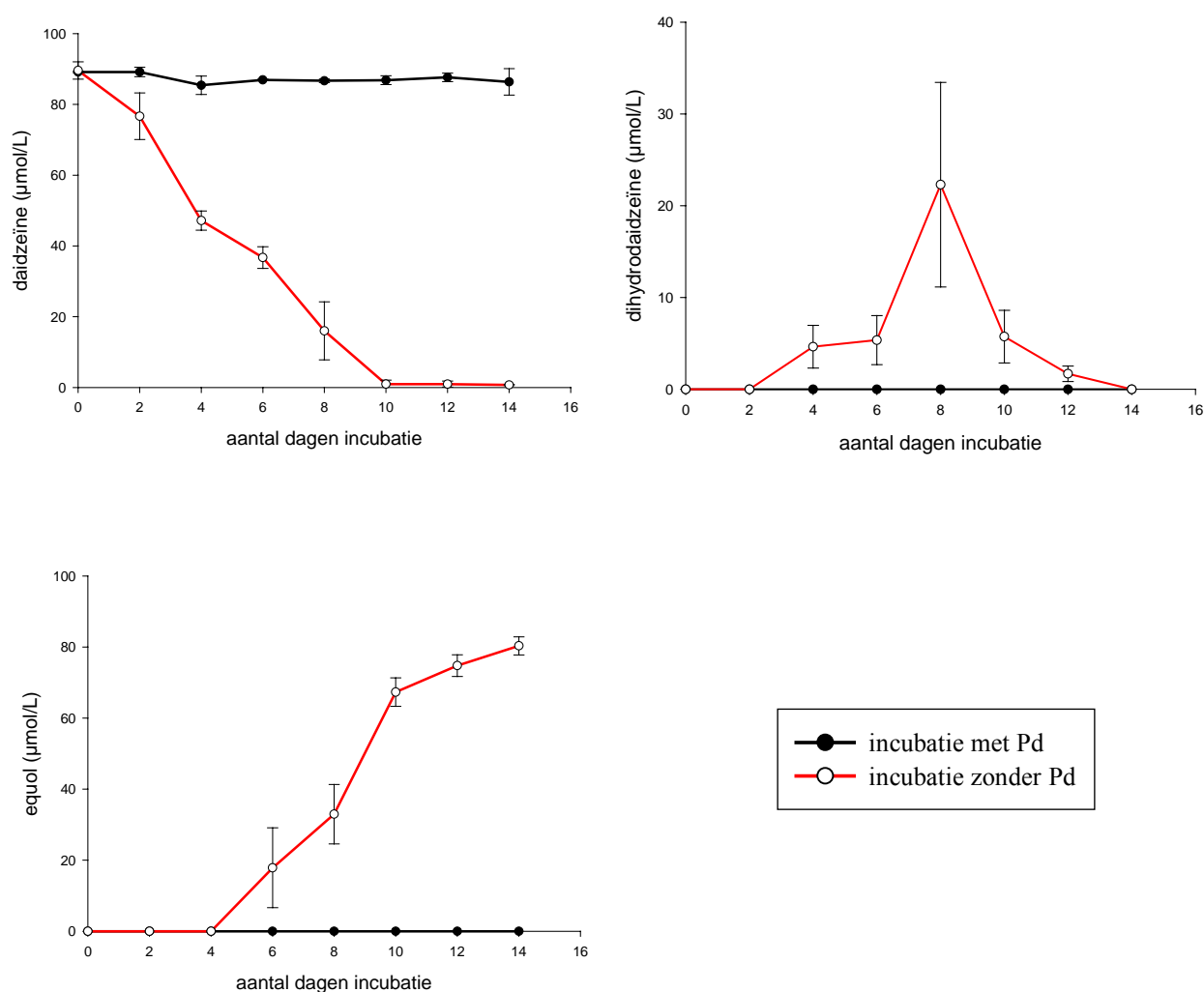


Fig. 23 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium in aan- of afwezigheid van Palladium (µmol/L)

Hieruit blijkt dat in aanwezigheid van palladium daidzeïne niet werd gereduceerd tot respectievelijk dihydrodaidzeïne en equol. Dit is echter niet te wijten aan een inhibitie van de groei door palladium, wat blijkt uit onderstaande groeicurve (Fig. 24).

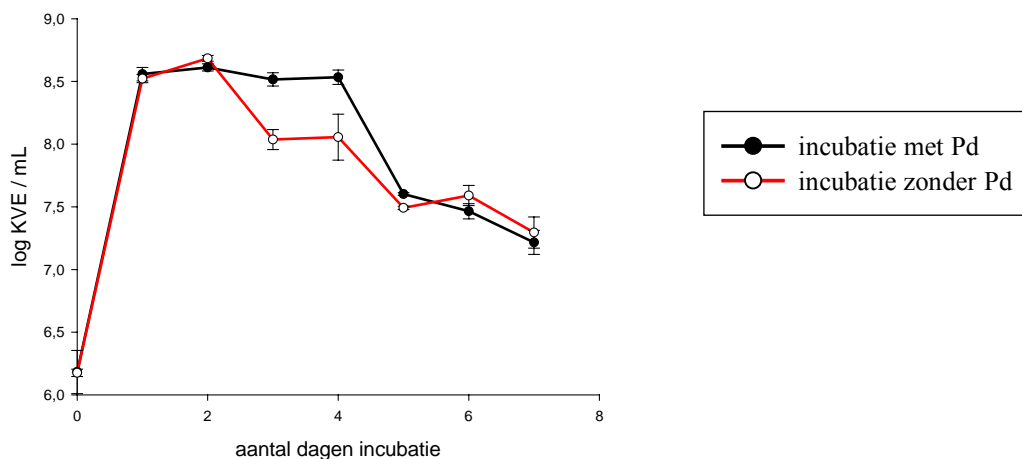


Fig. 24 Groeicurven van het consortium bij incubatie in aan- of afwezigheid van palladium

2.6. Sulfaat, nitraat en koolstofdioxide reductie

2.6.1. Equolproductie

De evolutie van de concentratie van daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden wordt in Fig. 25 voorgesteld. Er kan uit deze resultaten gesuggereerd worden dat de equolproductie niet significant beïnvloed wordt door de toevoeging van sulfaat of koolstofdioxide. Nitraat daarentegen blijkt, zowel bij 1 en 3 g/l, de equolvorming volledig te verhinderen. Zoals uit vorige experimenten bleek, versnelt de equolproductie door toevoeging van waterstof in de headspace (met uitzondering van de incubatie met nitraat).

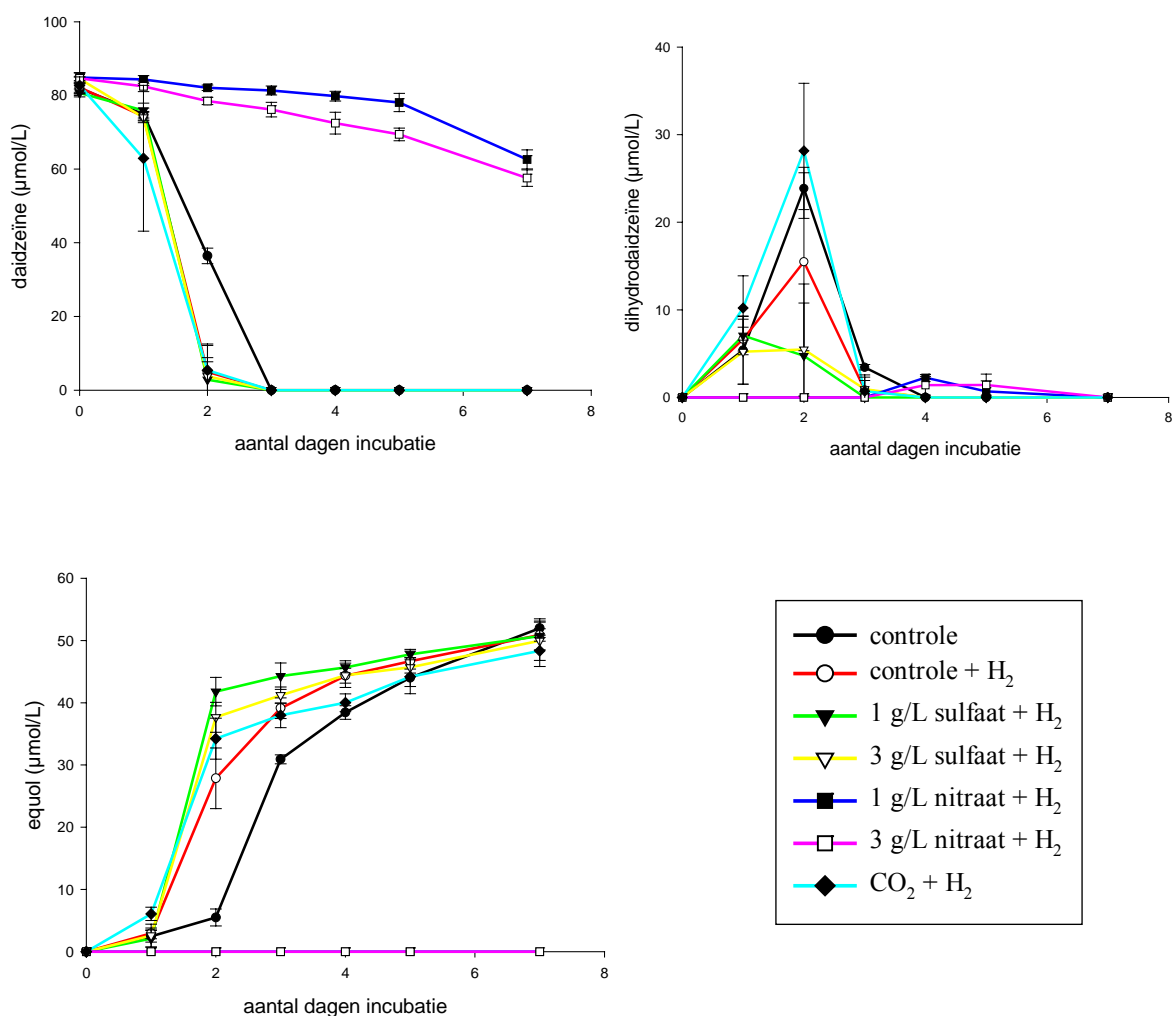


Fig. 25 De evolutie van de concentratie van daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden (µmol/L)

Via een one-way ANOVA-test (bijlage 7) kan statistisch aangetoond worden dat, met uitzondering van de proefopzet met nitraat, vanaf dag 5 overall even veel equol geproduceerd werd. Bij de controle zonder waterstof werd er aanvankelijk minder equol gevormd, maar er werd na 5 dagen een zelfde productieniveau bereikt als bij de incubaties onder waterstofatmosfeer.

2.6.2. Sulfaat en nitraatreductie

De evolutie van de concentratie van sulfaat, nitraat en nitriet in het medium gedurende incubatie met het consortium wordt voorgesteld in Fig. 26.

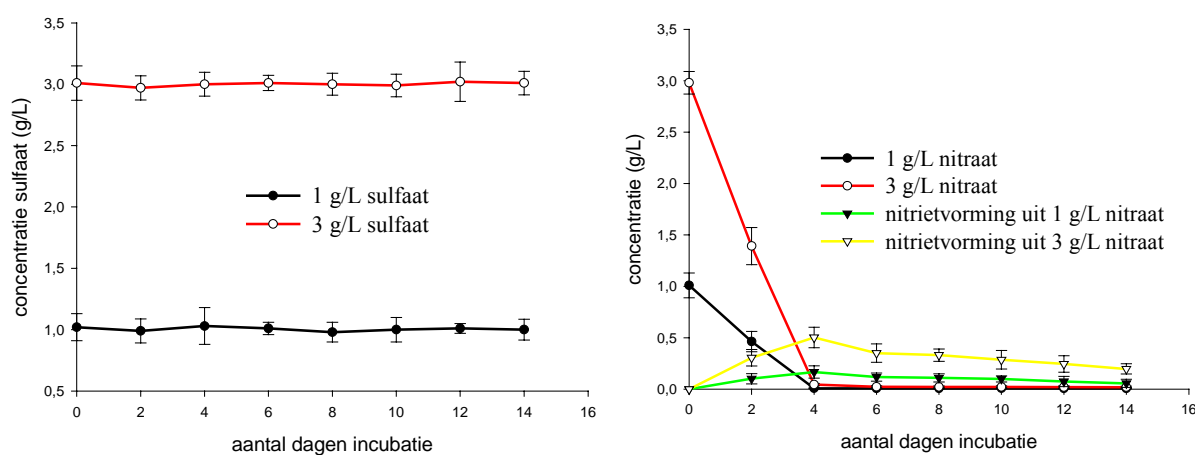


Fig. 26 De evolutie van de concentratie van sulfaat, nitraat en nitriet in het medium gedurende incubatie met het equolproducerend consortium (g/L)

Uit deze analyses blijkt dat het consortium in staat is om nitraat te reduceren tot nitriet. De concentratie van sulfaat daarentegen, bleef nagenoeg constant.

Er kan afgeleid worden dat het nitriet verder werd gemetaboliseerd aangezien de nitrietconcentratie een piek bereikte na 4 dagen waarna ze terug daalde tot een constante waarde. De afbraak van nitriet kan ook gesuggereerd worden uit het feit dat maar 0,17 en 0,5 g/L nitriet werd gevormd uit respectievelijk 1 en 3 g/L nitraat terwijl het nitraat bijna volledig werd afgebroken. Na 6 dagen bleef de kleine resterende nitraatfractie min of meer constant.

2.6.3. Methaanvorming

De eventuele vorming van methaan werd nagegaan in het penicillineflesje waaraan CO₂ en waterstof werd toegevoegd. Daarvoor werd dagelijks een staal van de gasfase geanalyseerd via gaschromatografie. Er werd geen methaan gedetecteerd.

2.6.4. Acetogenese

Om de acetogene capaciteit van het equolproducerend consortium te beoordelen werd de acetaatvorming in het flesje met CO₂ en H₂ in de headspace vergeleken met dit waarbij de headspace enkel met H₂ gespoeld werd (Tabel 13).

Tabel 13 Acetaatvorming (mg/L) tijdens incubatie met het consortium, met of zonder CO₂ in de headspace

Incubatietijd	controle + H ₂	CO ₂ + H ₂	verschil
dag 1	47	51	3
dag 2	358	399	41
dag 3	728	763	35
dag 4	784	818	33
dag 5	816	841	25
dag 6	824	860	35
dag 7	839	873	34

Hieruit blijkt dat de acetaatvorming door het consortium hoger is bij toediening van CO₂ in de headspace. Het verschil is echter niet groot genoeg om met zekerheid te kunnen gelinkt worden met de aanwezigheid van acetogene bacteriën.

2.6.5. Celdensiteit

Met de resultaten van de uitplatingen werden onderstaande groeicurven bekomen.

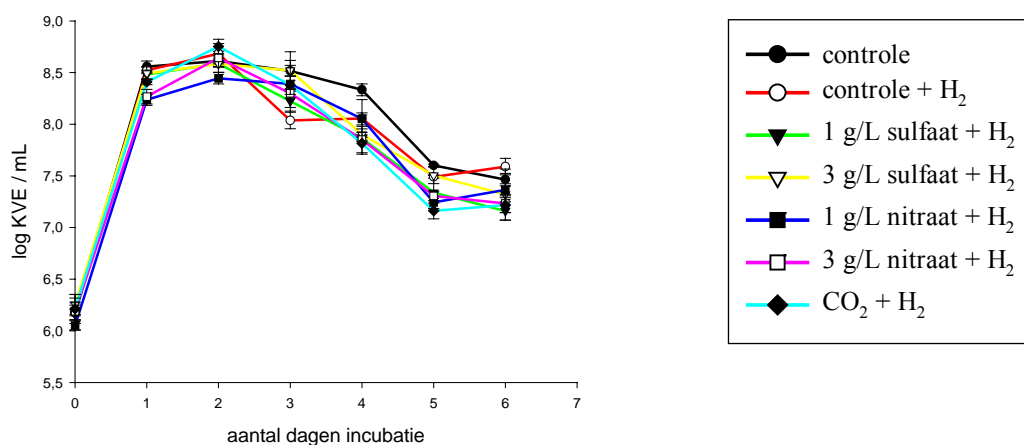


Fig. 27 Groeicurven van het consortium bij de verschillende experimentele combinaties

2.7. Duur van de equolproductie bij een eenmalige toediening van nutriënten

De cultuur was in staat om gedurende 3 weken equol te produceren zonder toediening van verse nutriënten na aanvang van de incubatie (Fig. 28). Er werd om de 2 dagen steriel daidzeïne toegediend. De daidzeïne werd gedurende de eerste 2 weken telkens al na 2 dagen volledig opgebruikt. Na 3 weken werd de daidzeïne niet meer afgebroken en viel de equolproductie stil.

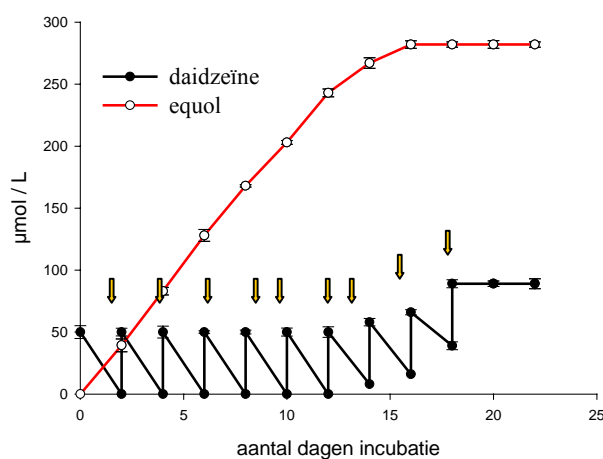


Fig. 28 Equolvorming ($\mu\text{mol/L}$) gedurende 3 weken incubatie van het consortium in een medium waaraan na aanvang geen verse nutriënten meer werden toegevoegd, maar dat wel om de twee dagen gesupplementeerd werd met steriel daidzeïne ↓

2.8. Invloed van een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne op de equolproductie

De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden wordt in Fig. 29 voorgesteld.

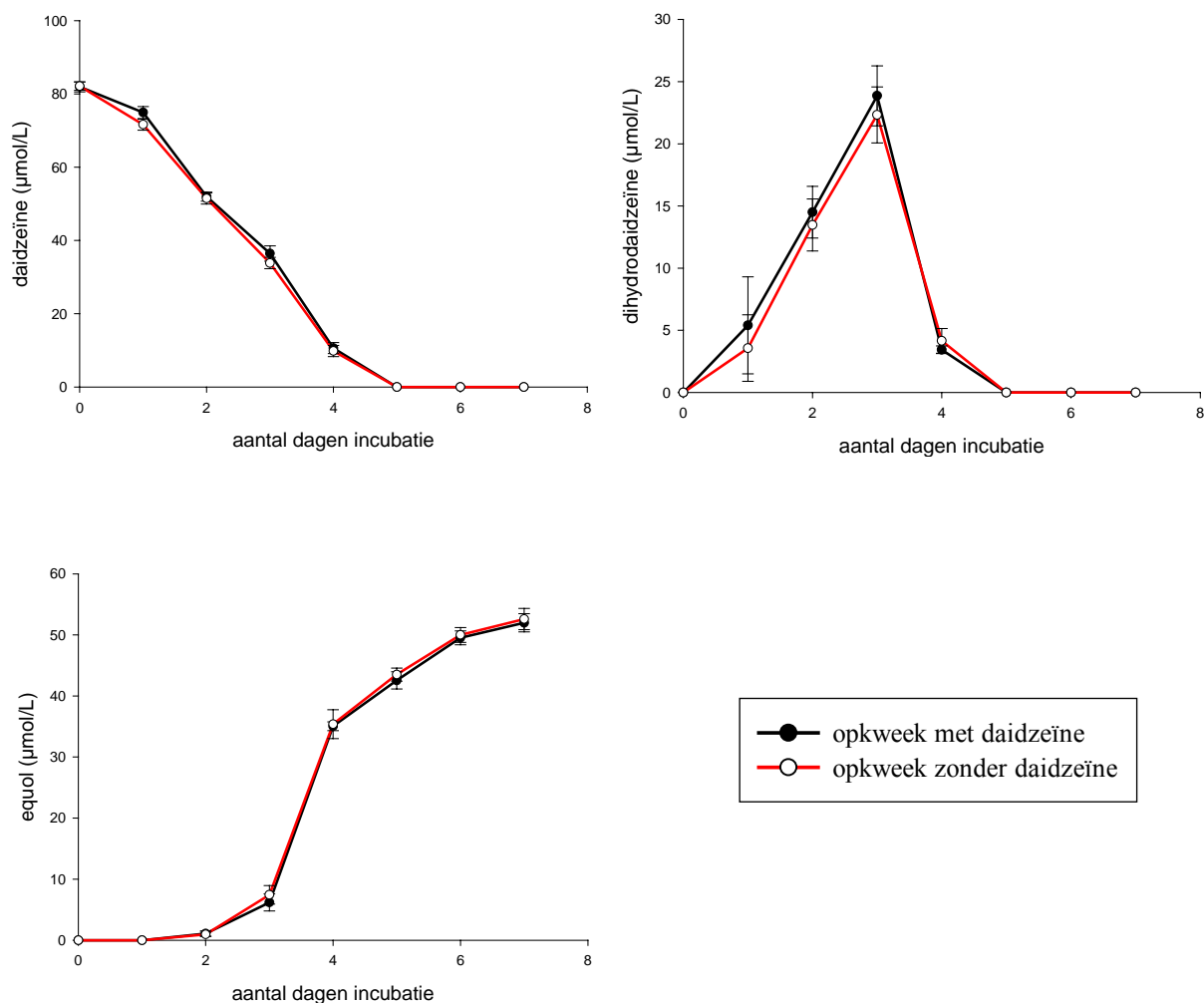


Fig. 29 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie van het equolproducerend consortium dat werd opgekweekt met of zonder daidzeïne (µmol/L)

Uit de grafieken blijkt dat een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne de equolproductie niet beïnvloedt. Zowel de evolutie van daidzeïne ($p = 0,1$), als van dihydrodaidzeïne ($p = 0,19$) en equol ($p = 0,12$) toont geen significante verschillen volgens de gepaarde T-test met SigmaPlot.

2.9. Lokalisatie van de enzymen betrokken bij de equolproductie

De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met en zonder supernatans van een medium waarin equol werd geproduceerd, wordt in Fig. 30 voorgesteld.

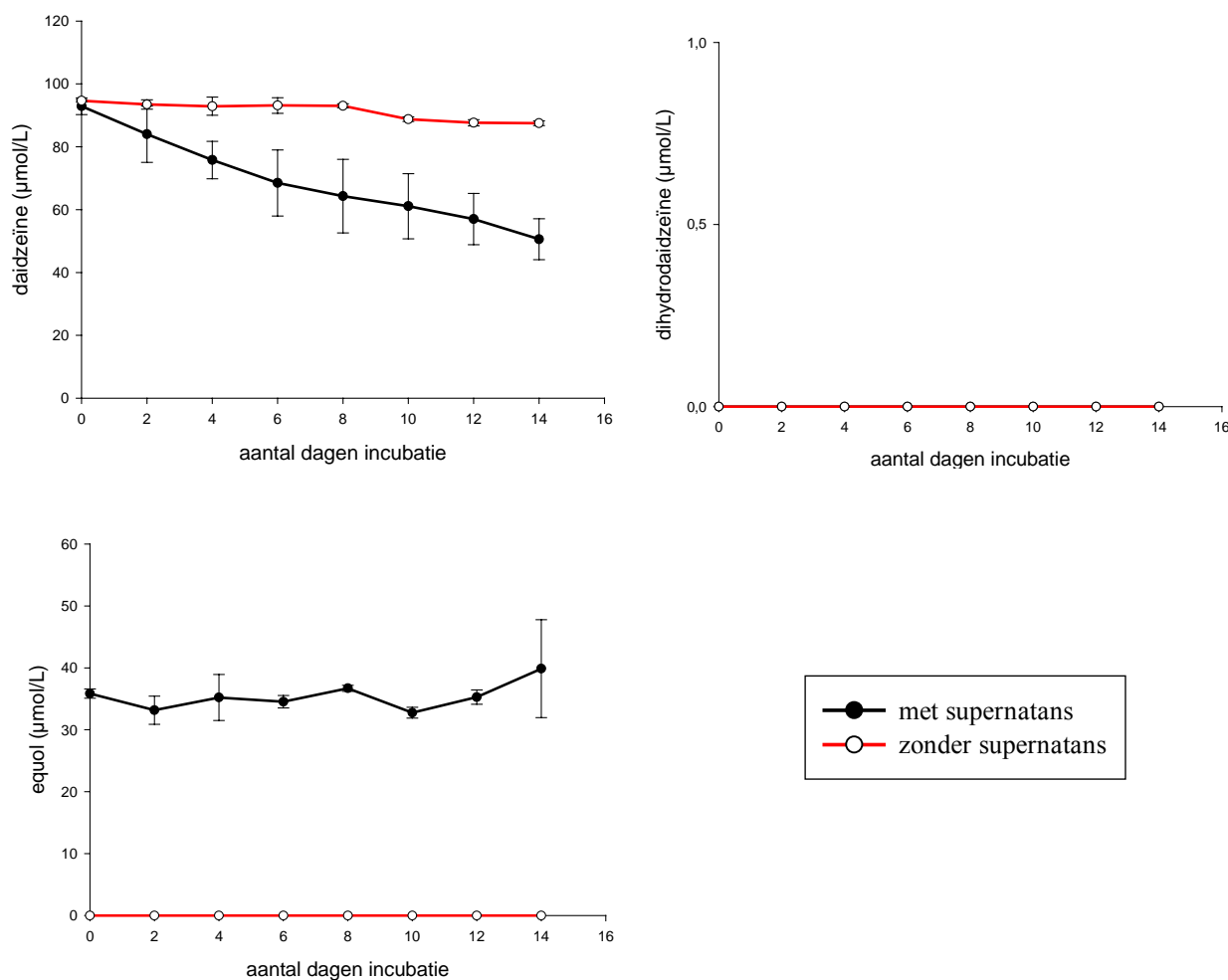


Fig. 30 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie van met en zonder supernatans in afwezigheid van het equolproducerend consortium (µmol/L)

Hieruit blijkt dat gedurende de incubatie met supernatans van een medium waarin equol werd geproduceerd, de daidzeïneconcentratie na 14 dagen tot de helft werd gereduceerd. Er werd echter geen dihydrodaidzeïne en extra equol gevormd. In de controle bleef de daidzeïneconcentratie, analoog als in het eerste experiment waar geen microbiota werd toegevoegd, min of meer constant.

2.10. Synergisme

De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium onder de verschillende experimentele omstandigheden wordt in Fig. 31 voorgesteld.

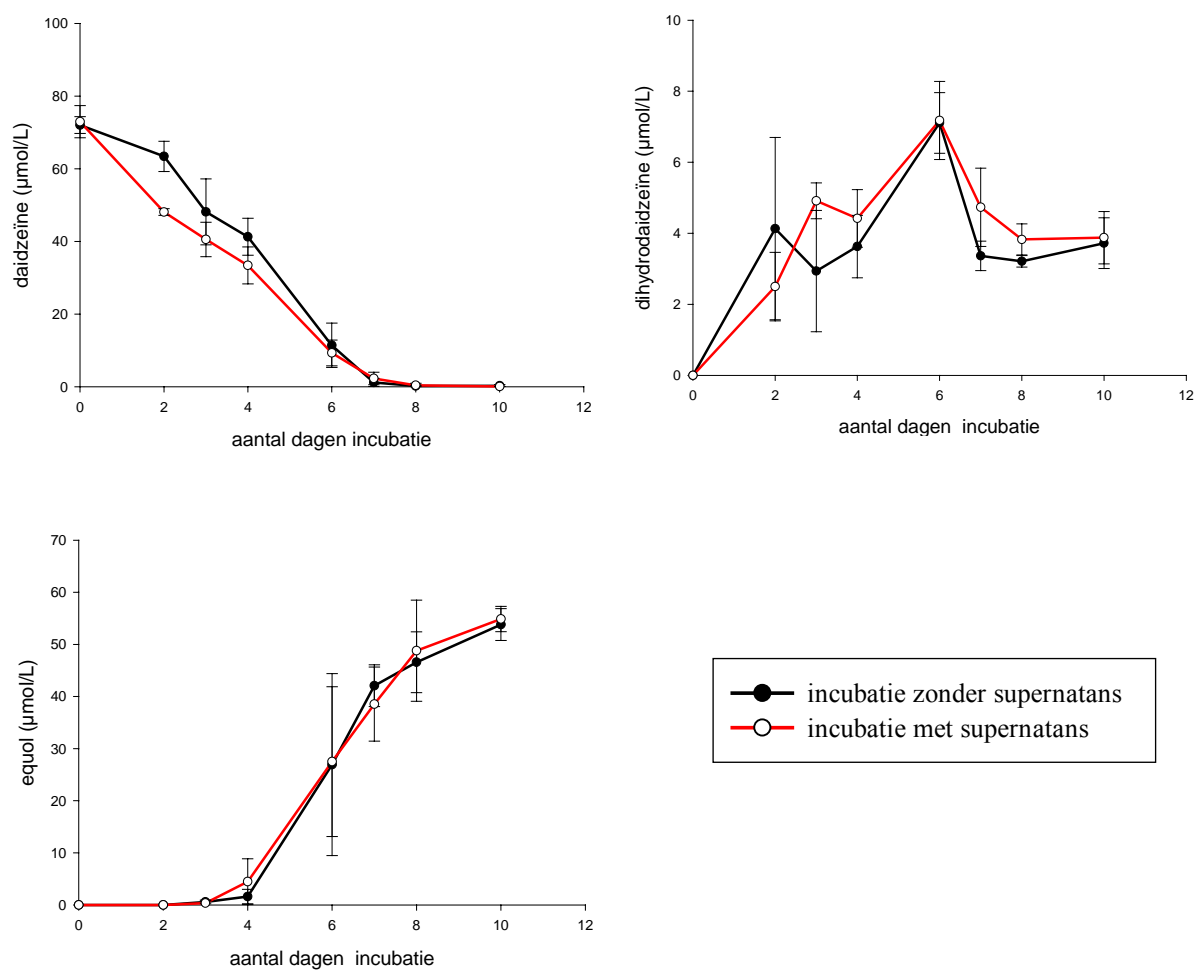


Fig. 31 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie van het equolproducerend consortium met en zonder supernatans (µmol/L)

Uit de grafieken blijkt dat het supernatans van een reeds opgegroeide cultuur de equolproductie niet bevordert. Zowel de evolutie van daidzeïne ($p = 0,11$), als van dihydrodaidzeïne ($p = 0,31$) en equol ($p = 0,6$) toont geen significante verschillen volgens de gepaarde T-test met SigmaPlot.

3. Toepassing als probioticum

3.1. Equolproductie in aanwezigheid van autochtone colonmicrobiota

De vorming van equol en *O*-DMA uit daidzeïne bij verschillende combinaties van het equolproducerend consortium met de faecale culturen BP01, BP06 en BP33 wordt in Fig. 32, 33 en 34 voorgesteld.

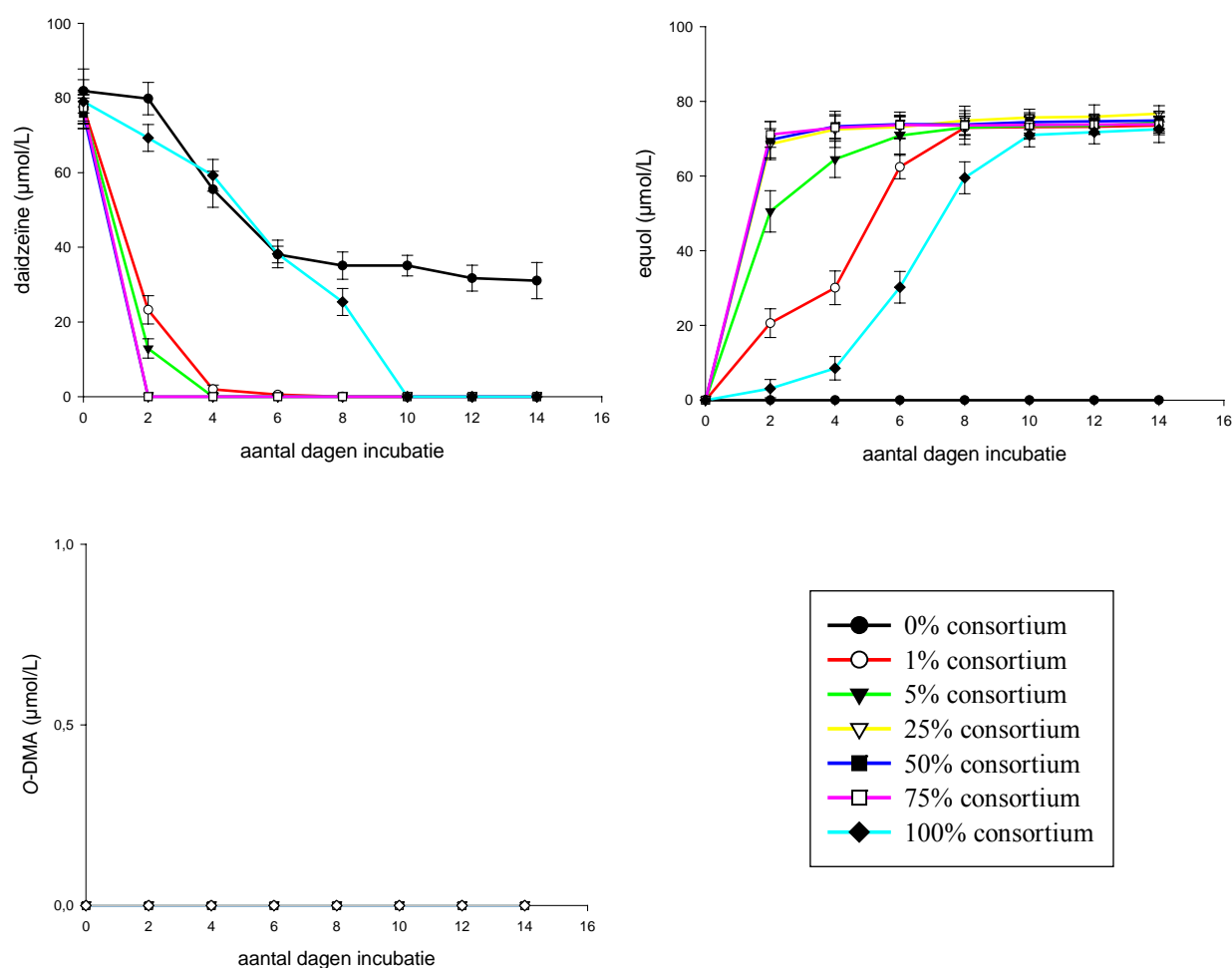


Fig. 32 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en *O*-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP01 (μmol/L)

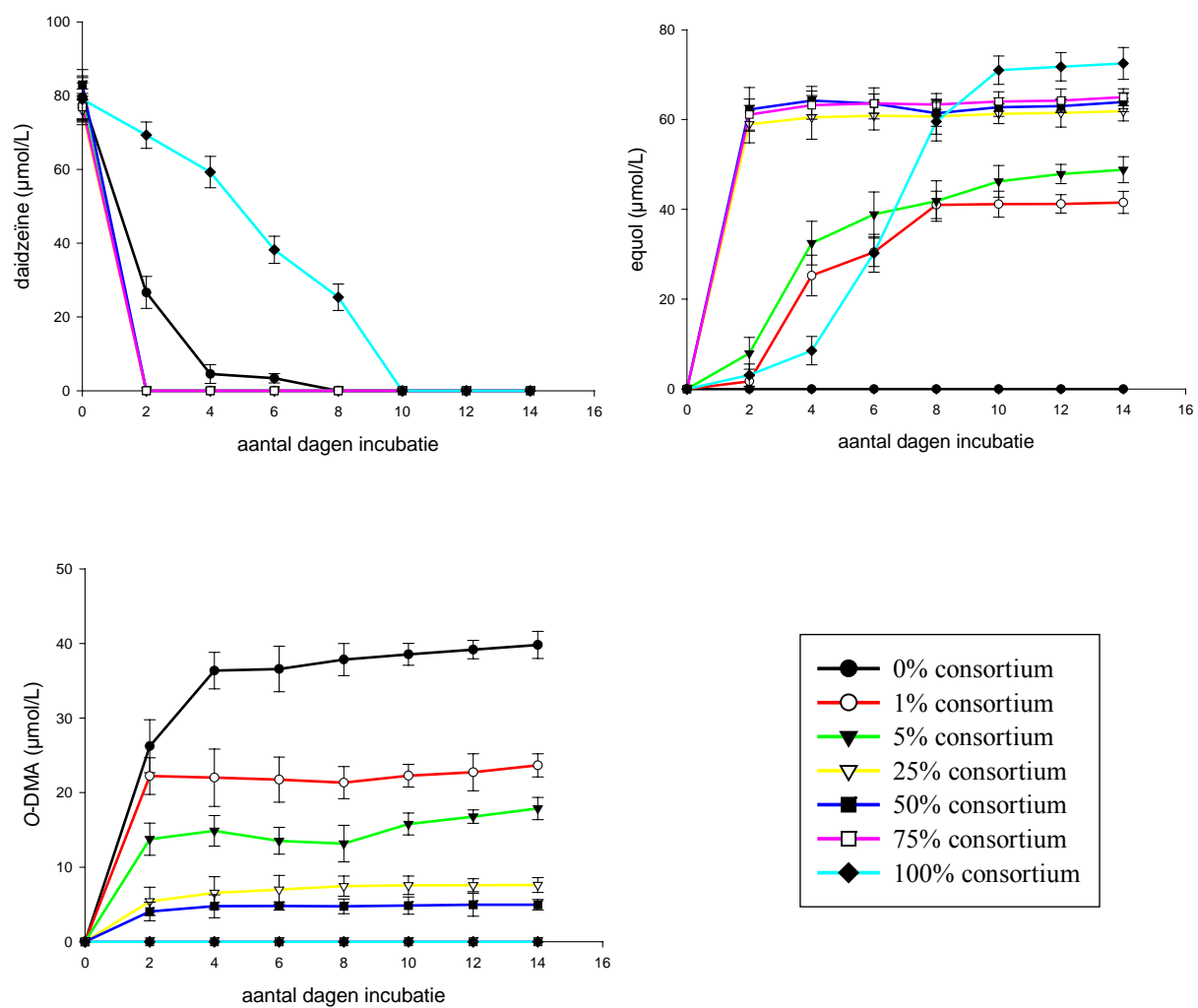


Fig. 33 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en O-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP06 (µmol/L)

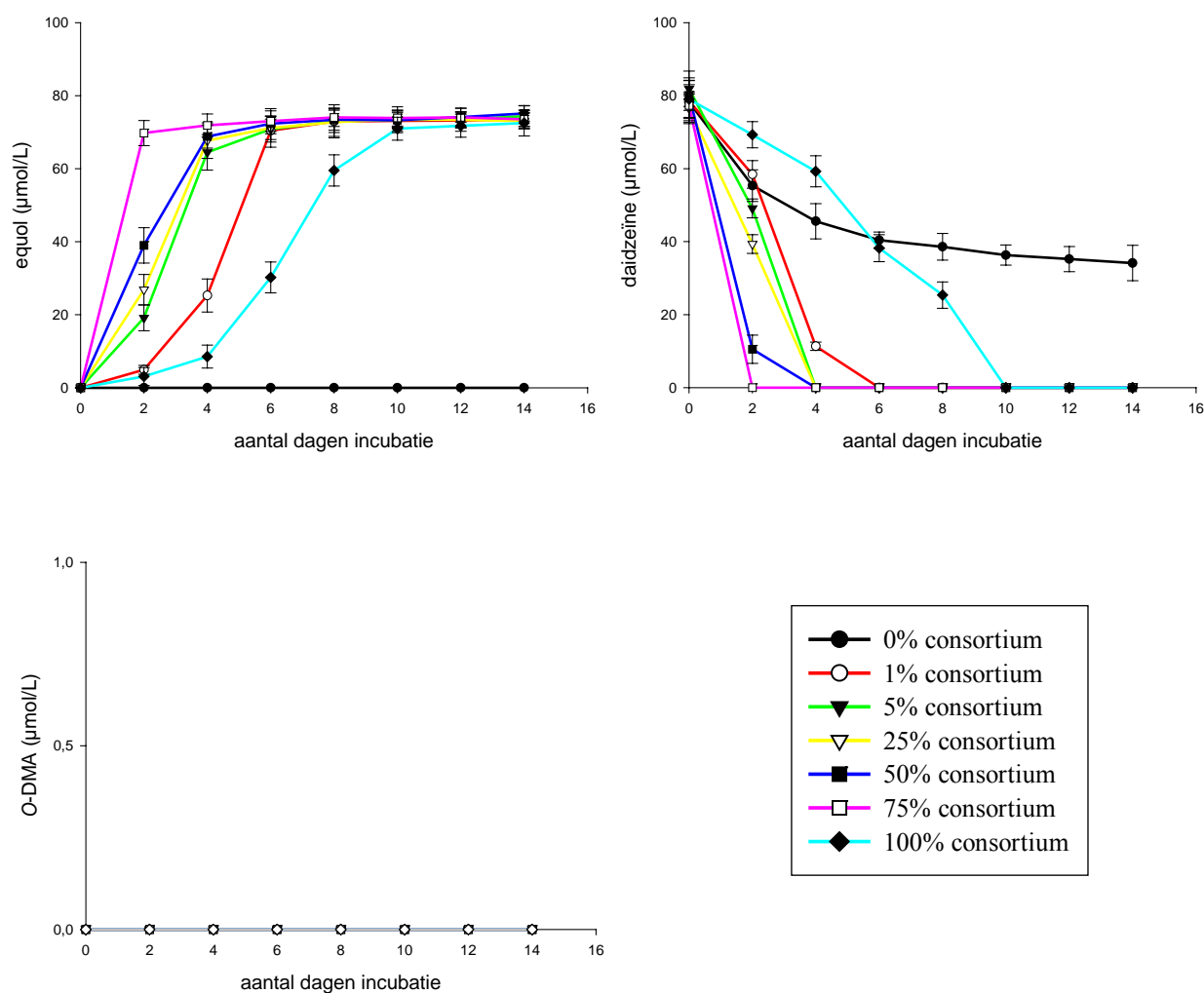


Fig. 34 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en *O*-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP33 (µmol/L)

Zowel in combinatie met BP01, BP06 en BP33 werd er bij een verhouding van 1% van het equolproducerend consortium t.o.v. 99% van de faecale cultuur al na twee dagen equol gevormd. In afwezigheid van het consortium werd er, zoals verwacht, geen equol gevormd. De snelheid van de equolvorming nam toe naarmate de verhouding van het consortium steeg t.o.v. de faecale cultuur. Wanneer het consortium echter in afwezigheid van autochtone darmbiota werd geïncubeerd, kwam de equolvorming trager op gang.

Enkel bij BP06 werd *O*-DMA gevormd. Bij de zuivere BP06-cultuur werd al de daidzeïne omgezet tot *O*-DMA. De concentratie *O*-DMA daalde en de equolconcentratie steeg naarmate de verhouding van het consortium t.o.v. BP06 toenam. Vanaf een verhouding van 75% van het consortium t.o.v. 25% van de BP06-cultuur werd geen *O*-DMA meer gevormd.

3.2. Resistentie tegen maagzuur

3.2.1. Equolproductie

De gemeten omzetting van daidzeïne naar equol via dihydrodaidzeïne bij incubatie van het consortium in aan- of afwezigheid van maagzuur wordt in Fig. 35 voorgesteld.

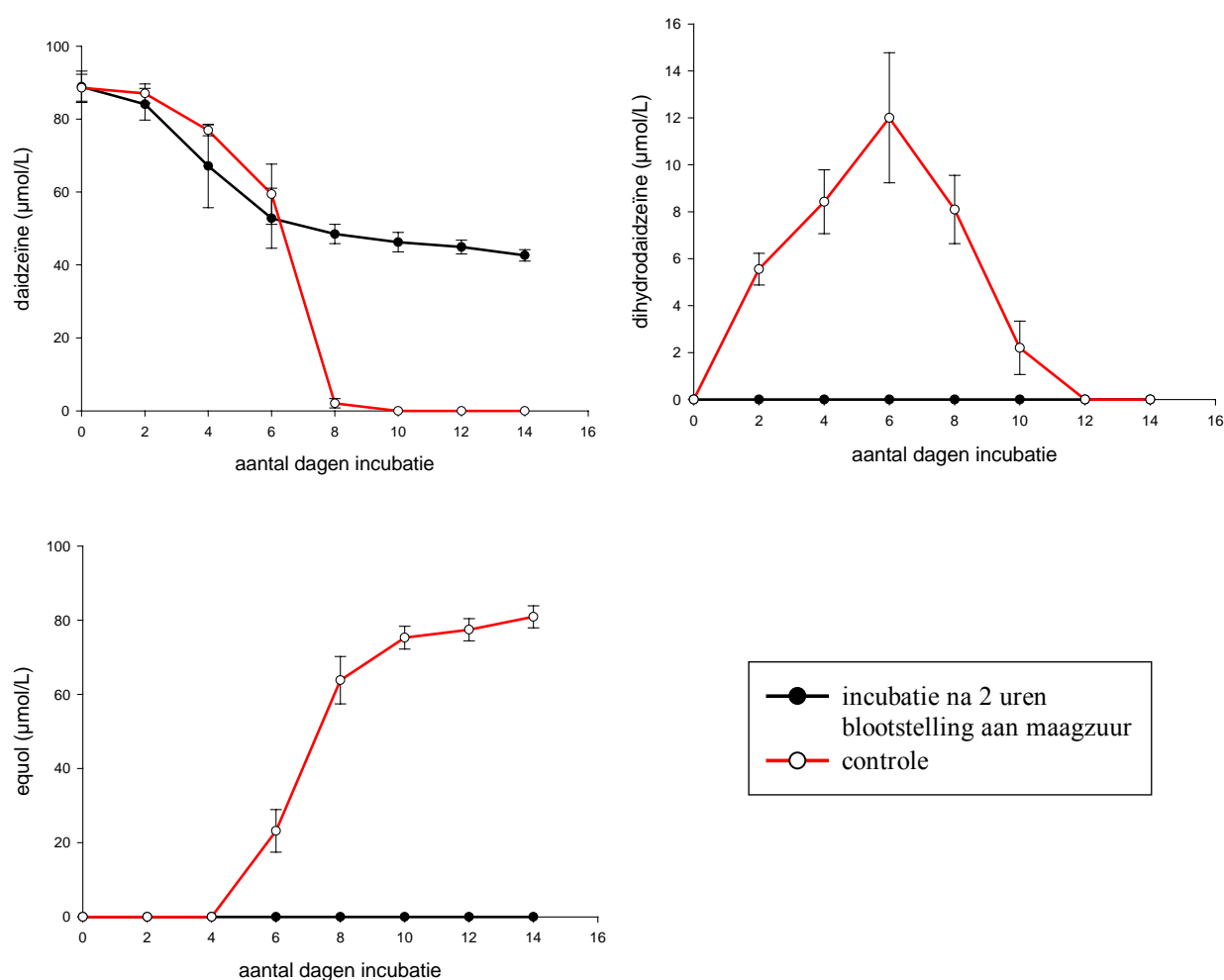


Fig. 35 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium in aan- of afwezigheid van maagzuur (µmol/L)

Uit deze resultaten blijkt dat er na blootstelling aan maagzuur, niettegenstaande de concentratie van daidzeïne gehalveerd werd, noch equol noch dihydrodaidzeïne gevormd werd.

3.2.2. Celdensiteit

Met de resultaten van de uitplantingen werden onderstaande groeicurven bekomen.

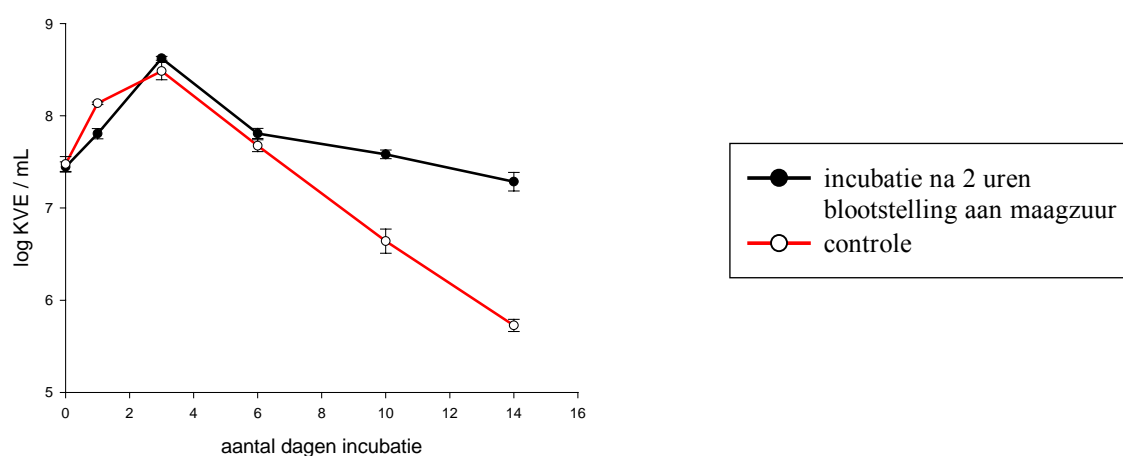


Fig. 36 Groeicurven van het consortium bij incubatie na al dan niet 2 uren blootstelling aan maagzuur

Uit de groeicurven blijkt dat de blootstelling aan maagzuur gedurende twee uren de daaropvolgende groei van het consortium niet negatief beïnvloedde. Bij toediening van het maagzuur kon aggregaatvorming worden waargenomen, waardoor enkel de buitenste micro-organismen werden blootgesteld aan het maagzuur. Na neutralisatie met maagzuur werden deze aggregaten terug gesuspendeerd.

3.3. Resistentie tegen galzouten

3.3.1. Equolproductie

De gemeten omzetting van daidzeïne naar equol via dihydrodaidzeïne bij incubatie van het consortium in aan- of afwezigheid van galzouten wordt in Fig. 37 voorgesteld.

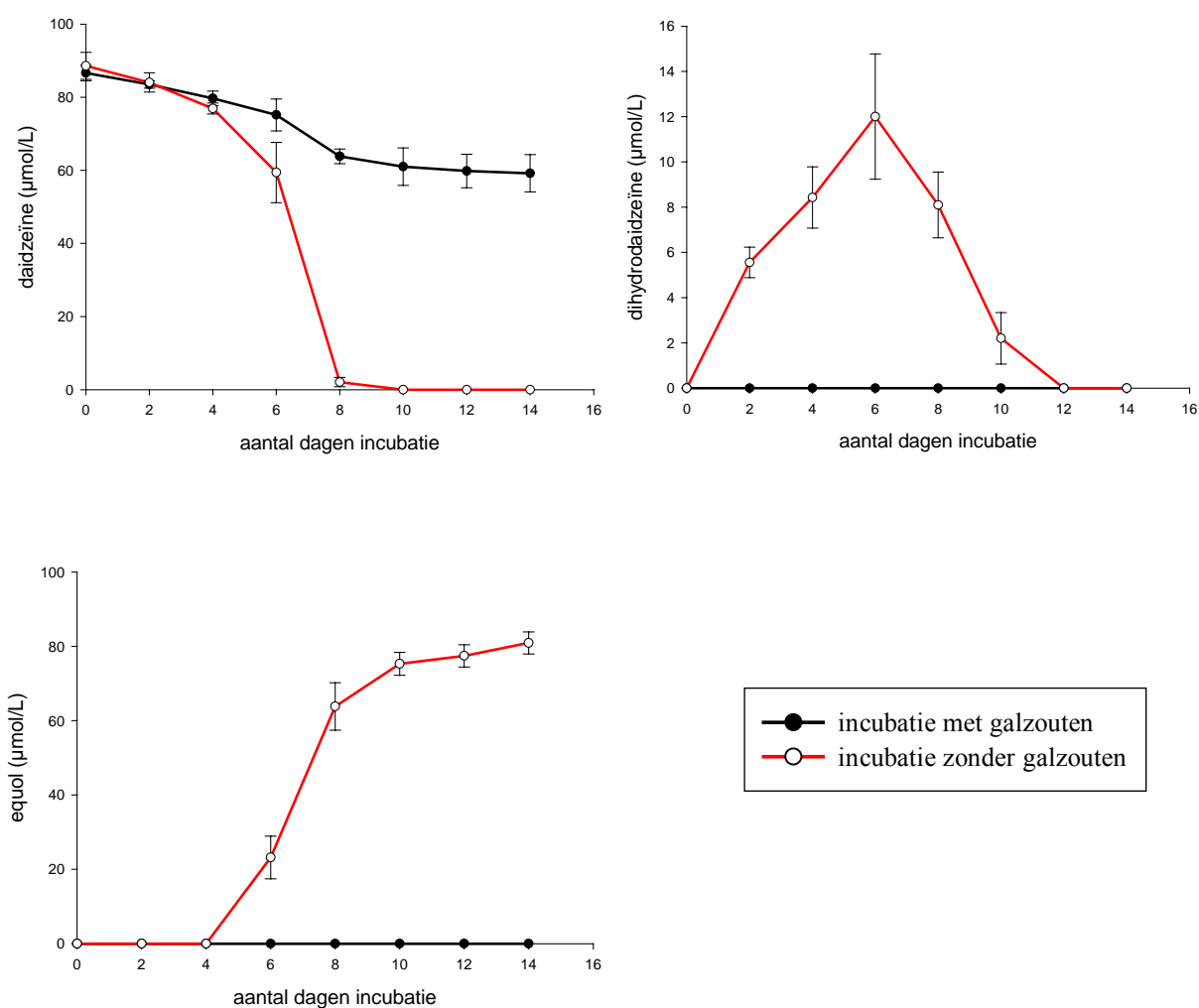


Fig. 37 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, dihydrodaidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium in aan- of afwezigheid van galzouten (µmol/L)

Uit deze resultaten blijkt dat er in aanwezigheid van galzouten geen equol werd gevormd. De concentratie daidzeïne nam nauwelijks af gedurende de incubatie en er werd ook geen dihydrodaidzeïne gevormd.

3.3.2. Celdensiteit

Met de resultaten van de uitplantingen werden onderstaande groeicurven bekomen.

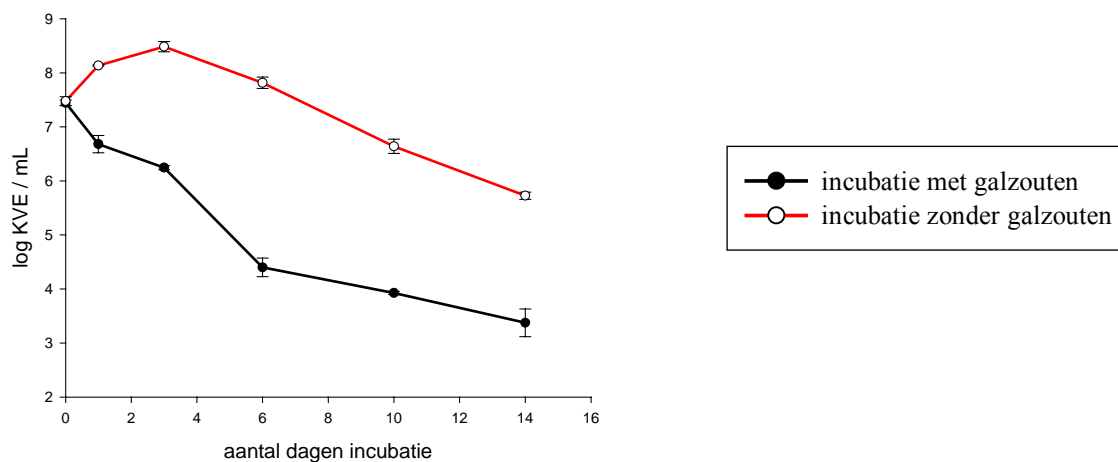


Fig. 38 Groeicurven van het consortium bij incubatie met en zonder galzouten

De groeicurven tonen aan dat de groei van het consortium geïnhibeerd werd bij incubatie in aanwezigheid van galzouten.

3.4. Impact van FOS op de microbiota

3.4.1. Impact op het equolproducerend consortium

De gemeten vorming van equol uit daidzeïne bij incubatie in aan- en afwezigheid van FOS wordt in Fig. 39 voorgesteld. Hieruit blijkt dat er in aanwezigheid van FOS geen equol wordt gevormd. Bij de controle werd na 6 dagen equol waargenomen terwijl er in het medium waaraan FOS werden toegevoegd na 14 dagen nog altijd geen equol werd gedetecteerd. De daidzeïneconcentratie neemt echter wel af, maar in mindere mate dan bij de controle zonder FOS.

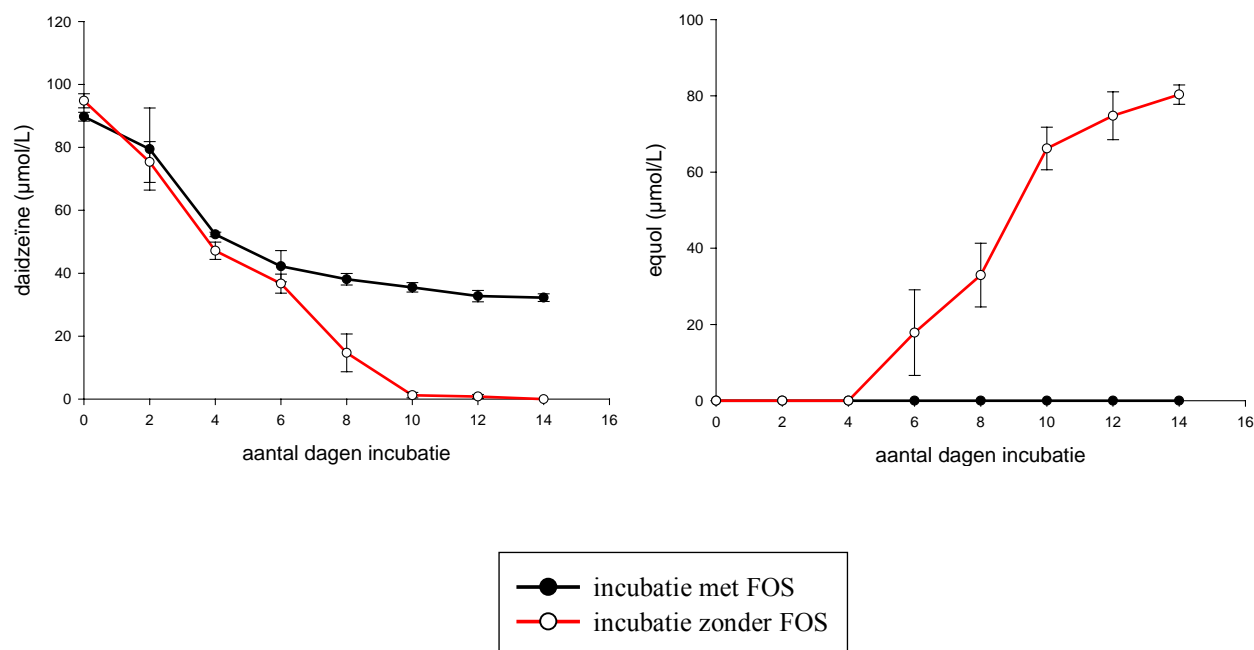


Fig. 39 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne en equol gedurende incubatie met het equolproducerend consortium in een medium met en zonder FOS ($\mu\text{mol/L}$)

3.4.2. Impact op de darmbiota, gesupplementeerd met het consortium

De vorming van equol en *O*-DMA uit daidzeïne bij verschillende combinaties van het equolproducerend consortium met de faecale culturen BP01, BP06 en BP33 in aan- of afwezigheid van FOS wordt in Fig. 40, 41 en 42 voorgesteld.

Uit de grafieken blijkt dat het consortium in combinatie met autochtone darmbiota in aanwezigheid van FOS ook niet meer in staat is om equol te vormen uit daidzeïne. Zowel in combinatie met BP01, BP06 als met BP33 werd er geen equol meer gedetecteerd in de media die werden gesupplementeerd met FOS. De concentratie daidzeïne werd in aanwezigheid van FOS ongeveer gehalveerd na 14 dagen, terwijl ze bij de controle reeds na enkele dagen volledig werd gereduceerd.

Fructo-oligosacchariden blijken ook de *O*-DMA vorming te inhiberen. Er werd aanzienlijk minder *O*-DMA gevormd wanneer BP06 geïncubeerd met FOS. In tegenstelling tot de equolvorming, die volledig werd geïnhibeerd, werd er toch nog een kleine hoeveelheid *O*-DMA gevormd in aanwezigheid van FOS.

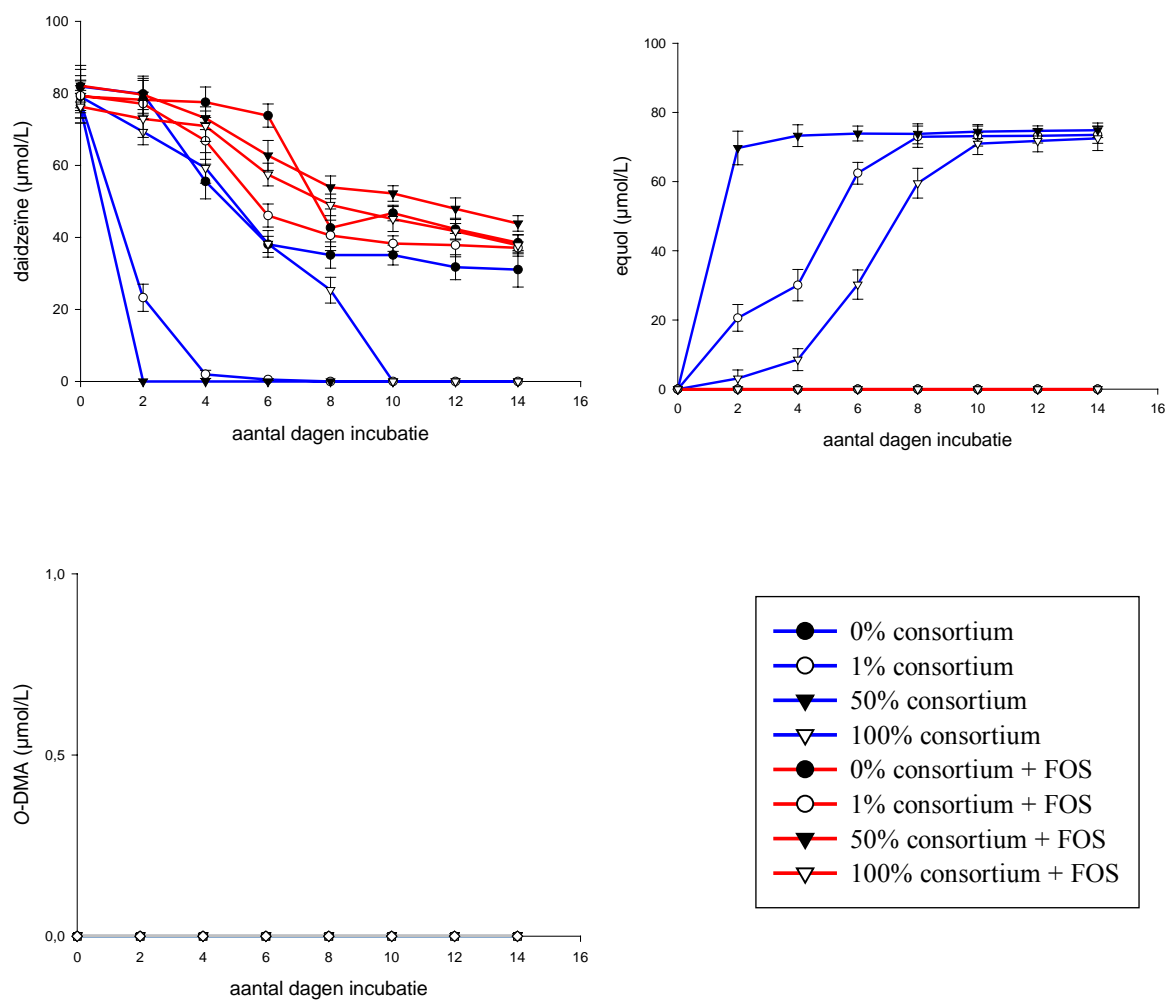


Fig. 40 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en *O*-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP01 in aan- of afwezigheid van FOS (μmol/L)

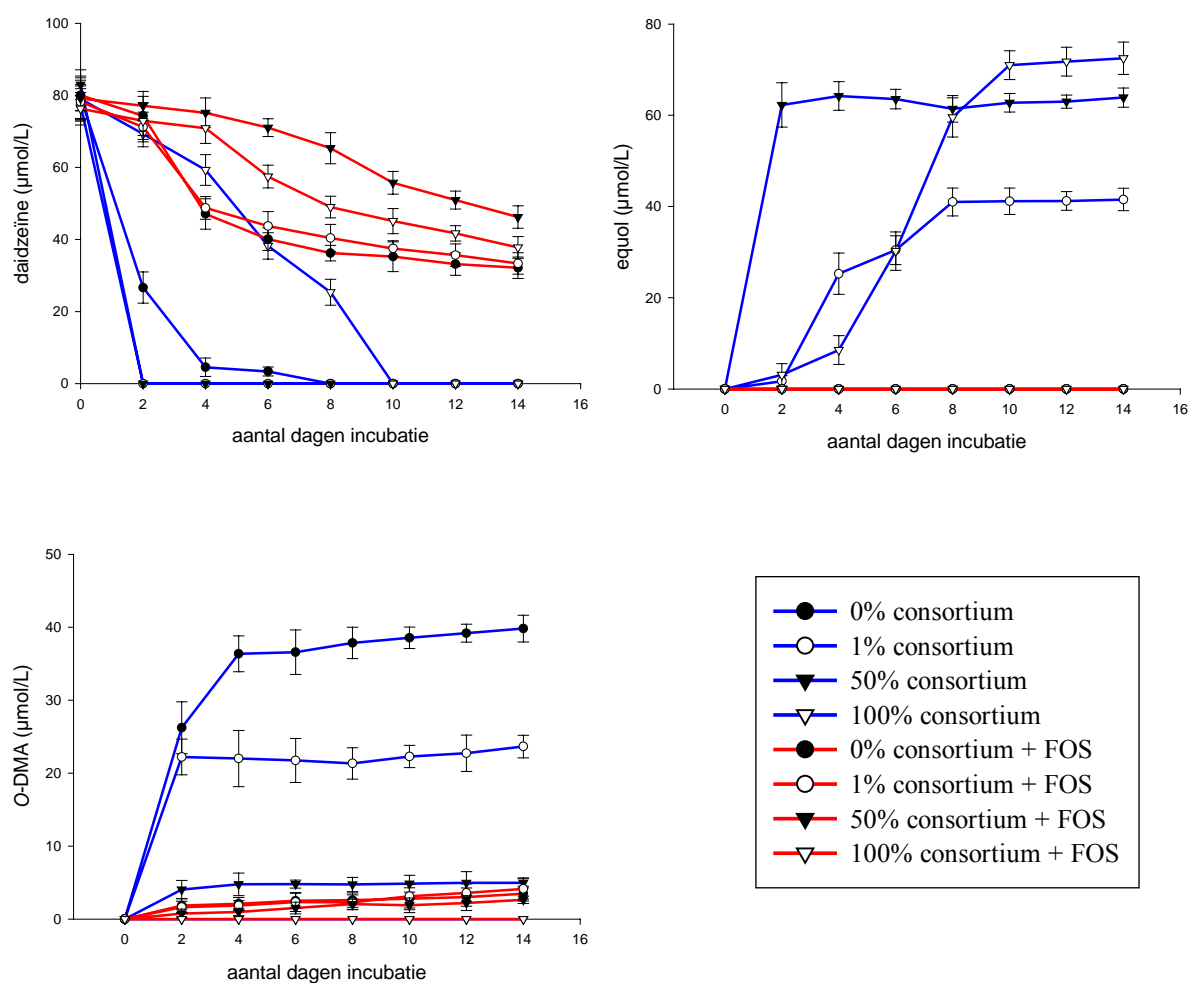


Fig. 41 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en *O*-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP06 in aan- of afwezigheid van FOS ($\mu\text{mol/L}$)

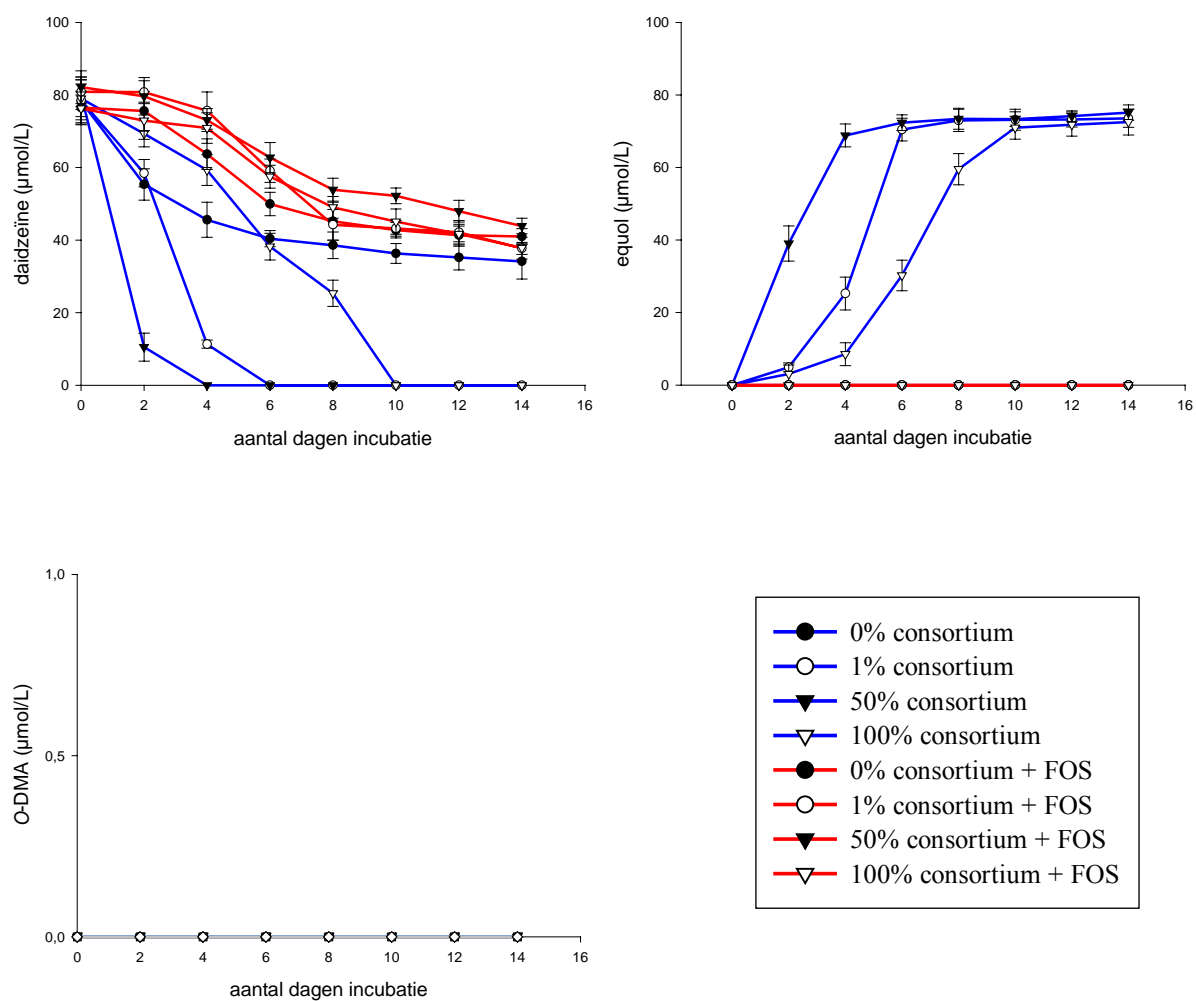


Fig. 42 De evolutie van de concentratie aan daidzeïne, equol en *O*-DMA gedurende incubatie met verschillende combinaties van het equolproducerend consortium en BP33 in aan- of afwezigheid van FOS ($\mu\text{mol/L}$)

3.5. Equolproductie na lyofilisatie

De evolutie van de equolproductie bij incubatie met de gevriesdroogde equolproducerende consortia die respectievelijk na 2 en 5 dagen werden gelyofiliseerd, wordt in Fig. 43 getoond.

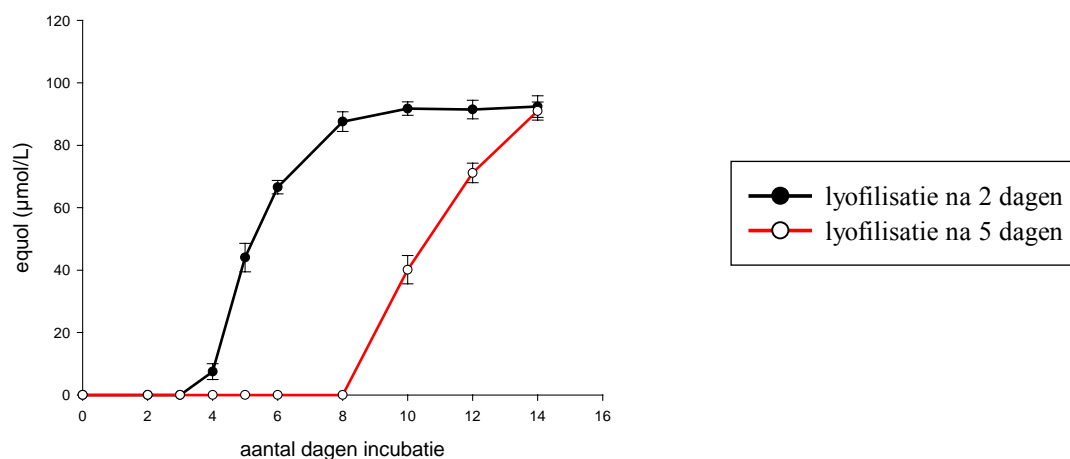


Fig. 43 Evolutie van de equolproductie bij incubatie met de gevriesdroogde equolproducerende consortia die respectievelijk na 2 en 5 dagen werden gelyofiliseerd ($\mu\text{mol/L}$)

Hieruit blijkt dat het consortium na vriesdrogen nog steeds in staat is om equol te vormen. In het geval waarbij het consortium na 2 dagen werd gelyofiliseerd werd er sneller equol gevormd in vergelijking met een lyofilisatie na 5 dagen.

Deel IV

Discussie

1. Identificatie van een equolproducerend consortium

1.1. Isolatie via uitplating

Uit de DGGE analyse van de 16S rDNA fragmenten bleek dat maar 2 van de 4 bacteriën isoleerbaar zijn via uitplating. Sequencing van deze 2 stalen leidde tot de identificatie van *Lactobacillus mucosae* en *Enterococcus faecium*.

Zowel *Lactobacillus mucosae* als *Enterococcus faecium* zijn grampositieve, facultatief anaërobe melkzuurbacteriën die deel uitmaken van de natuurlijke darmbiota in dieren en mensen. Melkzuurbacteriën worden algemeen gebruikt in talrijke zuivelproducten, gefermenteerde worst, groenten en silage voor diervoeders, maar recentelijk hebben een aantal leden van deze groep heel wat pennen in beweging gebracht omwille van hun gebruik als probiotica (Gomes et Malcata, 1999; Holzappel, 2001; Klein, 1998).

Lactobacillus mucosae is een niet beweeglijke, staafvormige bacterie. *L. mucosae* is obligaat heterofermentatief en vertoont *in vitro* een mucusbindend vermogen. Lactobacilli worden, naast bifidobacteriën, het meest aangewend als probiotica. De positieve effecten die toegewezen worden aan deze bacteriën zijn o.a. stabilisatie van de normale microbiota, bescherming tegen pathogenen door verlaging van de intestinale pH en productie van antibiotica, verlaging van het cholesterolgehalte, stimulatie van het immuunstelsel en een mogelijke bescherming tegen verschillende vormen van kanker (Fooks & Gibson, 2002; Marteau et al., 2002; Rafter, 2002).

Enterococci worden beschouwd als bacteriën met een geringe pathogeniciteit die enkel verzwakte personen (vb. immunodeficiënte patiënten in oncologie, hematologie of transplantatie eenheden) infecteren (Klare et al., 2003). *Enterococcus faecium* blijkt probiotische eigenschappen te bezitten. Benyacoub et al. (2003) toonde aan dat de supplementatie van voedsel met *Enterococcus faecium* (SF68) het immuunsysteem stimuleert. Vahjen et al. (2002) suggereren dat dit gebeurt via een stimulatie van andere melkzuurbacteriën, voornamelijk lactobacilli.

1.2. Isolatie via klonering

Omdat de overige twee bacteriën uit het consortium niet konden geïsoleerd worden via een eenvoudige uitplating werd een kloneringstechniek toegepast. In een kloneringsvector kan immers het PCR product van maar één bacterie ingebouwd worden. Deze vectoren werden in *E. coli* cellen getransformeerd. Omdat *E. coli* cellen in tegenstelling tot de oorspronkelijke bacteriën wel goed uitplaatbaar zijn, konden de verschillende klonen analoog als bij de eerste techniek via uitplating geïsoleerd worden. Sequencing van het 16S rDNA leidde tot *Finegoldia magna*. Een vierde bacterie kon niet geïdentificeerd worden maar blijkt sterk verwant te zijn met *Veillonella* spp. De sequentie van het 16S rDNA komt net niet voor 96 % overeen met deze species.

Finegoldia magna (vroeger *Peptostreptococcus magnus*) maakt deel uit van de normale biota van het gastro-intestinaal, het vrouwelijk uro-genitaal kanaal en waarschijnlijk ook van de huid (Murdoch & Shah, 1999). Het is de meest voorkomende grampositieve anaërobe coccus die geïsoleerd werd uit klinische stalen (Todo et al., 2002). Een aantal onderzoekers suggereren echter dat de cellen relatief aërotolerant zijn aangezien ze vaker worden geïsoleerd in associatie met aëroben dan met obligaat anaeroben (Murdoch, 1998). Stammen van *Finegoldia magna* zijn erg variabel in zowel kolonie- als celmorfologie (Murdoch & Mitchelmore, 1991) en worden vaak geïsoleerd uit humane pathologische stalen, voornamelijk van infecties van de huid, zacht weefsel, beenderen en gewrichten (Murdoch & Shah, 1999).

Bacteriën van het genus *Veillonella* zijn obligaat anaërobe, gram-negatieve cocci die tot de normale darmbiota van dieren en mensen behoren (Durant et al., 1997). Ze komen ook in de humane mondholte voor, waar ze een anticariogene rol spelen omdat ze goed groeien met het melkzuur dat geproduceerd wordt door streptococci, actinomyces en lactobacilli in tandplak (Guteriérrez de Ferro et al., 1999). Dit melkzuur lost immers het tandglazuur op waardoor gaatjes (cariës) kunnen ontstaan. Er werd aangetoond dat *Veillonella parvula* zowel nitraat als fumaarzuur kan reduceren (Asanuma et al., 1999). Deze bacterie kan bovendien groeien op een minimaal medium met NO_3^- en H_2 en is relatief resistent aan het tussenproduct nitriet, dat gevormd wordt bij de reductie van nitraat tot ammoniak (Iwamoto et al., 2002).

Lactobacillus mucosae en *Enterococcus faecium* konden echter niet geïdentificeerd worden via de kloneringsmethode. Dit wijst erop dat deze species in het vloeibaar BH1a-medium onder de gebruikte experimentele omstandigheden waarschijnlijk overgroeid worden door *Finegoldia magna* en de *Veillonella*-verwante species. Bij de uitplating daarentegen, waarbij *Finegoldia magna* en de *Veillonella*-verwante species niet of in heel kleine aantallen voorkomen, blijken deze melkzuurbacteriën wel goed te groeien.

Aangezien het consortium in staat is om equol te vormen gedurende incubatie in vloeibaar BH1a-medium, waarin blijkbaar enkel *Finegoldia magna* en de *Veillonella*-verwante species competitief zijn, kan gesuggereerd worden dat minstens één van deze species waarschijnlijk verantwoordelijk zal zijn voor de vorming van equol.

2. Karakterisatie van een equolproducerend consortium

2.1. Stabiliteit van daidzeïne in afwezigheid van microbiota

De cruciale rol van de intestinale microbiota bij de vorming van equol uit daidzeïne werd reeds aangehaald in de literatuurstudie. In afwezigheid van microbiota bleef de concentratie van daidzeïne min of meer stabiel en werd er geen dihydrodaidzeïne noch equol gevormd. Het resultaat van deze test kan als blanco referentie gebruikt worden voor de andere experimenten, waarbij de transformatie van daidzeïne kan toegewezen worden aan de activiteit van de toegediende microbiota.

In vivo kan echter wel dihydrodaidzeïne, maar géén equol, gevormd worden uit daidzeïne in afwezigheid van microbiota; Bowey et al. (2003) detecteerden dit dihydro-derivaat bij kiemvrije ratten na het voeden met een soja-isoflavonen bevattend dieet. Dit deed de auteurs suggereren dat deze dihydro-derivaten kunnen gevormd worden tijdens processen in het (zoog)dier, voornamelijk cytochroom P450-gemedieerde processen. Aangezien het gehalte aan dihydro-derivaten in ratten geïnoculeerd met faecaal materiaal afkomstig van een equolproducent toch hoger was dan in de kiemvrije dieren, werd toch besloten dat de darmbacteriën wel een rol spelen in hun vorming. Er werd door Hur et al. (2000) immers ook dihydrodaidzeïne productie vastgesteld door bacteriën *in vitro*.

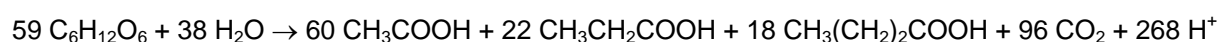
2.2. Stabiliteit van equol in aanwezigheid van microbiota

Om de stabiliteit van equol in aanwezigheid van microbiota na te gaan werd equol gedurende 4 weken geïncubeerd in aanwezigheid van het consortium. Uit de resultaten blijkt dat equol niet verder microbiëel gemetaboliseerd wordt. Eens equol gevormd is, lijkt het metabolisch inert. Dit is in samenspraak met de bevindingen van Atkinson et al. (2004). Ook in het menselijke lichaam ondergaat equol, tenzij glucuronidatie en een verwaarloosbare sulfatatie in de lever en de brush border cellen van de dikke darm, geen verdere biotransformatie (Setchell et al., 2002b).

2.3. De invloed van waterstof en KKVZ op de equolproductie

2.3.1. Equolproductie

De omzetting van daidzeïne naar equol gebeurt door bacteriën in de dikke darm. In het begin van de dikke darm vindt er echter ook een fermentatie van koolhydraten tot korte-keten vetzuren zoals acetaat, propionaat en butyraat plaats. Deze omzetting wordt benaderd door volgende stoichiometrische vergelijking (Cummings, 1997):



Uit onderzoek is gebleken dat equol-vormers meer koolhydraten als energiebron gebruiken dan niet-vormers (Rowland et al., 2000; Lampe et al., 1998). Daarom werd in dit experiment nagegaan of deze stimulatie van de equolproductie onrechtstreeks gebeurt door de aanwezigheid van de korte-ketenvetzuren in de dikke darm. Er werd ook nagegaan of aanwezigheid van H₂ een hogere equolproductie oplevert dan N₂ omdat H₂ ook een belangrijk fermentatieproduct is van de fermentatie van koolhydraten in de dikke darm.

De vorming van equol uit daidzeïne, met dihydrodaidzeïne als tussenproduct, wijst op een reductief microbieel proces waarbij waterstof wordt verbruikt (Fig. 44). De resultaten van dit experiment bevestigen deze veronderstelling, aangezien de vorming van equol aanzienlijk versneld werd wanneer de headspace werd gespoeld met waterstof.

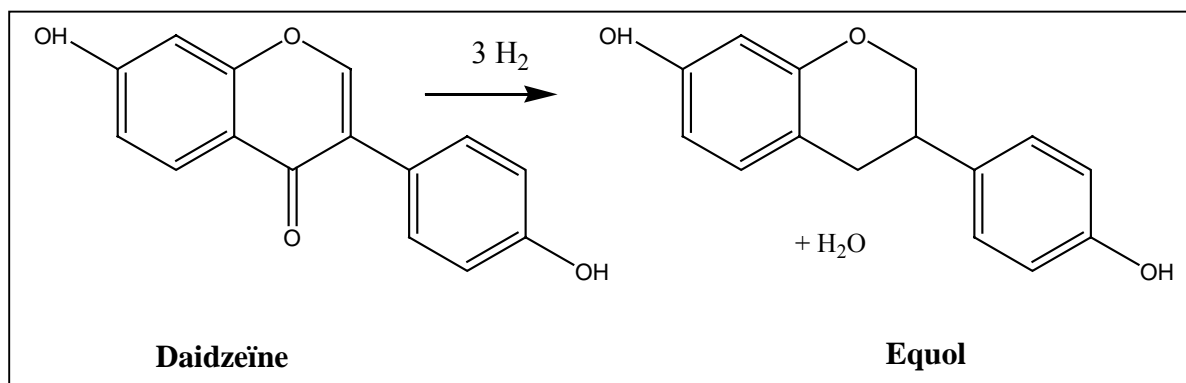


Fig. 44 Omzetting van daidzeïne naar equol

Er werd anderzijds ook aangetoond dat propionaat, en in mindere mate butyraat, de equolproductie bevordert. In het medium met acetaat daarentegen, zonder waterstof in de headspace, werd er geen equol gevormd. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het meer geoxideerd karakter van dit vetzuur waardoor er bij het metabolisme ervan netto meer waterstof verbruikt wordt ten opzichte van propionaat en butyraat. Hiermee kan ook het feit verklaard worden dat in aanwezigheid van waterstof het negatief effect van acetaat teniet wordt gedaan. Anderzijds kan gesuggereerd worden dat het equolvormingsproces een soort co-metabolisme is van een acetogene bacterie, waarbij in aanwezigheid van een overmaat acetaat het proces geïnhibeerd wordt via een feedbackmechanisme. De uitgangproducten, CO₂ en daidzeïne, hebben echter een sterk verschillende structuur waardoor co-metabolisme op het eerste zicht niet zo realistisch lijkt. De beide uitgangproducten hebben wel een zuurstof atoom dat dubbel gebonden is op een koolstofatoom gemeen (Fig 45). De aanwezigheid van een acetogene bacterie in het consortium lijkt echter onwaarschijnlijk, rekening houdend met de metabolische eigenschappen van de geïdentificeerde bacteriën. Er kan echter niet uitgesloten worden dat de vierde, nog ongekende bacterie, acetogene eigenschappen bezit.

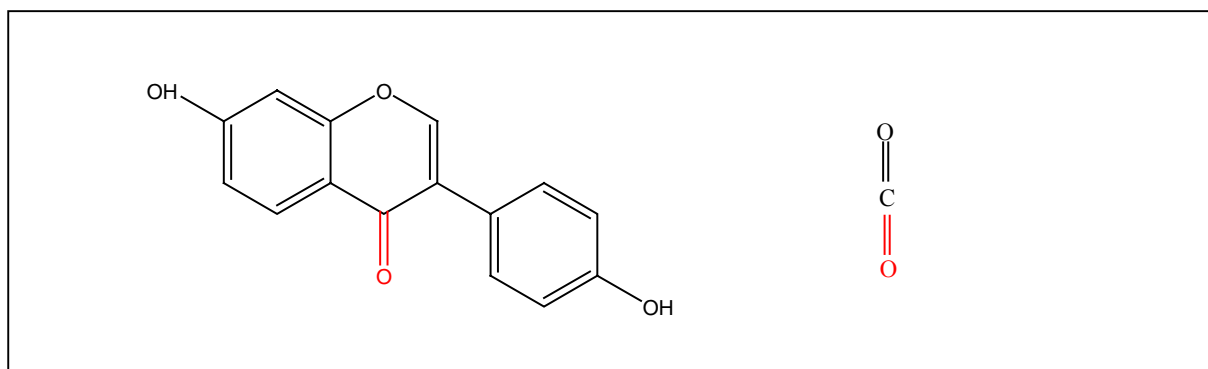


Fig. 45 Structuur van daidzeïne en CO₂

In afwezigheid van waterstof en korte-ketenvetzuren verliep de equolproductie aanzienlijk trager. Het waterstofgas trad hier waarschijnlijk op als limiterend reagens bij de vorming van equol uit daidzeïne. Bij de aanvang van het experiment was er immers geen waterstof aanwezig, waardoor de equolvorming pas op dreef kon komen wanneer er voldoende waterstof werd geproduceerd door de bacteriën in het consortium. In aanwezigheid van waterstof was de equolvorming niet meer afhankelijk van de microbiële waterstofvorming waardoor de reductie van daidzeïne onmiddellijk kon starten.

Er werd al eerder door Lampe et al. (1998) aangetoond dat een toenemend gehalte aan koolhydraten de betrokken bacteriën stimuleren. Ook Ohta et al (2002) en Tsangalis et al (2002) hebben dit bevestigd. De resultaten van het experiment laten vermoeden dat voornamelijk een hoge vezelconsumptie de equolproductie bevordert. Deze vezels worden immers niet geabsorbeerd doorheen de dunne darm. Ze komen intact in de dikke darm terecht waar ze gefermenteerd worden tot vluchtige vetzuren, CO₂ en H₂. Gewone koolhydraten worden echter voornamelijk verteerd in de dunne darm en slechts een klein deel hiervan komt in de dikke darm terecht.

2.3.2. Vorming van korte-ketenvetzuren

Om na te gaan of waterstof, naast de equolproductie, ook de vorming van korte-ketenvetzuren beïnvloedt, werd het vetzuurprofiel in kaart gebracht. Om het effect van de toegevoegde korte-ketenvetzuren uit te schakelen, werden enkel de data van de controle gebruikt. Hieruit blijkt dat in aanwezigheid van waterstof meer acetaat, maar minder propionaat en butyraat

gevormd wordt. Hieruit kan gesuggereerd worden dat een acetogene bacterie, die gestimuleerd wordt door waterstof, aanwezig is in het consortium. De verschillen in KKVZ productie zijn echter relatief klein zodat ze met enige voorzichtigheid moeten geïnterpreteerd worden. In aanwezigheid van waterstof worden doorgaans immers eerder meer gereduceerde vetzuren zoals butyraat en propionaat gevormd, ten koste van meer geoxideerde vetzuren zoals acetaat (Cummings, 1997).

2.3.3. pH-profiel

Door het metabolisme van bacteriën kan de zuurtegraad gedurende een incubatie variëren met de tijd. Dezelfde trend werd overal teruggevonden: een sterke daling tot een minimum, gevolgd door een lichte stijging. Steriel BHI-medium wordt gekenmerkt door een pH van ongeveer 7,2. Bij aanvang consumeert het consortium voornamelijk koolhydraten, waardoor de pH daalt. Wanneer deze voorraad uitgeput raakt, beginnen de bacteriën eiwitten te consumeren met vorming van basische metabolieten waardoor de pH terug lichtjes stijgt.

De kleine variaties tussen de curves onderling kunnen niet gecorreleerd worden met de equolproductie. Het pH-profiel van het medium met acetaat, waar de equolproductie werd geïnhibeerd, wek niet significant af van de andere media.

2.3.4. Celdensiteit

De verschillende media werden dagelijks uitgeplaat om een groeicurve te kunnen opstellen. Er was zoals verwacht achtereenvolgens een exponentiële, een stationaire en een afstervingsfase te onderscheiden. De curven toonden onderling geen significante verschillen. De verschillende groeimedia hebben blijkbaar geen invloed op de totale anaërobe groei. Er werd bijgevolg ook geen link waargenomen tussen de groei en de equolvorming.

Met deze methode wordt er echter enkel informatie verkregen over het totaal aantal bacteriën. Het consortium werd geïsoleerd op basis van opeenvolgende uitplatingen. Tijdens de isolatie kwamen de vier soorten bacteriën echter in sterke associatie met elkaar voor (vier species in één kolonie) waardoor bepaalde componenten kunnen uitgewisseld worden en een gunstig medium kan gecreëerd worden. De uitplaatbaarheid van het volledig consortium impliceert dus niet dat elke soort op zich uitplaatbaar is. Daarom moet rekening gehouden worden met

eventuele niet uitplaatbare bacteriën (non-culturables) en bovendien levert de methode geen informatie over de onderlinge verhouding van de bacteriën. Daardoor kan niet uitgesloten worden dat onder bepaalde omstandigheden (bijvoorbeeld in aanwezigheid van acetaat) de drie andere bacteriën selectief kunnen bevoordeeld worden ten opzichte van de equolproducerende bacterie waardoor het aandeel van deze bacterie in het consortium afneemt, met een inhibitie van de equolproductie tot gevolg. De bovenstaande verklaringen (zie 2.3.1.) lijken echter logischer aangezien acetaat de groei van bacteriën normaalgezien niet beïnvloedt. Het kan echter ook zijn dat niet het aantal beïnvloed wordt, maar wel het metabolisme.

2.4. Het belang van de waterstofconcentratie

In het vorige experiment werd de volledige headspace met waterstof gevuld. Hier werd nagegaan of ook lagere concentraties waterstof een bevorderend effect uitoefenen. Er was enkel een significante invloed van waterstof merkbaar vanaf 1% waterstof. Lagere concentraties in de gasfase hadden nagenoeg geen impact omwille van de lage oplosbaarheid van waterstof in het medium.

Aan de hand van de Henri constante kan de concentratie waterstof in de vloeistoffase bij de verschillende experimentele omstandigheden berekend worden (Tabel 14):

$$H = c_g/c_w$$

$$\begin{aligned} m_t &= m_w + m_g \\ &= c_w \cdot v_w + c_g \cdot v_g \\ &= (v_w + H \cdot v_g) \cdot c_w \end{aligned}$$

$$\Rightarrow c_w = m_t / (v_w + H \cdot v_g)$$

met H = Henri constante (dimensieloos) = 51,25 bij 1 atm en 20°C

m_t = geïnjecteerde massa H_2 bij 1 atm en 20°C

m_w = massa H_2 in de waterfase

m_g = massa H_2 in de gasfase

v_w = volume van de vloeistoffase = 20 mL

v_g = volume van de gasfase = 100 mL

c_w = waterstofconcentratie in de vloeistoffase

c_g = waterstofconcentratie in de gasfase

$$m_t = \frac{p \cdot V}{R \cdot T} \cdot MW$$

met $p = 10^5$ Pa,

$R = 8,31$ J/(mol.K),

$T = 293$ K

V = volume geïnjecteerd H_2 (mL) bij de verschillende experimentele omstandigheden

$MW = 2$ g/mol

Tabel 14 Berekening van de geïnjecteerde massa waterstof (m_t , in g) en de waterstofconcentratie in de vloeistoffase (c_w , in mg/L) bij 1 atm en 20°C

Proefopzet	ppmV H_2	volume H_2 (mL)	m_t (g)	c_w (mg/L)
1	0	0	0	0
2	1000	0,1	$8,2 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
3	10000	1	$8,2 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$
4	100000	10	$8,2 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-1}$
5	1000000	100	$8,2 \cdot 10^{-3}$	1,6

De oplosbaarheid van waterstof bij 20°C en 1 atm is 1,6 mg/L, wat overeenkomt met de proefopzet waarbij de headspace volledig gevuld werd met waterstof (Tabel 14). Dit toont aan dat een hoge waterstofconcentratie in de vloeistoffase essentieel is voor een optimale equolproductie. Wanneer de waterstofconcentratie in het medium afweek van de oplosbaarheid werd de equolproductie vertraagd en bij een reductie van de waterstofconcentratie met meer dan 2 log-eenheden, werd er na 7 dagen slechts een verwaarloosbare hoeveelheid equol gedetecteerd.

Om continue diffusie van de gasfase naar de vloeistoffase te bekomen, is een voldoende waterstofspanning vereist. De overgang naar de gasfase kan echter bevorderd worden door agitatie, waardoor er continu nieuw waterstof met de vloeistoffase in contact komt. In dit experiment werden de flesjes dagelijks geschud tijdens de staalname. In de dikke darm daarentegen, is er een continue beweging bij voedseltoegang waardoor reeds kleinere concentraties waterstof de equolproductie kunnen bevorderen. Daarenboven wordt er door de

autochtone colonbiota op veel grotere schaal waterstof geproduceerd dan door het consortium. Dit zou *in vitro* kunnen gesimuleerd worden door de vloeistoffase continu met waterstof te doorborrelen.

2.5. Incubatie in afwezigheid van waterstof

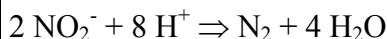
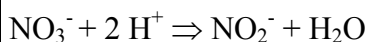
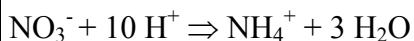
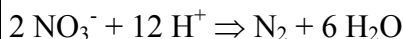
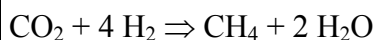
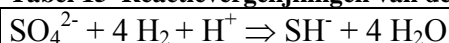
Palladium kan ongeveer 900 maal zijn eigen volume aan waterstofgas opnemen (Zumdahl, 1998). Palladium komt zowel onder de tweewaardige Pd²⁺ vorm als onder de niet-ionische Pd vorm voor. De ionische vorm, Pd²⁺, is goed oplosbaar en kan een toxisch effect uitoefenen op bepaalde micro-organismen. Pd daarentegen, lost niet op in water en vertoont bijgevolg geen toxisch effect. Daarom werd in dit experiment voor deze laatste vorm geopteerd. Dit werd nog eens geverifieerd door een groeicurve op te stellen waaruit bleek dat de niet-ionische vorm van palladium inderdaad geen toxisch effect uitoefent.

Uit de resultaten blijkt dat de vorming van dihydrodaidzeïne en equol volledig geïnhibeerd wordt in aanwezigheid van palladium. De concentratie van daidzeïne bleef, net zoals in een steriel medium, constant terwijl de concentratie bij de controle snel afnam en er reeds na vijf dagen equolvorming werd waargenomen.

In aanwezigheid van palladium wordt het gevormde waterstof normaalgezien onmiddellijk gecapteerd waardoor het niet meer beschikbaar is voor de reductie van daidzeïne. Dit experiment toont dus duidelijk de cruciale rol van waterstof bij de microbiële vorming van equol aan.

2.6. Sulfaat, nitraat en koolstofdioxide reductie

Uit de vorige experimenten bleek dat H₂ de equolproductie enorm bevordert. Waterstof wordt dus hoogstwaarschijnlijk gebruikt bij de omzetting van daidzeïne naar equol. Sulfaatreductie, methaanvorming, acetogenese en nitraatreductie in de dikke darm vergen echter ook H₂ (Tabel 15). Daarom werd in dit experiment nagegaan of het consortium in staat is om SO₄²⁻, CO₂ of NO₃⁻ te reduceren en of de toevoeging van deze electronenacceptoren een effect heeft op de equolproductie.

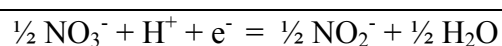
Tabel 15 Reactievergelijkingen van de reductie van sulfaat, koolstofdioxide en nitraat

Uit de resultaten van de equolanalyse blijkt dat de equolproductie niet significant beïnvloed wordt door de toevoeging van sulfaat of koolstofdioxide. In aanwezigheid van nitraat daarentegen werd, zowel bij 1 en 3 g/L, de equolvorming volledig verhinderd. Waarom nitraat zo'n nefast effect heeft op de equolproduct is niet duidelijk. Uit de IC-analyses blijkt echter dat nitraat gereduceerd werd terwijl sulfaat, dat geen invloed uitoefent op de equolvorming, niet werd gemetaboliseerd. De nitraatreducerende capaciteit kan hoogstwaarschijnlijk toegeschreven worden aan de *Veillonella*-verwante bacterie in het consortium, want er werd aangetoond dat *Veillonella parvula* zowel nitraat als fumaarzuur kan reduceren (Asanuma et al., 1999; Seeliger et al., 2002). Gedurende de reductie van nitraat tot ammoniak worden 4 mol reducerende equivalenten gebruikt (Iwamoto et al., 2002). Omwille van de overmaat waterstof in de headspace kan de inhibitie van de equolvorming echter niet te wijten zijn aan een competitie voor waterstof als electronendonor. Bij hoge nitraatconsumptie wordt nitriet echter vaak geaccumuleerd, omdat nitraatreductie vaak sneller is dan nitrietreductie tot ammoniak (Iwamoto et al., 1999). Ook in het experiment bleef een restfractie van 0,17 en 0,5 g/L nitriet over bij respectievelijk 1 en 3 g/L nitraat. Uit de groeicurven bleek echter dat het gevormde nitriet de totale anaërobe groei van het consortium niet negatief beïnvloedde. Dit sluit echter niet uit dat de equolproducerende bacterie gevoeliger kan zijn voor nitriet, waardoor het aandeel van deze bacterie in het consortium afneemt, met een inhibitie van de equolproductie tot gevolg. Zolang de bacterie/bacteriën in het consortium die verantwoordelijk is/zijn voor de equolproductie nog niet geïsoleerd is/zijn, kan dit echter niet nagegaan worden.

Een alternatieve verklaring is dat de nitraatreducerende bacterie ook verantwoordelijk kan zijn voor de vorming van equol uit daidzeïne, waarbij enkel equol gevormd wordt in afwezigheid

van nitraat. Van zodra nitraat in het medium aanwezig is, zou de betreffende bacterie dan omschakelen naar nitraatreductie in plaats van daidzeïnereductie. Er is immers reeds een vermoeden dat de *Parveilla*-verwante bacterie equol kan vormen uit daidzeïne.

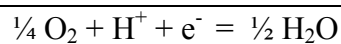
Tenslotte kan nitraat ook optreden als redoxbuffer. Van zodra nitraat aanwezig is, bedraagt de redoxpotentiaal ongeveer 400 mV (in afwezigheid van andere componenten en cysteïne) terwijl in normaal anaëroob milieu de redoxpotentiaal, afhankelijk van de aanwezige componenten, rond een waarde van -200 mV schommelt (Environmental Microbiology, 2003-2004).



$$E_h = 0,408 \text{ V}$$

Aangezien de vorming van equol uit daidzeïne, met dihydrodaidzeïne als tussenproduct, op een microbieel reductief proces wijst, zou het kunnen belemmerd worden door een te hoge redoxpotentiaal. In het BHIIa-medium dat gebruikt werd bij dit experiment zitten echter allerlei componenten, zoals cysteïne, die kunnen interfereren met de redoxpotentiaal. Maar ook in aanwezigheid van deze componenten zal de redoxpotentiaal in aanwezigheid van nitraat stijgen ten opzichte van het controlemiddel, waardoor het reductief daidzeïne metabolisme kan gehinibeerd worden.

Deze stelling werd bekrachtigd door recente experimenten waarbij werd aangetoond dat er reeds vanaf -100 mV geen equol meer wordt gevormd. Hieruit volgt ook dat de vorming van equol onder aërobe omstandigheden onmogelijk is aangezien in aanwezigheid van zuurstof de redoxpotentiaal ongeveer 800 mV bedraagt. Atkinson et al. (2004) kwam ook tot deze conclusie.



$$E_h = 0,808 \text{ V}$$

Uit de resultaten blijkt dat het equolproducerend consortium niet in staat is om SO_4^{2-} te reduceren of methaan te vormen. Dit neemt echter niet weg dat er in de dikke darm methanogene en sulfaatreducerende bacteriën kunnen voorkomen die vragende partij zijn voor waterstof. Het is echter moeilijk om de impact van deze bacteriën op de equolproductie te bestuderen. Toevoeging van deze bacteriën aan het consortium kan de equolproductie zowel onrechtstreeks beïnvloeden, via een overwoekering van de equolproducent, als rechtstreeks via competitie voor waterstof als electronendonor.

De stijging van de acetaatvorming in aanwezigheid van CO₂ in de headspace geeft een indicatie dat er een acetogene bacterie aanwezig is in het consortium. Dit resultaat moet echter (net zoals bij 2.3.2.) met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Om een sluitend bewijs te hebben over de aanwezigheid van acetogene bacteriën is immers een experiment vereist met ¹³C-gelabeld CO₂ waarbij het voorkomen van ¹³C bevattend acetaat als bewijs voor acetogenese kan genomen worden.

2.7. Duur van de equolproductie bij een eenmalige toediening van nutriënten

Het is heel bijzonder dat het consortium gedurende 3 weken in staat is om equol te vormen uit daidzeïne zonder toevoeging van extra nutriënten. Hieruit kan gesuggereerd worden dat de bacterie die verantwoordelijk is voor equolproductie waarschijnlijk energie haalt uit dit reductief proces. Hiermee kan terug een link gelegd worden naar de nitraatreducerende *Veillonella parvula* die kan groeien op een minimaal medium in aanwezigheid van nitraat en waterstof en bovendien ook energie kan halen uit dit proces. Deze bacteriën zijn immers in staat om ATP te genereren door electron transport fosforylatie (ETP) gekoppeld aan fumaarzuur reductie (Asanuma et al., 1999). Een bacterie die waterstof gebruikt om nitraat te reduceren tot ammoniak, zou in afwezigheid van nitraat misschien daidzeïne kunnen reduceren tot equol. Dit kon ook reeds uit het vorig experiment, waar enkel equol werd gevormd in afwezigheid van nitraat, gesuggereerd worden.

2.8. Invloed van een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne op de equolproductie

Sommige enzymen, die betrokken zijn in bepaalde metabolische processen, worden enkel geïnduceerd bij aanwezigheid van het uitgangproduct. Wanneer dit ook het geval zou zijn bij de enzymen betrokken in de equolvorming, zou een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne kunnen leiden tot een snellere omzetting van daidzeïne naar equol. Om dit te verifiëren werd het consortium enerzijds, zoals in de andere experimenten, opgekweekt in gewoon BHI-medium terwijl het anderzijds werd opgekweekt in medium waaraan daidzeïne werd

toegevoegd. Uit de resultaten van de HPLC-analyse bleek dat een voorafgaande blootstelling aan daidzeïne de equolvorming niet bevordert. Blijkbaar is het betrokken enzym constitutief aanwezig of wordt het onmiddellijk geïnduceerd bij aanwezigheid van daidzeïne.

In deze context werd door andere onderzoekers aangetoond dat de blootstelling van micro-organismen aan isoflavonen gedurende een volledige maand niet resulteert in een stijging van de equolproductie (Setchell et al. 2002b). Dit steunt de visie van Bowey et al. (2003) die beweerde dat het verschil in humane equolproductie het gevolg is van een verschillende bacteriële samenstelling en niet van metabolische aanpassingen van de bacteriën aan daidzeïne.

2.9. Lokalisatie van de enzymen betrokken bij de equolproductie

Enzymen kunnen zowel intracellulair als extracellulair voorkomen. Om na te gaan of de enzymen die betrokken zijn bij de reductie van daidzeïne tot dihydrodaidzeïne en equol, geëxcreteerd worden in het medium werd vers daidzeïne geïncubeerd met supernatans van een medium waarin equol werd geproduceerd.

Aangezien er noch equol noch dihydrodaidzeïne werd gevormd, kan gesuggereerd worden dat de betreffende enzymen niet, of althans niet volledig, geëxcreteerd worden in het medium. De daidzeïneconcentratie werd wel bijna gehalveerd terwijl er, zoals bleek uit het eerste controle-experiment, zonder supernatans in afwezigheid van microbiota geen afname is. Dit kan erop wijzen dat er meerdere enzymen betrokken zijn in het equolproductieproces en dat bijvoorbeeld enkel het eerste enzym wordt geëxcreteerd.

Deze resultaten dienen echter met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Het kan zijn dat er een fractie van de enzymen tijdens de filtratie op de filter is achtergebleven of dat de enzymen geïnactiveerd werden gedurende deze bewerking.

2.10. Synergisme

Het consortium bestaat uit vier bacteriën. De pogingen om de bacterie die verantwoordelijk is voor de equolvorming te isoleren waren tot nu toe echter tevergeefs. Daarom werd gesuggereerd dat de bacterie die verantwoordelijk is voor de equolvorming in synergisme leeft met de andere bacteriën in het consortium. Om na te gaan of er, naast waterstof, andere

metabolieten gevormd worden die de equolvorming bevorderen, werd steriel supernatans toegevoegd aan het medium.

Deze supplementatie leverde echter geen verschil op met de controle. Hieruit blijkt dat vooral de waterstofconcentratie (die in het supernatans wellicht niet hoger was dan in het medium bij aanvang omdat het geproduceerde waterstofgas snel verbruikt wordt in diverse metabolische processen) het equolproductieproces controleert, en de vorming van andere metabolieten een op het eerste zicht niet zo'n belangrijke rol spelen.

Er moet echter rekening gehouden worden met de complexe samenstelling van het BHIIa-medium. Daardoor kan niet worden uitgesloten dat er naast waterstof ook nog andere componenten, die van nature aanwezig zijn in dit rijk medium, geproduceerd worden door de bacteriën een cruciale rol spelen bij de vorming van equol. Dit zou kunnen nagegaan worden door te vertrekken van een minimaal medium. Hierbij zou het effect van de toevoeging van bepaalde componenten op de equolproductie kunnen beoordeeld worden, zonder interferentie van reeds aanwezige componenten zoals in BHIIa-medium.

3. Toepassing als probioticum

In de laatste fase van dit eindwerk werd onderzocht of het equolproducerend consortium zou kunnen toegepast worden als probioticum om *in vivo* de productie van equol te stimuleren.

De term probiotica, afgeleid van het Griekse 'voor leven', werd oorspronkelijk gebruikt in de jaren zestig om stoffen te beschrijven, geproduceerd door één micro-organisme, die de groei van een ander micro-organisme stimuleren. Het was aldus de tegenpool voor antibiotica. De definitie van probiotica heeft sinds die tijd een lange weg afgelegd en is een aantal maal herzien. De huidige, in de literatuur algemeen aanvaarde definitie, beschrijft probiotica als 'een product of preparaat dat levende, gedefinieerde micro-organismen bevat in voldoende aantallen, die de microbiota in een compartiment van de gastheer beïnvloeden door implantatie of kolonisatie en daardoor gunstige effecten uitoefenen op de gezondheid van deze gastheer' (Schrezenmeir & De Vrese, 2001).

Het doel van probiotica is hoofdzakelijk om via voedsel gezondheidsaspecten van de gastheer te verbeteren door in te spelen op het complex evenwicht van de darmbiota. Om dergelijk effect te bekomen is het uiteraard van essentieel belang dat de opgenomen bacteriën levend

het colon bereiken. Een probiotische stam moet dus sterk genoeg zijn om weerstand te bieden aan diverse obstakels, zoals maagzuur, galzouten en concurrentie met andere bacteriën. Daarom werd nagegaan of het equolproducerend consortium resistent is tegen maagzuur en galzouten en of het nog in staat is om equol te vormen in het bijzijn van autochtone colonbiota.

De capaciteit van FOS om als prebioticum via de voeding de equolproductie te moduleren werd ook beoordeeld. Deze componenten zouden dan eventueel kunnen gecombineerd worden met de equolproducerende biota tot een synbioticum.

Tenslotte werd, met het oog op de praktische implementatie, nagegaan of het consortium na lyofilisatie nog in staat is om equol te vormen.

3.1. Equolproductie in aanwezigheid van autochtone colonmicrobiota

Het concurrentievermogen ten opzichte van andere darmbiota werd beoordeeld door na te gaan of er nog steeds equolproductie is wanneer de equolproducerende bacteriën geïncubeerd worden in combinatie met autochtone darmbiota.

Uit de resultaten blijkt dat zelfs wanneer slechts 1 % van het consortium gecombineerd werd met 99 % autochtone colonbiota, er na 2 dagen al equol werd gevormd. De combinatie met de faecale culturen ging bovendien gepaard met een snellere equolvorming, wat kan wijzen op een synergisme. De grote variëteit aan bacteriën in de faecale stalen kan immers een snellere waterstofgeneratie en daling van de redoxpotentiaal omvatten, waardoor de reductie van daidzeïne tot equol bevorderd wordt.

Bij de interpretatie van deze resultaten moet er wel rekening gehouden worden met het feit dat de autochtone colonmicrobiota acetogene, methanoge of sulfaatreducerende bacteriën kan bevatten die waterstof verbruiken. Vooral de sulfaatbeschikbaarheid blijkt een sleutelrol te spelen in het waterstofverbruik. Sulfaatreducerende bacteriën zijn immers in staat om de partiële druk van waterstof te verlagen tot een niveau waarbij acetogene, methanogene en vermoedelijk ook de equolproducerende bacteriën niet meer efficiënt kunnen concurreren. Dit

proces kan natuurlijk enkel doorgaan wanneer voldoende sulfaat beschikbaar is. Daarom zou het relevant zijn om deze test nog eens uit te voeren in aanwezigheid van sulfaat om na te gaan of er interferentie is met de equolproductie. Daarnaast zou ook nog een experiment kunnen uitgevoerd worden waarbij CO₂ wordt toegevoegd om de impact van eventuele acetogene of methanogene bacteriën te beoordelen.

Slechts 1 faecaal staal, namelijk BP06, was in staat om *O*-DMA te vormen uit daidzeïne. Aangezien *O*-DMA en equol uit dezelfde precursor gevormd worden, werd in combinatie met BP06 minder equol gevormd in vergelijking met de andere faecale culturen (Fig. 46). Bij de zuivere BP06-cultuur werd al het daidzeïne omgezet tot *O*-DMA. De concentratie *O*-DMA daalde en de equolconcentratie steeg naarmate de verhouding van het consortium t.o.v. BP06 toenam. Vanaf een verhouding van 75% van het consortium t.o.v. 25% van de BP06-cultuur werd geen *O*-DMA meer gevormd. Rafii et al. (2003) waren de eerste onderzoekers die een *in vitro* productie van zowel *O*-DMA als van equol konden aantonen bij incubatie van micro-organismen van een zelfde individu.

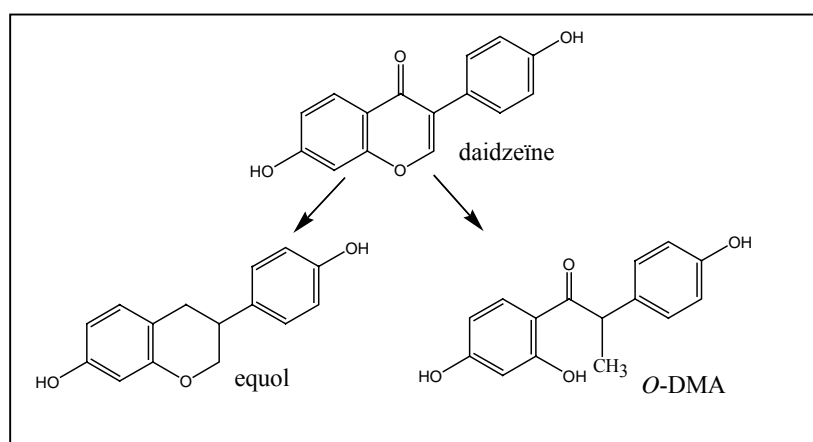


Fig. 46 Omzetting van daidzeïne naar equol en *O*-DMA

Kelly et al. (1995) en Arai et al. (2000) toonden aan dat bij 80-90% van de mensen *O*-DMA kan gedetecteerd worden in de urine na sojaconsumptie. Uit experimenten van Bowey et al. (2003) bleek echter dat kiemvrije ratten, die geïnoculeerd werden met humane faecale flora van een persoon die zowel equol als *O*-DMA kon vormen, enkel equol excreteren maar geen *O*-DMA. Ratten die daarentegen werden geïnoculeerd met faecale flora van een persoon die geen equol maar wel *O*-DMA kon vormen, excreteerden wel *O*-DMA maar geen equol. Deze

resultaten suggereren dat in de aanwezigheid van equolproducerende bacteriën, de vorming van *O*-DMA uit daidzeïne onder experimentele condities kan geïnhibeerd worden. Deze bevinding is in samenspraak met het feit dat de *O*-DMA productie gevoelig afnam bij supplementatie van de BP06 cultuur met het equolproducerend consortium en dat er bij een verhouding van de BP06 cultuur t.o.v. de equolproducerende cultuur van 25% reeds geen *O*-DMA meer kon gedetecteerd worden in het medium. De redenen hiervoor zijn onduidelijk, maar het is mogelijk dat de equolvorming de groei van de *O*-DMA-producerende bacteriën kan inhiberen, of dat er een competitie is voor substraten tussen de equol- en de *O*-DMA-producerende bacteriën. Een potentiële limitatie van dit *in vitro* systeem, en ook het bovengenoemde rat model, is dus dat het niet exact het daidzeïne metabolisme in mensen weergeeft, voornamelijk in relatie tot *O*-DMA productie.

3.2. Resistentie tegen maagzuur

Vooraleer de probiotische bacteriën het darmkanaal bereiken, moeten ze eerst de passage langs de maag overleven. Daar is de excretie van maagzuur een eerste mechanisme in de verdediging tegen de meeste oraal opgenomen micro-organismen. Een probiotisch organisme dient bijgevolg een hoge zuurresistentie te bezitten.

De zuurresistentie van het equolproducerend consortium werd nagegaan door gedurende 2 uur te incuberen in aanwezigheid van maagzuur (pH 2) waarna het na neutralisatie met NaOH verder geïncubeerd werd. Uit de resultaten blijkt dat het consortium na blootstelling aan maagzuur niet meer in staat is om equol te produceren, niettegenstaande de groei niet werd geïnhibeerd. De resultaten van de uitplantingen geven echter enkel informatie over de totale groei van het consortium, waardoor een specifieke inhibitie van de groei van de equolproducerende bacterie niet kan uitgesloten worden.

3.3. Resistentie tegen galzouten

Galzouten worden in de lever gesynthetiseerd uit cholesterol en via excretie door de galblaas in een geconjugeerde vorm in de duodenum gebracht. In het colon ondergaan deze zouten een hele reeks chemische veranderingen, zoals deconjugatie, dehydroxylatie, dehydrogenatie en deglyconidatie, als gevolg van microbiële activiteit. Zowel de geconjugeerde als de

gedeconjugeerde vorm kan een antibacteriële activiteit uitoefenen (Dunne et al., 2001). Daarom is de resistentie tegen galzouten van micro-organismen in een probioticum essentieel om levend het colon te kunnen bereiken.

De concentratie van de galzouten in het gastrointestinaal systeem kan enorm variëren. De excretiesnelheid en de concentratie van gal in de verschillende regio's van de darm wordt voornamelijk beïnvloed door het type voedsel dat geconsumeerd wordt (Mosilhey, 2003). Davenport (1977) rapporteerde dat gedurende het eerste uur na voedselopname galzouten een concentratie van 2% kunnen bereiken in de dunne darm. Daarna daalt deze concentratie tot ongeveer 0,5% na 2 uur. Een exacte voorspelling van de galzouten concentratie in de darm op een gegeven moment is echter onmogelijk.

In het experiment werd de tolerantie nagegaan door incubatie van het consortium in aanwezigheid van 0,5% galzouten. Uit de resultaten blijkt dat galzouten zowel de equolproductie als de groei van de bacteriën inhiberen. Deze resultaten moeten echter wel met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden, aangezien de incubatietijd van 14 dagen veel langer is dan de werkelijke contacttijd van 6 uur met galzouten *in vivo*. De snelle afdoding en de geringe daidzeïne afbraak gedurende de eerste dagen wijst enigszins wel op de geringe tolerantie van de equolproducerende bacteriën. Om een idee te krijgen over het impact van de galzouten gedurende de eerste zes uren, zou men dit experiment kunnen herhalen waarbij gedurende elk uur 1 mL van het geïncubeerd consortium wordt overgebracht in 50 mL vers BHIa-medium zonder galzouten. Door het verdunningseffect wordt de invloed van de galzouten geminimaliseerd gedurende de daaropvolgende incubatie. Van deze stalen, die van 1 tot 6 uur werden blootgesteld aan galzouten, zou dan vervolgens de equolproductie en groeikinetiek kunnen worden beoordeeld.

De geringe tolerantie voor maagzuur en galzouten sluit een eventueel gebruik als probioticum echter niet uit aangezien dit kan omzeild worden door een aangepaste toedieningswijze. De bacteriën kunnen bijvoorbeeld ingekapseld worden in een twee-lagig systeem waarbij de buitenste laag bij passage door de maag door maagzuur wordt opgelost terwijl de binnenste laag daarna door enzymen in de dunne darm gehydrolyseerd wordt. Daardoor komen de bacteriën niet meer in contact met maagzuur en worden ze pas op het einde van de dunne darm vrijgesteld, wat ook de blootstelling aan galzouten gevoelig inkort. De Boever et al. toonden in 2001 aan dat de supplementatie met sojakiempoeder het schadelijk effect van galzouten kan reduceren. Dit is waarschijnlijk te danken aan het feit dat de saponines in soja

gemengde micellen kunnen vormen met galzouten (Slavin et al., 1999). Via een combinatie van inkapseling en supplementatie met sojakiempoeder zou het consortium levend de dikke darm kunnen bereiken, om zo de equolproductie bij de gastheer te stimuleren.

3.4. FOS als prebioticum

Fructo-oligosacchariden zijn natuurlijke voedsel ingrediënten die in tal van plantensoorten voorkomen, waar ze als energiereserve fungeren (Niness, 1999). Ze bestaan uit lineaire ketens van glucose- en fructosemoleculen (fructosepolymeren met één glucosemolecule op de finale plaats), verbonden door $\beta(2-1)$ bruggen. Deze binding kan, in tegenstelling tot de $\alpha(1-2)$ verbindingen, niet gesplitst worden door de intestinale enzymen die normaal gezien vlot koolhydraten hydrolyseren. Daardoor bereiken de FOS intact het colon. Daar worden ze, samen met andere vezels, door de colonbiota gefermenteerd met productie van korte-ketenvetzuren die energie leveren (acetaat, butyraat, propionaat en lactaat) (Jenkins et al., 1999).

Omwille van de werking op de darmbiota worden FOS als prebiotica geklasseerd. Een prebioticum wordt omschreven als een niet-verteerbaar voedingsingrediënt dat selectief de groei of de activiteit van gunstige colonbiota bevordert waardoor pathogene bacteriën minder ontwikkelingskansen hebben (Gibson & Roberfroid, 1995).

Tegen de verwachting in, bleken FOS de vorming van zowel equol en dihydrodaidzeïne als *O*-DMA te inhiberen. De verklaring hiervoor is onduidelijk. De inhibitie van de equol en *O*-DMA vorming kan mogelijk verklaard worden door het feit dat FOS misschien ook de groei van lactobacilli, die immers nauwverwant zijn aan bifidobacteriën, stimuleert ten nadele van de bacteriën die instaan voor equol of *O*-DMA vorming. Ook Steer & Gibson (2002) constateerden dat zowel het aantal bifidobacteriën als het aantal lactobacilli significant ($P < 0,01$) stijgen in aanwezigheid van FOS. Deze onderzoekers toonden bovendien aan dat het isoflavonen metabolisme werd geremd wanneer FOS werden toegevoegd. De concentratie aan β -glucosidase geproduceerd door de bifidobacteriën en lactobacilli steeg aanzienlijk in aanwezigheid van FOS, wat de hydrolyse van de geconjugeerde isoflavonen tot de aglyconen bevordert. Nadien werd er echter geen significante daling van deze aglyconen waargenomen wat er op kan wijzen dat de bacteriën die verantwoordelijk zijn voor het isoflavonen

metabolisme in aanwezigheid van FOS overgroeid worden door de bifidobacteriën en lactobacilli. (Steer & Gibson, 2002).

Deze bevindingen zijn in contrast met de resultaten van Ohta et al. (2002) die aantoonde dat de equolproductie bij ratten een sterke stijging vertoonde in combinatie met FOS. Hij suggereerde dat bifidobacteriën een rol spelen bij de equolvorming omdat FOS de groei van bifidobacteriën in het intestinale kanaal stimuleert (bifidogene factor). Er moet bij dit experiment echter wel rekening gehouden worden met het feit dat ratten, in tegenstelling tot mensen, heel efficiënte equolproducenten zijn. De grote interindividuele variabiliteit in equolproductie is waarschijnlijk uniek voor mensen. Daardoor kan de relevantie van experimenten met ratten voor onderzoek over het humane metabolisme van isoflavonen in vraag gesteld worden.

3.5. Mogelijkheid tot vriesdrogen

Zowel met het oog op de efficiënte bewaring als op de praktische implementatie, werd nagegaan of de potentiële probiotische cultuur na lyofilisatie nog in staat is om equol te vormen. Vriesdrogen is een populaire bewaringsmethode voor micro-organismen omdat het een lange bewaring van de cultuur en een gemakkelijke distributie toelaat. Als de cellen het vriesdroogproces overleven en als men een concentratie van 10^6 - 10^{10} cellen / mL heeft voor het proces, dan kan de leefbaarheid van de stam voor meer dan 20 jaar onderhouden worden. Sommige gelyofiliseerde stammen waren zelfs na 35 jaar nog actief (Miyamoto-Shinohara et al., 2000). De efficiëntie is echter stamafhankelijk en de heropgroei van de stammen na de behandeling kunnen mislukken (Parthuisot et al., 2003). Ook het cultuurmedium blijkt een effect op de slaagkansen uit te oefenen (Carvalho et al., 2003).

Uit het experiment blijkt dat de equolproductie-capaciteit van het consortium niet verloren gaat tijdens het lyofilisatieproces. Uit de equolanalyse blijkt echter dat het tijdstip waarop het consortium wordt gelyofiliseerd cruciaal is om een optimale equolproductie te behouden. In het geval waarbij het consortium na 2 dagen werd gelyofiliseerd werd er sneller equol gevormd in vergelijking met een lyofilisatie na 5 dagen. Na 2 dagen waren de bacteriën waarschijnlijk nog in een exponentiële groeifase terwijl de groei na 5 dagen vermoedelijk al stationair was. Uit deze bevindingen kan dus gesuggereerd worden dat het consortium best gevriesdroogd

wordt tijdens de fase waarbij exponentiële groei optreedt om een optimale equolproductie te waarborgen. Tijdens de exponentiële fase is er immers netto groei, terwijl de groei bij de stationaire fase geneutraliseerd wordt door afsterving.

Niet alleen met het oog op bewaring maar ook voor praktische toepassing als probioticum biedt de mogelijkheid tot vriesdrogen een enorm voordeel. Een gevriesdroogde cultuur kan immers zonder probleem ingekapseld worden. De inkapselingstechniek met een tweelagig systeem (zie 3.3.) zou een geschikte formulatie moeten vormen die een optimale activiteit van de micro-organismen *in vivo* waarborgt. Microcapsules kunnen immers toegediend worden aan zuivelproducten, maar ook aan allerlei droge voedingswaren.

4. Conclusies

Het equolproducerend consortium bestaat uit 4 bacteriën: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus mucosae*, *Finegoldia magna* en een *Veillonella*-verwante bacterie. Tot op heden waren de pogingen om *in vitro* equol te produceren met de afzonderlijke geïsoleerde species weinig succesvol. *Lactobacillus mucosae* en *Enterococcus faecium* blijken echter niet competitief te zijn onder de experimentele omstandigheden aangezien deze melkzuurbacteriën niet konden geïdentificeerd worden via de kloneringsmethode. Daarom kan gesuggereerd worden dat ofwel *Finegoldia magna* ofwel de *Veillonella*-verwante bacterie waarschijnlijk verantwoordelijk is voor de vorming van equol. Een samenwerking van meerdere bacteriën kan echter ook niet uitgesloten worden.

Uit de tweede fase van dit werk blijkt dat waterstof cruciaal is bij de equolproductie. De vorming van equol uit daidzeïne, met dihydrodaidzeïne als tussenproduct, wijst immers op een reductief proces waarbij waterstof wordt verbruikt. Ook het inhiberend effect van nitraat is een relevant gegeven dat kan helpen bij het ophelderen van de pathway. Enerzijds kan gesuggereerd worden dat de verantwoordelijke equolproducerende bacterie misschien nitraat kan reduceren in aanwezigheid van deze electronenacceptor, terwijl ze in afwezigheid ervan waterstof kan gebruiken om daidzeïne te reduceren tot equol. Anderzijds stijgt de redoxpotentiaal in aanwezigheid van nitraat waardoor het reductief equolproductie proces kan geïnhibeerd worden. Ook het vermogen om, zonder toevoeging van extra nutriënten, gedurende 3 weken equol te vormen, is een opmerkelijk resultaat. Hieruit blijkt immers dat de

verantwoordelijke bacteriën geen rijk medium nodig hebben om equol te vormen en misschien zelfs energie kunnen halen uit deze reactie. Hier kan een link getrokken worden met nitraat reducerende of acetogene bacteriën omdat deze eveneens in staat zijn om waterstof te gebruiken om nitraat of CO₂ te reduceren en ook kunnen groeien op minimale media.

Uit de derde fase bleek dat de competitieve eigenschappen van het consortium een toepassing als probioticum mogelijk maken. De equolproductie werd zelfs bevorderd in aanwezigheid van autochtone colonmicrobiota. Bovendien biedt de mogelijkheid tot lyofilisatie heel wat voordelen voor zowel bewaring als toepassingsmogelijkheden van het consortium. Inkapseling van de gevriesdroogde cultuur zou de bacteriën immers kunnen beschermen tegen maagzuur en galzouten. Op deze manier zouden de probiotische cultuur het colon intact kunnen bereiken om de humane equolproductie te stimuleren.

5. Toekomstig onderzoek

De karakterisatie van de invloedsfactoren in dit werk leidt tot relevante kennis omtrent het equolproducerend consortium die zal kunnen worden aangewend bij de opheldering van de pathway en de verdere isolatie van de verantwoordelijke bacteriële species. Eenmaal de optimale omstandigheden voor equolproductie gekend zijn, kan er immers onder gerichte voorwaarden gewerkt worden waarbij deze bacteriën bevoordeeld worden.

Tot op heden zijn er nog heel wat tegenstrijdigheden in de literatuur omtrent de rol van de voeding bij de humane equolproductie. De problematiek rond de interindividuele variabiliteit in equolproductie en de link met de voeding zou echter in een grootschalig *in vivo* experiment kunnen benaderd worden aan de hand van de analyse van humane faecale en urinestalen en voedingsenquêtes. Equolvorming na inname van daidzeïne kan immers eenvoudig geanalyseerd worden in de urine via HPLC. Vervolgens zou de microbiële samenstelling en activiteit van faecale stalen afkomstig van een aantal equolproducenten en een aantal niet-producenten kunnen geanalyseerd worden via moleculaire technieken. De cumulatieve data van het dieet, de bacteriële samenstelling en activiteit kunnen een licht werpen op de relatie tussen de voeding, de colonmicrobiota en de equolproductiecapaciteit. De rol van het microbiële spectrum en de voeding bij de equolproductie zou zo kunnen beoordeeld worden.

Het consortium biedt de mogelijkheid om enerzijds toegepast te worden voor de *in vitro* productie van equol en anderzijds om de *in vivo* productie van equol te stimuleren. De beoordeling van de slaagkansen van het consortium als probioticum in dit werk zou echter verder kunnen uitgediept worden aan de hand van de SHIME (Simulator van het Humaan Intestinaal Ecosysteem). De SHIME is een *in vitro* model van het menselijke gastro-intestinaal stelsel, ontwikkeld in LabMET. Het semi-continu model simuleert in vijf reactorvaten de verschillende delen van het spijsverteringsstelsel: maag en duodenum, jejunum en ileum, colon ascendens, colon transversum en colon descendens. De nadruk ligt hierbij op het microbiële ecosysteem in de verschillende regio's van het colon. Door toevoeging van een geschikt voedingsmedium en pancreassap en door controle van temperatuur, pH en retentietijd wordt op deze wijze een microbiële gemeenschap bekomen waarvan zowel de samenstelling als activiteit in grote mate overeenkomen met *in vivo* omstandigheden in de verschillende colonregio's. Tenslotte kan er gezocht worden naar een geschikte formulatie die een optimale activiteit van de micro-organismen *in vivo* waarborgt.

De cumulatieve data omtrent de invloedsfactoren, die reeds bekomen werden tijdens dit werk, en verdere extrapolatie van deze bevindingen op populatieniveau en de potentiële toepassingen ervan in de praktijk zullen kunnen gebruikt worden om de equolproductie bij de Westerse bevolking te optimaliseren waardoor mogelijks een groter deel van de populatie zal kunnen genieten van de weldadige effecten van equol.

Deel V

Geraadpleegde
literatuur

- ADAMS, N.R. (1990). Permanent infertility in ewes exposed to plant estrogens. *Australian Veterinary Journal*, 67, 197-201.
- ADLERCREUTZ, H. (1999). Phytoestrogens. State of the art. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 201-207.
- ADLERCREUTZ, H. & HAMALAINEN, E. (1992). Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *The Lancet*, 339, 1233.
- ADLERCREUTZ, H., HEIKKINEN, R., WOODS, M., FOTSIS, T., DWYER, J.T. & GOLDIN, B.R. (1982). Excretion of the lignans enterolactone & enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian post-menopausal women and in women with breast cancer. *Lancet*, 2, 1295-1299.
- ADLERCREUTZ, H., HOCKERSTEDT, C., BANNWART, C., BLOIGU, S., HAMALAINEN, E., FOTSIS, T. & OLLUS, A. (1987). Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *Journal of Steroidal Biochemistry*, 27, 1135-1144.
- ADLERCREUTZ, H., MARKKANEN, H. & WATANABE, S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *The Lancet*, 342, 1209-1210.
- ADLERCREUTZ, H. & MAZUR, W. (1997). Phytoestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29, 95-120.
- ADLERCREUTZ, H., MAZUR, W., STUMPF, K., KILKKINEN, A., PIETINEN, P., HULTEN, K. & HALLMANS, G. (2000). Food containing phytoestrogens, and breast cancer. *Biofactors*, 12, 89-93.
- AGNUSDEI, D., ZACCHEI, F., BIGAZZI, S., CEPOLLARO, C., NARDI, P., MONTAGNANI, M. & GENNARI, C. (1989). Metabolic and clinical effects of ipriflavone in established post-menopausal osteoporosis. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 15, 97-104.
- AKAZA, H., MIYANAGA, N., TAKASHIMA, N., NAITO, S., HIRAO, Y., TSUKAMOTO, T. & MITSURU, M. (2002). Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 269-300.
- AKIYAMA, T., ISHIDA, J., NAKAGAWA, S., OGAWARA, H., WATANABE, S.I., ITOCH, N., SHIBUYA, M. & FUKAMI, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 5592-5595.
- ALEKEL, D.L., GERMAIN, A., PETERSON, C.T., HANSON, K.B., STEWART, J.W. & TODA, T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 844-852.
- AN, J., TZAGARAKIS-FOSTER, C., SCHARSCHMIDT, T.C., LOMRI, N. & LEITMAN, D.C. (2001). Estrogen receptor β -selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 17808-17814.
- ANDERSON, J.J.B., ANTHONY, M., MESSINA, M. & GARNER, S.C. (1999). Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition Research Reviews*, 12, 75-116.
- ANDERSON, J.J.B. & GARNER, S.C. (1997). The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research*, 17, 1617-1632.
- ANDERSON, J.W., JOHNSTONE, B.M. & COOK-NEWELL, M.E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New English Journal of Medicine*, 333, 276-282.
- ANTHONY, M.S., BLAIR, R.M. & CLARKSON, T.B. (2002). Neither isoflavones nor the alcohol-extracted fraction added to alcohol-washed soy protein isolate restores the lipoprotein effects of soy protein isolate. *Journal of Nutrition*, 132, 583.

- ARAI, Y., UEHARA, M., SATO, Y., KIMIRA, M., EBOSHIDA, A., ADLERCREUTZ, H. & WATANABE, S. (2000). Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *Journal of Epidemiology*, 10, 127-135.
- ARJMANDI, B., ALEKEL, L., HOLLIS, B.W., AMIN, D., STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M., GUO, P. & KUKREJA, S.C. (1996). Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Journal of Nutrition*, 126, 161-167.
- ARJMANDI, B., BIRNBAUM, R., GOYAL, N., GETLINGER, M., JUMA, S., ALEKEL, L., HASLER, C., DRUM, M., HOLLIS, B. & KUKREJA, S. (1998). Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1364S-1368S.
- ARJMANDI, B., GETLINGER, M., GOYAL, N., ALEKEL, L., HASLER, C., JUMA, S., DRUM, M., HOLLIS, B. & KUKREJA, S. (1998). Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 1358S-1363S.
- ARORA, A., NAIR, M.G. & STRASBURG, G.M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356, 133-141.
- ASAHI, M., YANAGI, S., OHTA, S., INAZU, T., SAKAI, K., TAKEUCHI, F., TANIGUCHI, T. & YAMAMURA, H. (1992). Thrombin-induced human platelet aggregation is inhibited by protein-tyrosine kinase inhibitors, ST638 and genistein. *FEBS letters*, 309, 10-14.
- ASANUMA, N., IWAMOTO, M. & HINO, T. (1999). Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganism *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 82, 780-787.
- ATKINSON, C. BERMAN, S. HUMBERT, O. & LAMPE, J.W. (2004). In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *Journal of Nutrition*, 134, 596-599.
- ATKINSON, C., SKOR, H.E., FITZGIBBONS, E.D., SCHOLE, D., CHEN, C., WAHALA, K., SCHWARTZ, S.M. & LAMPE, J. W. (2003). Urinary equol excretion in relation to 2-hydroxyestrone and 16 α -hydroxyestrone concentrations: an observational study of young to middle-aged women. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86, 71-77.
- AXELSON, M., KIRK, D.N., FARRANT, R.D., COOLEY, G., LAWSON, A.M. & SETCHELL, K.D.R. (1982). The identification of the weak estrogen equol (7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman) in human urine. *Biochemical journal*, 201, 353-357.
- AXELSON, M., SJOVALL, J., GUSTAFSSON, B.E. & SETCHELL, K.D.R. (1984). Soya, a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *Journal of endocrinology*, 102, 49-56.
- BADGER, T.M., RONIS, M.J.J., HAKKAK, R., ROWLANDS, J.C. & KOROURIAN, S. (2002). The health consequences of early soy consumption. *Journal of Nutrition*, 132, 559S-565S.
- BARKHEM, T., CARLSSON, B., NILSSON, Y., ENMARK, E., GUSTAFSSON, J. & NILSSON, S. (1998). Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists / antagonists. *Molecular Pharmacology*, 54, 105-112.
- BARNES, S. (2003). Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose? *British Journal of Nutrition*, 89, 101-108.
- BENNETTS, H.W., UNDERWOOD, E.J. & SHIER, E.J. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, 22, 2-12
- BENYACOB, J., CZARNECKI-MAULDEN, G.L., CAVADINI, C., SAUTHIER, T., ANDERSON, R.E., SCHIFFRIN, E.J. & VON DER WEID, T. (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition*, 133, 1158-1162.

- BHATHENA, S.J. & VELASQUEZ, M.T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1191-1201.
- BLAIR, R.M, APPT, S.E., FRANKE, A.A. & CLARKSON, T.B. (2003). Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys. *Journal of Nutrition*, 133, 2262-2267.
- BOKER, L.K., VAN DER SCHOUW, Y.T., DE KLEIJN, M.J.J., JACQUES, P.F., GROBBEE, D.E. & PEETERS, P.H.M. (2002). Intake of dietary phytoestrogens by dutch women. *Journal of Nutrition*, 132, 1319-1328.
- BOKKENHEUSER, V.D., SUZUKI, J.B. POLOVSKY, S.B., WINTER, J. & KELLY, W.G. (1975). Metabolism of deoxycorticosterone by human fecal flora. *Applied Microbiology*, 30, 82-90.
- BOON, N., MARLE, C., TOP, E.M. & VERSTRAETE, W. (2000). Comparison of the spatial homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S rRNA genes in sediment samples from a dumping site for dredging sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 742-747.
- BOWEY, E., ADLERCREUTZ, H. & ROWLAND, I. (2003). Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 631-636.
- BREZNAK, J.A. & KANE, M.D. (1990). Microbial H₂/CO₂ acetogenesis in animal guts: nature and nutritional significance. *FEMS Microbiological Revue*, 87, 307-314.
- BRZEZINSKI, A., ADLERCREUTZ, H., SHAOUL, R., ROSLER, A., SHMUELI, A., TANOS, V. & SCHENKER, J.G. (1997). Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal women. *Menopause*, 4, 89-94.
- CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X. & GIBBS, P. (2002). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 947-952.
- CASSIDY, A., BINGHAM, S. & SETCHELL, K.D.R. (1994). Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 333-340.
- CASSIDY, A., BINGHAM, S. & SETCHELL, K.D.R. (1995). Biological effects of isoflavones in young women – importance of the chemical composition of soybean products. *British Journal of Nutrition*, 74, 587-601.
- CHANG, Y.C. & NAIR, M.G. (1995). Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *Journal of Natural Products*, 58, 1892-1896.
- CHIN-DUSTING, J.P.F., FISHER, L.J., LEWIS, T.V., PIEKARSKA, A., NESTEL, P.J. & HUSBAND, A. (2001). The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role. *British Journal of Pharmacology*, 133, 595-605.
- CHRISTL, S.U., GIBSON, G.R. & CUMMINGS, J.H. (1992). Role of dietary sulphate in the regulation methanogenesis in the human large intestine. *Gut*, 33, 1234-1238.
- CLARKSON, T.B. (2002). Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 132, 566-569.
- COLDITZ, G.A. (1999). Hormones and breast cancer : evidence and implications for consideration of risks and benefits of hormone replacement therapy. *Journal of womens health*, 8, 347-357.
- COWARD, L., BARNES, N.C., SETCHELL, K.D.R. & BARNES, S. (1993). Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates-antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1961-1967.

- CROUSE, J.R., MORGAN, T., TERRY, J.G., ELLIS, J., VITOLINS, M. & BURKE, G. (1999). A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Archives of Internal Medicine*, 159, 2070-2076.
- CUMMINGS, J.H. (1997). The large intestine in nutrition and disease. Brussel, Instituut Danone, 149 p.
- CUMMINGS, J.H. & MACFARLANE, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 443-459.
- DALU, A., HASKELL, J.F., COWARD, L. & LAMARTINIERE, C.A. (1998). Genistein, a component of soy, inhibits the expression of the EGF and ErbB2/Neu receptors in the dorsolateral prostate. *Prostate*, 37, 36-43.
- DAVENPORT, H.W. (1977). Physiology of the digestive tract. Chicago, Year Book Medical Publishers Incorporated, 232.
- DAY, A.J., DUPONT, M.S. & SAXON RIDLEY, S. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver and β -glucosidase activity. *FEBS letters*, 436, 71-75.
- DE BOEVER, P., WOUTERS, R. & VERSTRAETE, W. (2001). Combined use of *Lactobacillus reuteri* and soygerm powder as food supplement. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 420-424.
- DE KLEIJN, M.J.J., VAN DER SCHOUW, Y.T., WILSON, P.W.F., GROBBEE, D.E. & JACQUES, P.F. (2001). Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women : the Framingham study. *Journal of Nutrition*, 132, 276-282.
- DUNCAN, A.M., MERZ-DEMLOW, B.E., XU, X., NAGEL, T.C., PHIPPS, W.R. & KURZER, M.S. (1999). Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 192-197.
- DUNCAN, A.M., MERZ-DEMLOW, B.E., XU, X., PHIPPS, W.R. & KURZER, M.S. (2000). Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, 581-586.
- DUNNE, C., O'MAHONY, L., MURPHY, L., THORNTON, G., MORRISSEY, D., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., FLYNN, S., FITZGERALD, G., DALY, C., KIELY, B., O'SULLIVAN, G., SHANAHAN, F. & COLLINS, K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin : correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 368-392.
- DURANT, J.A., NISBET, D.J. & RICKE, S.C. (1997). Comparison of batch culture growth and fermentation of a poultry *Veillonella* isolate and selected *Veillonella* species grown in a defined medium. *Anaerobe*, 3, 391-397.
- FANARO, S., CHIERICI, R., GUERRINI, P. & VIGI, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy : composition and development. *Acta Paediatrica*, 92, 48-55.
- FOOKS, L.J. & GIBSON, G.R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88, 39S-49S.
- FOTSIS, T., PEPPER, M., ADLERCREUTZ, H., FLEISCHMANN, G., HASE, T., MONTESANO, R. & SCHWEIGERER, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 90, 2690-2694.
- FRITZ, W.A., COWARD, L., WANG, J. & LAMARTINIERE, C.A. (1998). Dietary genistein : perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 2151-2158.
- FUJIO, Y., YAMADA, F., TAKAHASHI, K. & SHIBATA, N. (1993). Responses of smooth muscle cells to platelet-derived growth factor are inhibited by herbimycin-A tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195, 79-83.
- GENNARI, C., AGNUSDEI, D., CREPALDI, G., ISAIA, G., MAZZUOLI, G., ORTOLANI, S., BUFALINO, L. & PASSERI, M. (1998). Effect of ipriflavone - a synthetic derivative of natural isoflavones - on bone mass

loss in the early years after menopause. *Menopause – The Journal of the North American Menopause Society*, 5, 9-15.

GIBSON, G.R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 769-797.

GIBSON, G.R., CUMMINGS, J.H. & MACFARLANE, G.T. (1988). Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulphate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2750-2755.

GIBSON, G.R., MACFARLANE, G.T. & CUMMINGS, J.H. (1993). Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut*, 34, 437-439.

GIBSON, G.R. & ROBERFROID, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.

GOMES, A.M.P. & MALCATA, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 139-157.

GUTIERREZ DE FERRO, M.I., RUIZ DE VALLADARES, R.E. & BENITO DE CARDENAS, I.L. (1999). Physiological aspects and conservation of a *Veillonella* strain isolated from the oral cavity. Interaction with streptococci. *Anaerobe*, 5, 255-259.

HELMESTE, D.M. & TANG, S.W. (1995). Tyrosine kinase inhibitors regulate serotonin uptake in platelets. *European Journal of Pharmacology*, 280, R5-R7.

HODGSON, J.M., CROFT, K.D., PUDDEY, I.B., MORI, T.A. & BEILIN, L.J. (1996). Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 664-669.

HODGSON, J.M., PUDDEY, I.B., BEILIN, L.J., MORI, T.A., BURKE, V., CROFT, K.D. & ROGERS, P.B. (1999). Effects of isoflavonoids on blood pressure in subjects with high-normal ambulatory blood pressure levels : a randomized controlled trial. *American Journal of Hypertension*, 12, 47-53.

HODGSON, J.M., PUDDEY, I.B., BEILIN, L.J., MORI, T.A. & CROFT, K.D. (1998). Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations : a randomized controlled trial in humans. *Journal of Nutrition*, 128, 728-732.

HOLZAPFEL, W.H., HUBERER, P., GEISEN, R., BJORKROTH, J. & SCHILLINGER, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365-373.

HONORE, E.K., WILLIAMS, J.K., ANTHONY, M.S. & CLARKSON, T.B. (1997). Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertility and Sterility*, 67, 148-154.

HUR, H.G., LAY, J.O., BEGER, R.D., FREEMAN, J.P. & RAFII, F. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Archives of Microbiology*, 174, 422-428.

HWANG, J., WANG, J., MORAZZONI, P., HODIS, H.N. & SEVANIAN, A. (2003). The phytoestrogen equol increases nitric oxide production; an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 1271-1282.

INGRAM, D., SANDERS, K., KOLYBABA, M. & LOPPEZ, D. (1997). Case-control study of phyto-estrogens and breast cancer. *Lancet*, 350, 990-994.

IWAMOTA, M., ASANUMA, N. & HINO, T. (2002). Ability of *Selenium ruminantium*, *Veillonella parvula* and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe*, 8, 209-215.

- IWAMOTA, M., ASANUMA, N. & HINO, T. (1999). Effect of nitrate combined with fumarate on methanogenesis, fermentation, and cellulose digestion by mixed ruminal microbes *in vitro*. *Animal Science*, 70, 471-478.
- JENKINS, D.J.A., KENDALL, C.W.C. & VUKSAN, V. (1999). Inulin, oligofructose and intestinal function. *Journal of Nutrition*, 129, 1431-1433.
- JOANNOU, G.E., KELLY, G.E., REEDER, A.J., WARING, M. & NELSON, C. (1995). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 167-184.
- KELLY, G.E., JOANNOU, G.E., REEDER, A.Y., NELSON, C. & WARING, M.A. (1995). The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 40-43.
- KIRK, E., SUTHERLAND, P., WANG, S., CHAIT, A. & LEBOEUF, R. (1998). Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 128, 954-959.
- KLARE, I., KONSTABEL, C., BADSTUBNER, D., WERNER, G. & WITTE, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269-290.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C. & REUTER, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103-125.
- KNIGHT, D.C. & EDEN, J.A. (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstetrics and gynecology*, 87, 897-904.
- KUIPER, G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HAGGBLAD, J. NILLSON, S. & GUSTAFSSON, J. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138, 863-870.
- KURUVILLA, A., PUTCHA, G., POULOS, E & SHEARER, W.T. (1993). Tyrosine phosphorylation of phospholipase-c concomitant with its activation by platelet-activating-factor in a human B-cell line. *Journal of Immunology*, 151, 637-648.
- KURZER, M.S. & XU, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*, 17, 353-381.
- LAMARTINIERE, C.A. (2000). Protection against cancer with genistein : a component of soy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1705-1707.
- LAMARTINIERE, C.A., COTRONEO, M.S., FRITZ, W.A., WANG, J., MENTOR-MARCEL, R. & ELGAVISH, A. (2002). Genistein chemoprevention : timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition*, 132, 552-558.
- LAMPE, J.W., KARR, S.C., HUTCHINS, A.M. & SLAVIN, J.L. (1998). Urinary equol excretion with a soy challenge : influence of habitual diet. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 217, 335-339.
- LAMPE, J.W., SKOR, H.E. & ATKINSON, C. (2002). Intestinal bacterial conversion of the soy isoflavone daidzein to equol : implications for human health. *Journal of Nutrition*, 132, 579.
- LAMPE, J.W., SKOR, H.E., LI, S., WAHALA, K., HOWALD, W.N. & CHEN, C. (2001). Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavan equol in premenopausal women. *Journal of Nutrition*, 131, 740-744.
- LECLERC, M., BERNALIER, A., DONADILLE, G. & LELAIT, M. (1997). H₂/CO₂ metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon. *Anaerobe*, 3, 307-315.

- LEE, H.P. (1991). Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*, 337, 1197-2000.
- LE MELLAY, V., GROSSE, B. & LIEBERHERR, M. (1997). Phospholipase C^β and membrane action of calcitriol and estradiol. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 11902-11907.
- LEVITT, M.D. (1971). Volume and composition of human intestinal gas determined by means of an intestinal washout technic. *The New England Journal of Medicine*, 284, 1394-1399.
- LU, L.J.W., ANDERSON, K.E., GRADY, J.J., KOHEN, F. & NAGAMANI, M. (2000a). Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Research*, 60, 4112-4121.
- LU, L.J.W, CREE, M., JOSYULA, S., NAGAMI, M. GRADY, J.J. & ANDERSON, K.E. (2000b). Increased urinary excretion of 2-hydroxyestrone but not 16 α -hydroxyestrone in premenopausal women during a soy diet containing isoflavones. *Cancer Research*, 60, 1299-1305.
- LUND, T., MUNSON, D.J., HALDY, M.E., SETCHELL, K.D.R., LEPHART, E.D. & HANDA, R.J. (2004). Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biology of Reproduction*, 70, 1188-1195.
- LYDEKING-OLSEN, E., JENSEN, J.E.B., SETCHELL, K.D.R, DAMHUS, M. & JENSEN, T.H. (2002). Isoflavone rich soymilk prevents bone-loss in the lumbar spine of postmenopausal women. A two-year study. *Journal of Nutrition*, 132, 581.
- MACFARLANE, G.T., GIBSON, G.R. & CUMMINGS, J.H. (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 57-64.
- MACFARLANE, S. & MACFARLANE, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 67-72.
- MAKELA, S., SAVOLAINEN, H., AAVIK, E., MYLLARNIEMI, M., STRAUSS, L., TASKINEN, E., GUSTAFSSON, J.A. & HAYRY, P. (1999). Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors α and β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 7077-7082.
- MARKIEWICZ, L., GAREY, J., ADLERCREUTZ, H. & GURPIDE, E. (1993). *In vitro* bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 45, 399-405.
- MARRIAN, G. & HASLEWOOD, G. (1932). Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares urine. *Biochemical Journal*, 26, 1227-1232.
- MARTEAU, P., SEKSIK, P. & JIAN, R. (2002). Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *British Journal of Nutrition*, 88, S51-S57.
- MARTIN, M.E., HAOURIGUI, M., PELISSERO, C., BENASSAYAG, C. & NUNEZ, E.A. (1995). Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sciences*, 58, 429-436.
- McKAY, L.F., EASTWOOD, M.A. & BRYDON, W.G. (1985). Methane excretion in man – a study of breath, flatus and faeces. *Gut*, 26, 69-74.
- McNICOL, A. (1993). The effects of genistein on platelet-function are due to thromboxane receptor antagonism rather than inhibition of tyrosine kinase. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 48, 379-384.
- MERZ-DEMLOW, B.E., DUNCAN, A.M., WANGEN, K.E., XU, X., CARR, T.P., PHIPPS, W.R. & KURZER, M.S. (2000). Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1462-1469.
- MESSINA, M. (1999). Legumes and soybeans : overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439S-450S.

- MESSINA, M., BARNES, S. & SETCHELL, K.D.R. (1997). Phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, 350, 971-972.
- MESSINA, M., GARDNER, C. & BARNES, S. (2002). Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go : commentary on the fourth international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease. *Journal of Nutrition*, 132, 547S-551S.
- MESSINA, M.J., PERSKY, V., SETCHELL, K.D.R. & BARNES, S. (1994). Soy intake and cancer risk – a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and Cancer - An International Journal*, 21, 113-131.
- MIKSICEK, R.J. (1993). In situ localization of the estrogen-receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *Journal of histochemistry & cytochemistry*, 41, 801-810.
- MIKSICEK, R.J. (1994). Interaction of naturally-occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen-receptor. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 49, 153-160.
- MILLER, T.L. WEAVER, G.A. & WOLIN, M.J. (1984). Methanogens and anaerobes in a colon segment isolated from the normal fecal stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 449-450.
- MILLER, T.L. & WOLIN, M.J. (1982). Oxidation of hydrogen and reduction of methanol to methane is the sole energy source for a methanogen isolated from human feces. *Journal of Bacteriology*, 153, 1051-1055.
- MITCHELL, J.H., GARDNER, P.T., McPHAIL, D.B., MORRICE, P.C., COLLINS, A.R. & DUTHIE, G.G. (1998). Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360, 142-148.
- MISUOKA, T. (1982). Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 1, 3-24.
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., IMAIZURNI, T., SUKENOBE, J., MURAKARNI, Y., KAWAMURA, S. & KOMATSU, Y. (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41, 251-255.
- MORITO, K., HIROSE, T., KINJO, J., HIRAKAWA, T., OKAWA, M., NOHARA, T., OGAWA, S., INOUE, S., MURAMATSU, M. & MASAMUNE, Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β . *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 351-356.
- MOSILHEY, S.H. (2003). Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. Doctoraatswerk, Bonn, Duitsland, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 155 p.
- MURDOCH, D.A. (1998). Gram-positive anaerobic cocci. *Clinical Microbiology Revue*, 11, 81-120.
- MURDOCH, D.A. & MITCHELMORE, I.J. (1991). The laboratory identification of gram-positive anaerobic cocci. *Journal of Medical Microbiology*, 34, 295-308.
- MURDOCH, D.A. & SHAH, H.N. (1999). *Reclassification of Peptostreptococcus magnus (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as Finegoldia magna comb. nov. and Peptostreptococcus micros (Prevot 1933) Smith 1957 as Micromonas micros comb. nov. Anaerobe*, 5, 555-559.
- MURKIES, A.L., LOMBARD, C., STRAUSS, B.J.G., WILCOX, G., BURGER, H.G. & MORTON, M.S. (1995). Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flushes – effect of soy and wheat. *Maturitas*, 21, 189-195.
- MURPHY, C.T., KELLIE, S. & WESTWICK, J. (1993). Tyrosine-kinase activity in rabbit platelets stimulated with platelet-activating-factor: the effect of inhibiting tyrosine kinase with genistein on platelet-signal-molecule elevation and functional-responses. *European journal of biochemistry*, 216, 639-651.
- MUTHYALA, R.S., YOUNG, H.J., SHENG, S., WILLIAMS, L.D., DOERGE, D.R., KATZENELLENBOGEN, B.S., HELFERICH, W.G. & KATZENELLENBOGEN, J.A. (2004). Equol, a natural

estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their different binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 1-9.

NAGATA, C., TAKATSUKA, N., KAWAKAMI, N. & SHIMIZU, H. (2001a). Original communication soy product intake and premenopausal hysterectomy in a follow-up study of Japanese women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55, 773-777.

NAGATA, C., TAKATSUKA, N., KAWAKAMI, N. & SHIMIZU, H. (2001b). Soy product intake and hot flashes in Japanese women : results from a community-based prospective study. *American Journal of Epidemiology*, 153, 790-793.

NEMERE, I. (1996). Apparent nonnuclear regulation of intestinal phosphate transport: effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₃, and 25-hydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 137, 2254-2261.

NESTEL, P.J., YAMASHITA, T., SASAHARA, T., POMEROY, S., DART, A., KOMESAROFF, P., OWEN, A. & ABBEY, M. (1997). Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17, 3392-3398.

NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J.A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation : basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Research*, 2, 360-366.

NINESS, K.R. (1999). Inulin and oligofructose : what are they ? *Journal of Nutrition*, 129, 1402-1406.

NOLLET, L., DEMEYER, D. & VERSTRAETE, W. (1996). Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 194-200.

OHTA, A., UEHARA, M., SAKAI, K., TASAKI, M., ADLERCREUTZ, H., MOROHASHI, T. & ISHIMI, Y. (2002). A combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *Journal of Nutrition*, 132, 2048-2054.

OKURA, A., ARAKAWA, H., OKA, H., YOSHINARI, T. & MONDEN, Y. (1988). Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of (VAL-12)HA-RAS-transformed NIH-3T3 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 157, 183-189.

PARTHUISOT, N., CATALA, P., LEBARON, P., CLERMONT, D. & BIZET, C. (2003). A sensitive and rapid method to determine the viability of freeze-dried bacterial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 412-417.

PETERSON, G. & BARNES, S. (1993). Genistein and biochanin-A inhibit the growth of human prostate-cancer cells but not epidermal growth-factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate*, 22, 335-345.

PICKAR, J., THORNEYCROFT, I. & WHITEHEAD, M. (1998). Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters : a review of randomized clinical trials, 1985 to 1995. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198, 178, 1087-1099.

PICOTTO, G., MASSHEIMER, V. & BOLAND, R. (1996). Acute stimulation of intestinal cell calcium influx induced by 17 β -estradiol via the cAMP messenger system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 119, 129-134.

PITT, P., DE BRUIJN, K.M., MADELEINE, F.B., GOLDBERG, E. & BLENDIS, L.M. (1980). Studies on breath methane : the effect of ethnic origins and lactulose. *Gut*, 21, 951-959.

POTTER, S.M., BAUM, J.A., TENG, H., STILLMAN, R.J., SHAY, N.F. & ERDMAN, J.W. (1998). Soy protein and isoflavones : their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1375-1379.

PUSKA, P., KORPELAINEN, V., HOIE, L.H., SKOVLUND, E., LAHTI, T. & SMERUD, K.T. (2002). Soy in hypercholesterolemia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Nutrition*, 56, 352-357.

- QUELLA, S.K., LOPRINZI, C.L., BARTON, D.L., KNOST, J.A., SLOAN, J.A., LAVASSEUR, B.I., SWAN, D., KRUPP, K.R., MILLER, K.D. & NOVOTHY, P.J. (2000). Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: a north central cancer treatment group trial. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 1068-1074.
- RAFII, F., DAVIS, C., PARK, M., HEINZE, T.M. & BEGER, R.D. (2003). Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Archives of Microbiology*, 180, 11- 16.
- RAFTER, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition*, 88, S89-S94.
- RICHELLE, M., PRIDMORE-MERTEN, S., BODENSTAB, S., ENSLEN, M. & OFFORD, E.A. (2002). Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 132, 2587-2592.
- ROWLAND, I., FAUGHNAN, M., LEANE H., WAHALA, K., WILLIAMSON, G. & CASSIDY, A. (2003). Bioavailability of phyto-oestrogens. *British Journal of Nutrition*, 89, 45-58.
- ROWLAND, I.R., WISEMAN, H., SANDERS, T.A., ADLERCREUTZ, H. & BOWEY, E.A. (2000). Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by gut flora. *Nutrition and Cancer*, 36, 27-32.
- ROWLAND, I.R., WISEMAN, H., SANDERS, T.A., ADLERCREUTZ, H. & BOWEY, E.A. (1999). Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochemical Society Transactions*, 27, 304-308.
- RUIZ-LARREA, M.B., MOHAN, A.R., PAGANGA, G., MILLER, N.J., BOLWELL, G.P. & RICE-EVANS, C.A. (1997). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free radical research*, 26, 63-70.
- SAKR, W.A., HAAS, G.P., CASSIN, B.F., PONTES, J.E. & CRISSMAN, J.D. (1993). The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *Journal of Urology*, 150, 379-385.
- SATHYAMOORTHY, N. & WANG, T. (1997). Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *European Journal of Cancer*, 33, 2384-2689.
- SCHOENE, N.W. & GUIDRY, C.A. (1999). Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 421-426.
- SCHREZENMEIR, J., & DE VRESE, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361-364.
- SCHRYVER, T. (2002). Increasing health benefits using soy germ. Cereal Foods World, 47, 185-188.*
- SEELIGER, S., JANSSEN, P.H. & SCHINK, B. (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. FEMS Microbiology Letters, 211, 65-70.*
- SETCHELL, K.D.R. (2000). Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. *Journal of nutrition*, 130, 654S-655S.
- SETCHELL, K.D.R., BROWN, N.M., DESAI, P., ZIMMER-NECHEMIAS, L., WOLFE, B.E., BRASHEAR, W.T., KIRSCHNER, A.S., CASSIDY, A. & HEUBI, J.E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*, 131, 1362S-1375S.
- SETCHELL, K.D.R., BROWN, N.M., DESAI, P.B., ZIMMER-NECHEMIAS, L., WOLFE, B.E., JAKATE, A.S., CREUTZINGER, V. & HEUBI, J.E. (2002a). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *Journal of Nutrition*, 133, 1027-1035.

SETCHELL, K.D.R., BROWN, N.M. & LYDEKING-OLSEN, E. (2002b). The clinical importance of the metabolite equol – A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132, 3577-3584.

SETCHELL, K.D.R., BROWN, N.M., ZIMMER-NECHEMIAS, L.Z., BRASHEAR, W.T., WOLFE, B.E., KIRSCHNER, A.S. & HEUBI, J.E. (2002c). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 447-453.

SETCHELL, K.D.R. & CASSIDY, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129, 758S-767S.

SETCHELL, K.D.R., ZIMMER-NECHEMIAS, L., CAI, J. & HEUBI, J.E. (1997). Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*, 350, 23-27.

SETCHELL, K.D.R., ZIMMER-NECHEMIAS, L., CAI, J. & HEUBI, J.E. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1453-1461.

SHIMIZU, H., ROSS, R.K., BERNSTEIN, L., YATANI, R., HENDERSON, B.E. & MACK, T.M. (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los-Angeles-county. *British Journal of Cancer*, 63, 963-966.

SHIMOKADO, K., UMEZAWA, K. & OGATA, J. (1995). Tyrosine kinase inhibitors inhibit multiple steps of the cell cycle of vascular smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*, 220, 266-273.

SHIMOKADO, K., YOKOTA, T., UMEZAWA, K., SASAGURI, T. & OGATA, J. (1994). Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14, 973-981.

SLAVIN, J.L., KARR, S.C., HUTCHINS, A.M. & LAMPE, J.W. (1998). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1492-1505.

SLAVIN, J.L., MARTINI, M.C., JACOBS, D.R. & MARQUART, L. (1999). Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 459S-463S.

SOMEKAWA, Y., CHIGUCHI, M., ISHIBASHI, T. & ASO, T. (2001). Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstetrics and Gynecology*, 97, 109-115.

STEER, T.E. & GIBSON, G.R. (2002). Fermentation of genistein by human gut microflora in the presence of carbohydrate or fructooligosaccharides (FOS). In: *Soy & Health 2002*. Antwerpen, Garant, 253-254.

STEGGARDA, F.R., RICHARDS, E.A. & RACKIS, J.J. (1966). Effects of various soybean products on flatulence in the adult man. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 121, 1235-1239.

STEINBERG, F.M., GUTHRIE, N.L., VILLABLANCA, A.C., KUMAR, K. & MURRAY, M.J. (2003). Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 123-130.

SUPKO, J.G. & MALSPEIS, L. (1995). Plasma pharmacokinetics of genistein in mice. *International journal of oncology*, 7, 847-854.

TAMURA, M., KAZUHIRO, H., ITOH, K., SUZUKI, H. & SHINOHARA, K. (2002). Effects of soy protein-isoflavone diet on plasma isoflavone and intestinal microflora in adult mice. *Nutrition Research*, 22, 702-713.

TIKKANEN, M.J., WAHALA, K., OJALA, S., VIHMA, V. & ADLERCREUTZ, H. (1998). Effects of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3106-3110.

TODO, K., GOTO, T., MIYAMOTO, K. & AKIMOTO, S. (2002). Physical and genetic map of the *Fingoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*) ATCC 29328 genome. *FEMS Microbiology Letters*, 210, 33-37.

TSANGALIS, D., ASHTON, J.F., MCGILL, A.E.J. & SHAH, N.P. (2002). Enzymatic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing Bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 67, 3104-3113.

UCHIYAMA, S., UENO, T. & SHIROTA, T. (2001). The relationship between soy isoflavones and the menopausal symptoms in Japanese perimenopausal women. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45, 113.

UENO, T. & UCHIYAMA, S. (2001). Identification of the specific bacteria capable of metabolising soy isoflavone to equol. *Nutrition and Metabolism*, 45, 114.

VAHJEN, W., JADAMUS, A. & SIMON, O. (2002). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. *Archives of Animal Nutrition*, 56, 419-429.

VAN CAMP, J. & DEMEYER, D. (2001-2002). Algemene voedingsleer (cursusnota's). Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, p 6.7-6.8.

VERSTRAETE, W. (2003-2004). Environmental Microbiology (cursusnota's). Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, p I-3.

WANG, H.J. & MURPHY, P.A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42, 1666-1673.

WANGEN, K.E., DUNCAN, A.M., XU, X. & KURZER, M.S. (2001). Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 225-231.

WASHBURN, S., BURKE, G.L., MORGAN, T. & ANTHONY, M. (1999). Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*, 6, 7-13.

WILLIAMS, J.K. & CLARKSON, T.B. (1998). Dietary soy isoflavones inhibit in-vivo constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coronary Artery Disease*, 9, 759-764.

WILLIAMS, J.P., JORDAN, S.E., BARNES, S. & BLAIR, H.C. (1998). Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *American Journal of Nutrition*, 68, 1369-1374.

WILLIAMS, K. & SUPARTO, I. (2003). Effects of equol on vasoconstrictor responses in male mice. In: 5th international symposium on the role of soy in preventing and treating chronic disease, oral presentation abstracts. Orlando, SANA, 22.

WISEMAN, H. (1999). Importance of oestrogens, xenoestrogen and phytoestrogen metabolism in breast cancer risk. *Biochemical Society Transactions*, 27, 299-304.

WISEMAN, H., O'REILLY, J.D., ADLERCREUTZ, H., MALLET, A.I., BOWEY, E.A., ROWLAND, I.R. & SANDERS, T.A.B. (2000). Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F₂-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 394-400.

WITZTUM, J.L. & STEINBERG, D. (1991). Role of oxidized low-density-lipoprotein in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1785-1792.

WOLIN, M.J. & MILLER, T.L. (1993). Bacterial strains from human feces that reduce CO₂ tot acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 3551-3556.

WU, A.H., ZIEGLER, R.G., NOMURA, A.M., WEST, D.W., KOLONEL, L.N., HORN-ROSS, P.L., HOOVER, R.N. & PIKE, M.C. (1998). Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1437S-1443S.

XU, X., HARRIS, K.S., WANG, H.J., MURPHY, P.A. & HENDRICH, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *Journal of Nutrition*, 125, 2307-2315.

XU, X., WANG, H.J., MURPHY, P.A., COOK, L. & HENDRICH, S. (1994). Daidzein is a more bioavailable soy milk isoflavone than genistein in adult women. *Journal of Nutrition*, 124, 825-832.

ZHOU, J.R., GUGGER, E.T., TANAKA, T., GUO, Y., BLACKBURN, G.L. & CLINTON, S.K. (1999). Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. *Journal of Nutrition*, 129, 1628-1635.

ZUBLIK, L. & MEYDANI, M. (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *American Journal of Nutrition*, 77, 1459-1465.

ZUMDAHL, S. (1998). *Chemical principles*. Boston, Houghton Mifflin Company, 840.

Deel V

Bijlagen

Sequenties van de 16S rDNA fragmenten

Lactobacillus mucosae

```
3' GTGGCCCAACTGATTGAACGTGCTTGCACGGACTTGACGTTGGTTTACCAGCG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAAAGCGGGGGATAAC
ATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAATTTGAATCGCATGATTCAAATTT
AAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTGGGATGGACCTGCGGGCGCATTAGCTTGTTG
GTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCTGTGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGATC
GGCCACAATGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAG
GGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGCGTGAGAGCAACTGT
TCACGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG
CAGGCGGTTTGATAAGTCTGATGTGAAAGCCTTTGGCTTAACCAAAGAAGTGCAT
CGGAAACTGTCAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCG
GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGC 5'
```

Enterococcus faecium

```
3' TCTCANNCCCCCTCTATCTTTTATCACTATCATTTCTCATCTTAGTGCTCGGAG
TTCGCTGAGGGGTCTCCGTTCAAGTGTGCGAGCCTGTAGGTTGACAGGTAGTCATC
GGGTAACGTAAGTGTCCGAGATGTAGGGAGATGATCGGGCGTCCGGTGGGTTTGT
GCGGGACGGAGTGTGAGCGGTTCGAGCGTCCGGTACACGTTGTGGGCGGAGTGTC
CAGGACCGTCGACCCGTAGTAGTGGCGGTGAGGAGGCGCGCACGACGCTAGACT
ATCGCAGAGGGCTGAGGTGTCGGCTCTGTTCCGGTGGAGTTTAGAAGCATAGGCGGG
GCGCTCCGATCCGCGAAGCCGAGGGTGCATCTCCGAGTAAGTGCATGTCCGAA
GTCGCACTGCAATGGTATGTCACCATATACATAGACTTCTCATTACCTACTAGCG
AGAACGCAACAGCTCGACAATTTAGTTTCGAGGGCGTCCAGAGCGCGTGGTGGATT
GGTGCGCCGAAGCTCTGGCGATTGTCGCGCCAGAGCGGTGCTGCTGTGCATGTCG
GTTCCGGTGTAGCAATCACGCTGGTGTACGCTCTGCTCGACCGCGAGGAGTGTGCA
GGCTTGTAGGTGCCTCATCTCGGGTATGACGGGAGCTGGCTACGTCCGGCCT 5'
```


Sequenties van de 16S rDNA fragmenten

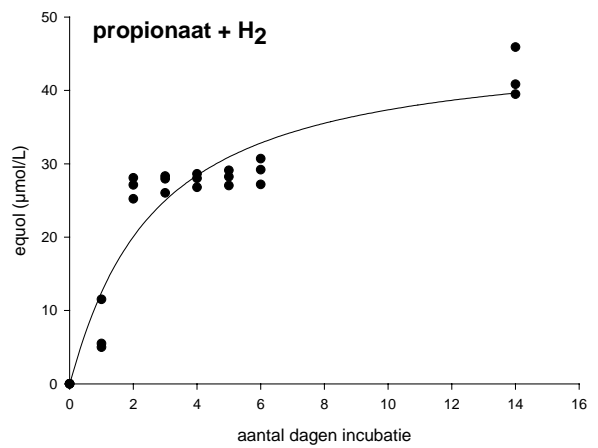
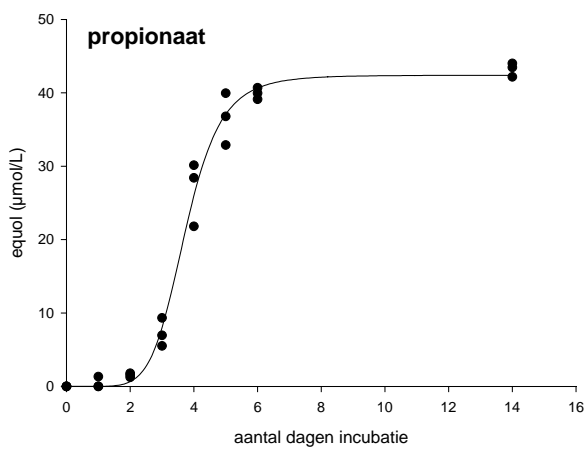
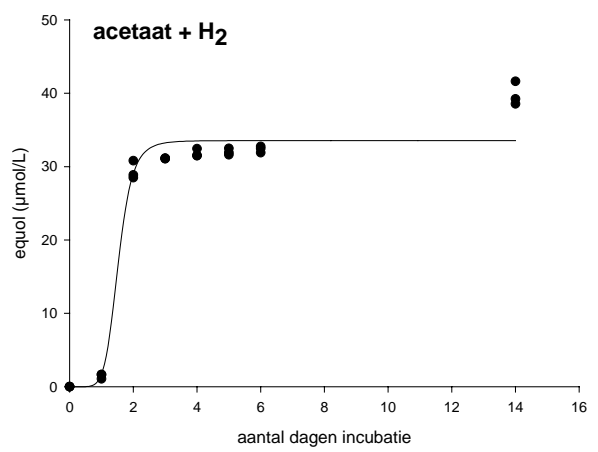
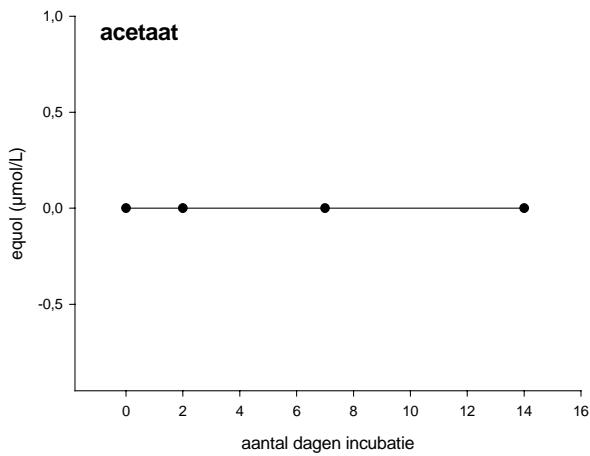
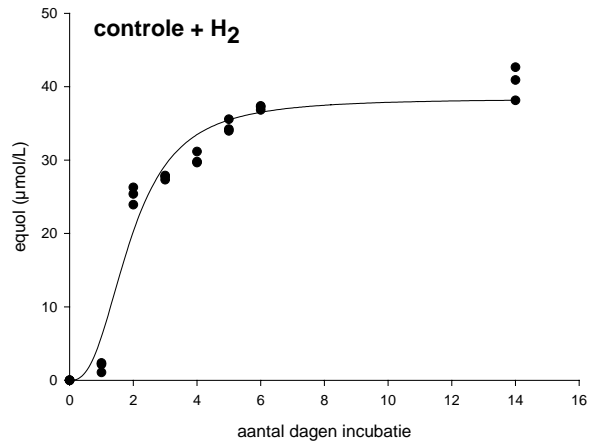
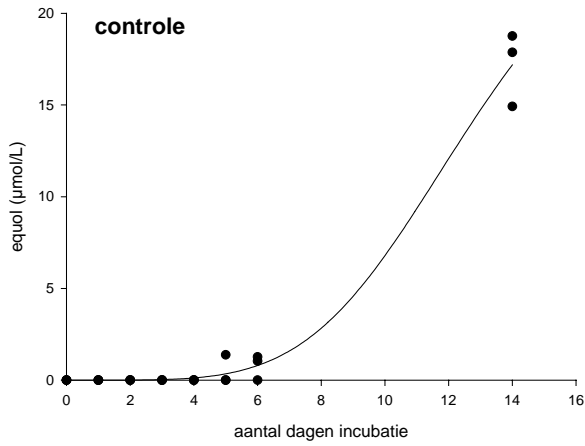
Finegoldia magna

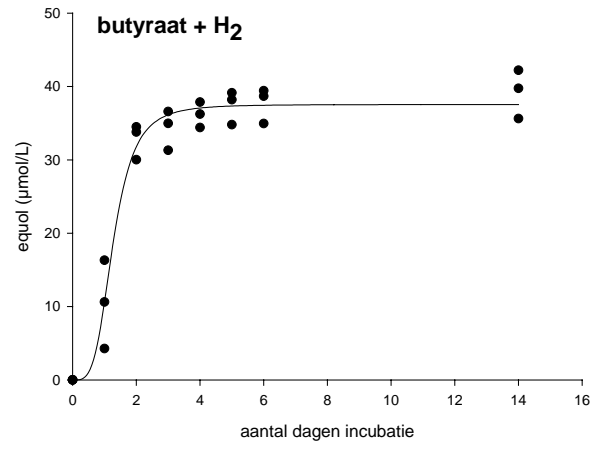
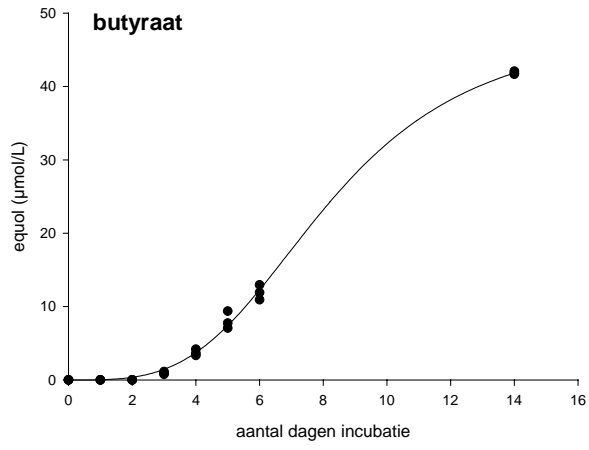
```
3' GGATTAGTAAACAGAAGCCTCGGTGGAAGATTACTAATGAGAGTGGCGAACG
GGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCCTATGACAGTGGGATAGCCTCGGGAAACC
GGGATTAATACCGCATAAAAATCGTAGAAACACATGTTTTAACGGTCAAAGATTTA
TCGGTCATAGATGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGATAACAGCCCACC
AAGGCGACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGAAGTGGAG
ACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGG
AAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAACGAAGAAGGTATTCGTATCGTAAAGT
TCTGTCCTATGGGAAGATAATGACAGTACCATAGAAGAAAGCTCCGGCTAAATAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGAGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGGGTACGCAGGCGGTTAATAAGTTCGAATGTAAAGATCGGGGCTCAAC
CCCGTAAAGCATTGGAAACTGATAAACTTGAGTAGTGGAGAGGAAAGTGGAATT
CCTAGTGTAGTGGTGAATACGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTAGCGAAGGC
GACTTTCTGGACACAAACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 5'
```

Veillonella-verwante species

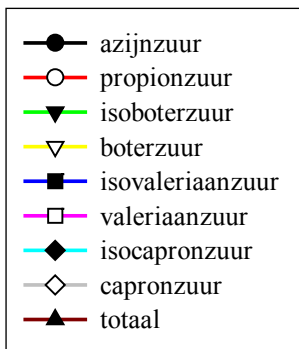
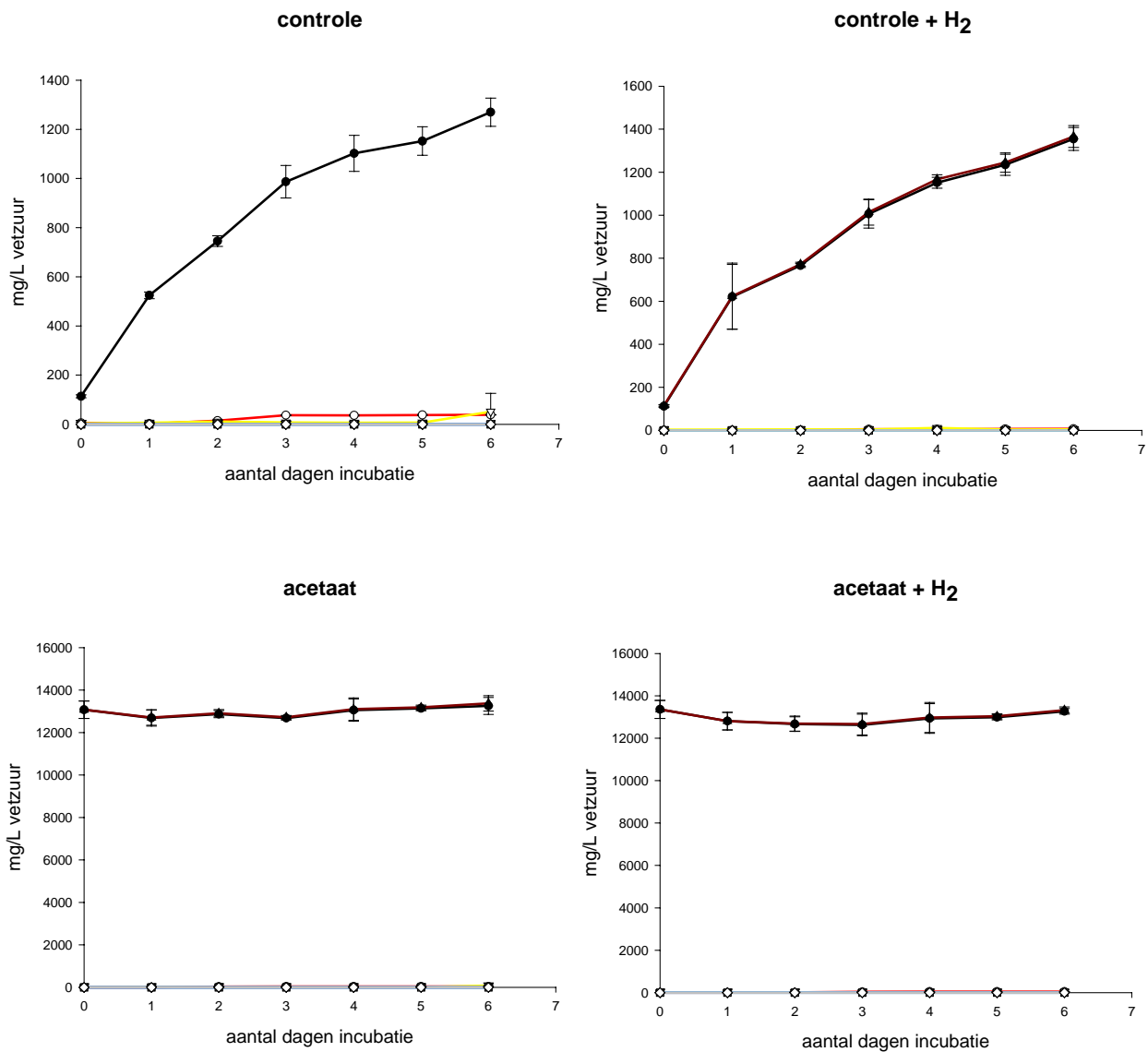
```
3' TCACCGCGGTATGCTGACCCGCGATTACTAGCGATTCCTGCTTCACGCAGGCG
AGTTGCAGCCTGCGATCCGAACTGGGATCCTGTTTCTGAGGTTTCGCTTGGTGTGC
CACTTCGCTGCTCTCTGTCAGGACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGATTTGTCATCGGCAGTCT
CTCCATAGTCCCCACCATGACGTGCTGGTAATTGAAGATAGGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGGCACGAGCTGACGACAGCCGTGCACCACCT
GTTTTCTCGTCTCCCGAAGGAGAACTCCGCGTCTCTGCGGATGGCGATCAATGTC
AAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATACTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTAAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGG
CGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTCGATACCTCCTACACCT
AGTACCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCA
CGTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTGCTCGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACCGGTG
TTCTTCCTAATCTCTACGC 5'
```

Fitting van de data aan een logistisch model

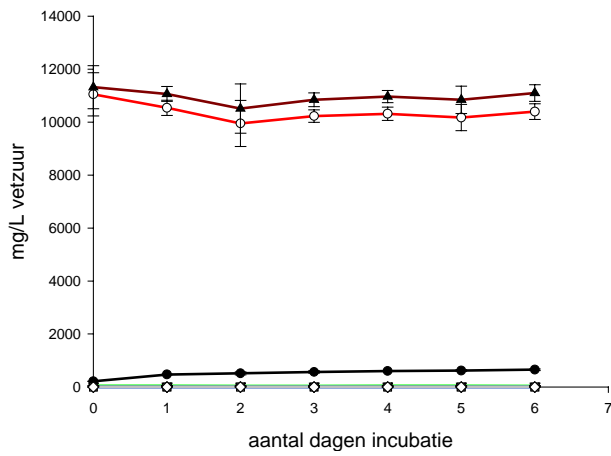




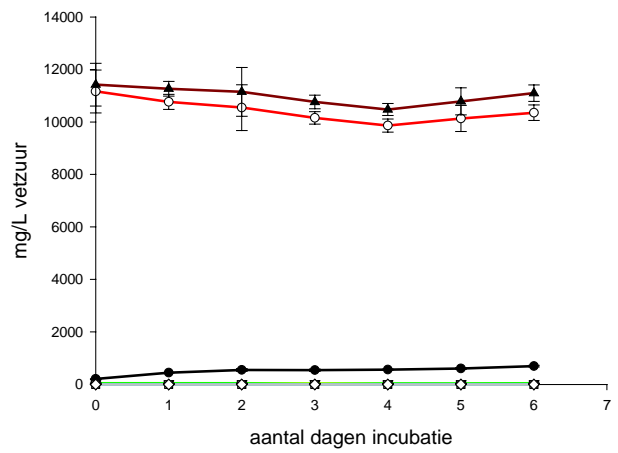
Vetzuurprofiel tijdens incubatie onder verschillende experimentele omstandigheden



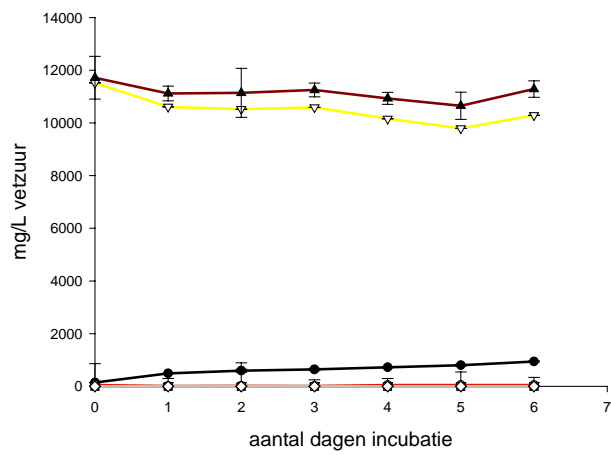
propionaat



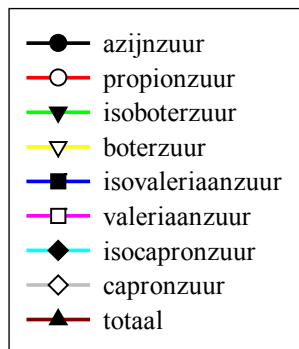
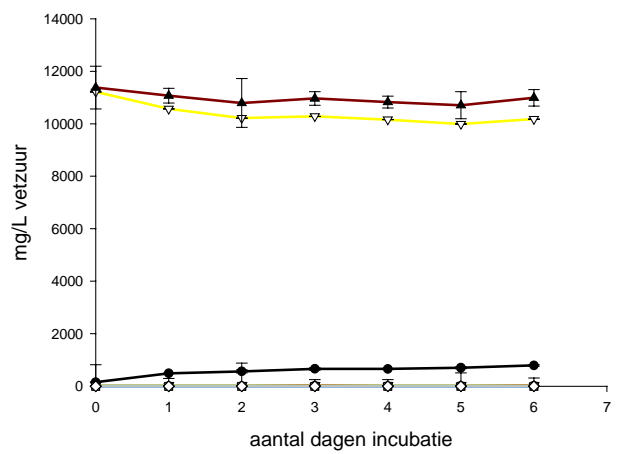
propionaat + H₂



butyraat



butyraat + H₂



De invloed van H₂ op de SCFA productie

Test op normale verdeling

Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

data: x: **azijnzuur** with headspace = N2 , and y: azijnzuur with headspace = H2
ks = 1, **p-value = 0.1**

alternative hypothesis:

cdf of x: azijnzuur with headspace = N2 does not equal the

cdf of y: azijnzuur with headspace = H2 for at least one sample point.

data: x: **propionzuur** with headspace = N2 , and y: propionzuur with headspace = H2
ks = 1, **p-value = 0.1**

alternative hypothesis:

cdf of x: propionzuur with headspace = N2 does not equal the

cdf of y: propionzuur with headspace = H2 for at least one sample point.

data: x: **boterzuur** with headspace = N2 , and y: boterzuur with headspace = H2
ks = 1, **p-value = 0.1**

alternative hypothesis:

cdf of x: boterzuur with headspace = N2 does not equal the

cdf of y: boterzuur with headspace = H2 for at least one sample point.

Test op gelijke variantie

*** Modified Levene test ***

	Df	Sum of Sq	Mean Sq	F Value	Pr(F)
groep	1	296.300	296.300	0.2700593	0.6307246
Residuals	4	4388.672	1097.168		

	Df	Sum of Sq	Mean Sq	F Value	Pr(F)
groep	1	0.0032667	0.0032667	0.01348562	0.9131481
Residuals	4	0.9689333	0.2422333		

	Df	Sum of Sq	Mean Sq	F Value	Pr(F)
groep	1	0.928267	0.9282667	1.021158	0.3694066
Residuals	4	3.636133	0.9090333		

Tweezijdige student t-test**Standard Two-Sample t-Test**

data: x: azijnzuur with headspace = N2 , and y: azijnzuur with headspace = H2

t = -3.2167, df = 4, p-value = 0.0162

alternative hypothesis: true difference in means is less than 0

95 percent confidence interval:

NA -36.56788

sample estimates:

mean of x mean of y

1263.109 1371.533

data: x: propionzuur with headspace = N2 , and y: propionzuur with headspace = H2

t = 49.5557, df = 4, p-value = 0

alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0

95 percent confidence interval:

31.57718 NA

sample estimates:

mean of x mean of y

38.53333 5.536667

data: x: boterzuur with headspace = N2 , and y: boterzuur with headspace = H2

t = 4.6689, df = 4, p-value = 0.0048

alternative hypothesis: true difference in means is greater than 0

95 percent confidence interval:

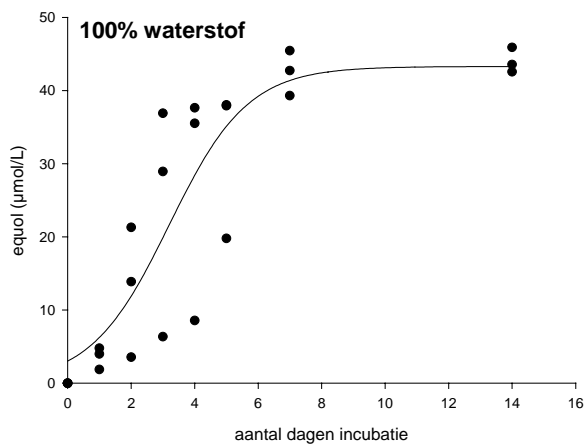
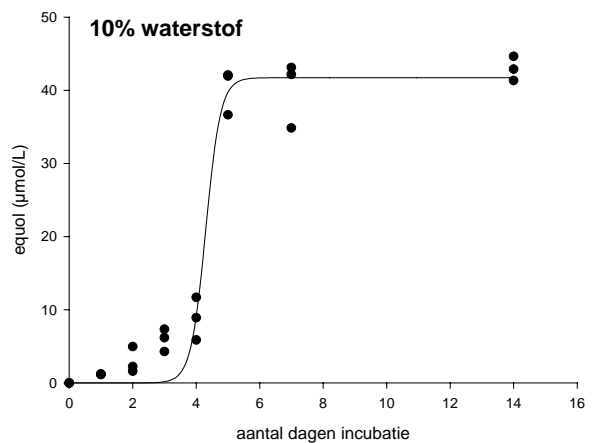
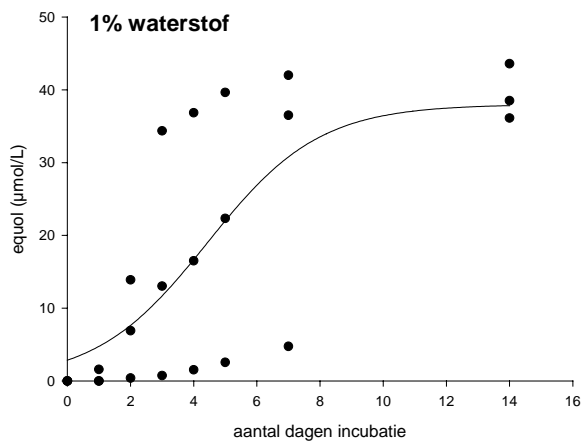
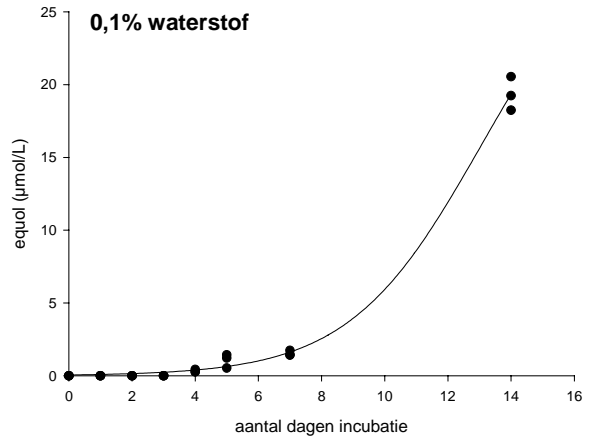
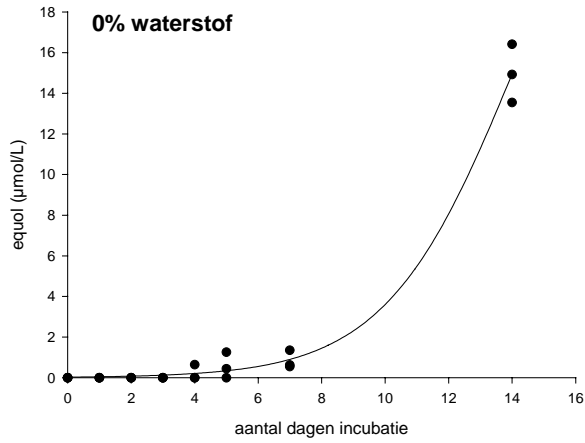
2.825672 NA

sample estimates:

mean of x mean of y

9.633333 4.433333

Fitting van de data aan een sigmoïdaal model



Statistische analyse van de invloed van nitraat, sulfaat en CO₂ op de equolproductie

Om een ANOVA test uit te mogen moeten de varianties van de afhankelijke variabelen gelijk zijn. Daarom werden de proefopzetten waarbij nitraat werd toegevoegd aan het medium (geen equolproductie, dus variantie gelijk aan 0) niet opgenomen in de test.

Gelijkheid van variantie werd geverifieerd met de Levene test. Bij deze test wijst een p-waarde groter dan 0,05 op gelijke variantie.

Bij de One-way ANOVA wijst een p-waarde kleiner dan 0,05 erop dat er minstens één van de proefopzetten afwijkt van de andere.

	Dag2	Dag3	Dag4	Dag5	Dag6	Dag8
Levene test	0,77	0,8	0,8	0,92	0,72	0,72
One-way ANOVA	0**	0**	0**	0,09	0,64	0,48

Hieruit volgt dus dat er, met uitzondering van het medium waaraan nitraat werd toegevoegd, vanaf dag 5 overall even veel equol werd geproduceerd bij de verschillende experimentele omstandigheden.

