

**IMPACT VAN STRUCTURELE KENMERKEN OP
HET ANTIOXIDANT EN PREBIOTISCH
POTENTIEEL VAN
(ARABINO)XYLANOLIGOSACHARIDEN**

Impact of structural characteristics on antioxidant and prebiotic properties of
(arabino)xylanoligosaccharides

Promotoren:

Prof. Christophe Courtin

Dr. Emmie Dornez

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen

Centrum voor Levensmiddelen- en Microbiële Technologie

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master of science in de bio-ingenieurswetenschappen:
levensmiddelentechnologie

Heleen Olaerts

juni 2013

"Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina."

VOORWOORD

Overladen door de vele erge verhalen van ouderejaars, kwam ik dinsdag 4 september om 9 uur 's morgens het labo van Levensmiddelenchemie en -biochemie met een bang hartje binnen. "Het verschrikkelijk zware thesisjaar", "het einde van je sociaal studentenleven", ging vanaf die dag beginnen. Maar zo is dat jaar voor mij niet geweest: het was een jaar vol nieuwe ervaringen, zelfstandig onderzoek doen naar interessant wetenschappelijke zaken en nieuwe vriendschappen. Als ik terug denk aan het voorbije jaar, zal ik tegen de nieuwe thesisstudenten zeggen: "het was een jaar hard werken en doorzetten, maar ik heb er ook van genoten!". Dit dankzij volgende mensen die ik graag wil bedanken:

Als eerste wil ik mijn promotor, Prof. Christophe Courtin, bedanken bij wie ik de eer had om mijn masterthesis af te leggen. Bedankt voor de interesse naar de vorderingen in mijn onderzoek en de waardevolle suggesties. Ook dank aan Dr. Emmie Dornez voor de nuttige adviezen, de verbeteringen van dit werk en de hulp voor het interpreteren van de resultaten wanneer ik even in het donker tastte.

Speciale dank gaat uit naar mijn begeleider Jeroen. Je hebt me vanaf de eerste dag weten te boeien in mijn onderzoek. Dankzij jou zijn mijn kriebels voor het wetenschappelijk onderzoek versterkt. Ik ben je zeer dankbaar voor de vele uitleg, wanneer ik weer in de knoop zat met de moeilijke materie, het vertrouwen in mijn werk en de ontelbare uren verbeterwerk dat je in mijn eindwerk gestoken hebt. Ik zal je nooit genoeg kunnen bedanken, Jeroen!

Verder wil ik alle mensen uit het labo bedanken voor de leuke sfeer en in het bijzonder Luc, voor de technische hulp, en Mira voor de goede tips en hulp, zeker toen we op één dag tijd enzymtesten op meer dan 400 stalen moesten uitvoeren. Grote dank gaat uit naar mijn mede THESISHELDEN: Emke, Julie M, Julie VO, Hannah, Annelore, Arno, Nand, Louis, Charlotte, Sofie, Annelies, Kristien, Steven en Anali voor de ongelofelijk toffe sfeer in het labo. Ik zal jullie en de hilarische momenten in het labo missen. Dankzij jullie kwam ik elke dag met een grote glimlach naar het labo.

Verder wil ik ook mijn ouders bedanken voor de kans die ik gekregen heb om Bio-ingenieur te studeren en voor de steun tijdens deze, soms toch wel moeilijke, studie jaren.

Maar in het bijzonder wil ik mijn vriend Sam bedanken, voor de ongelofelijke steun die je was het voorbije jaar. Wanneer ik het even niet meer zag zitten, wist jij me altijd terug te motiveren om te blijven doorgaan. Bedankt voor het luisteren en de heerlijke momenten samen!

Heleen

SAMENVATTING

Arabinoxylanoligosachariden (AXOS) en xylo-oligosachariden (XOS) zijn hydrolyseproducten van arabinoxylan, een abundant structurele component in de celwanden van granen. Recent zijn AXOS geïntroduceerd als een prebiotisch voedingsmiddel. AXOS zijn opgebouwd uit een lineaire keten van β -1,4-gebonden D-xylose gesubstitueerd met α -L-arabinose zijketens. AXOS met een lage arabinosesubstitutiegraad worden XOS genoemd. Aan de arabinosezijketen kan ferulinezuur (FA), een gekend antioxidant, veresterd voorkomen. Antioxidanteigenschappen van AXOS en de invloed van FA hierop is nog maar weinig bestudeerd. Bovendien is de impact van de polymerisatiegraad (DP) en FA op de prebiotische eigenschappen van respectievelijk XOS en AXOS nog niet onderzocht.

Om de invloed van FA op de antioxidant en prebiotische eigenschappen van AXOS te onderzoeken werden twee sets van AXOS, die binnen één set een gelijkaardige suikerstructuur hebben maar varieerden in het voorkomen van FA, succesvol aangemaakt en gekarakteriseerd. De AXOS waren FA arm of rijk, waarbij FA zowel vrij, gebonden of verknoopt voorkwam. Hiernaast werden ook twee XOS stalen met verschillende DP gekarakteriseerd voor studie van de invloed van de DP op de prebiotische eigenschappen van XOS.

Door deze AXOS te onderwerpen aan een Trolox equivalent antioxidantcapaciteitstest en een *Oxygen radical antioxidant capacity* test, werd de impact van vrij, gebonden of verknoopt FA op de antioxidantcapaciteit van AXOS bestudeerd. FA was de belangrijkste factor die de antioxidanteigenschappen van AXOS bepaalde. Gebonden FA had nog steeds goede antioxidantcapaciteit, maar was minder krachtig dan vrij FA. Verknoping van FA verlaagde de antioxidantcapaciteit nog sterker.

De prebiotische eigenschappen van XOS en AXOS werden bestudeerd met behulp van *in vitro* fermentatie, gebruikmakend van inoculum afkomstig van het effluent van de *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem* reactor. Binnen de geteste DP range (3-13) werd er geen verschil vastgesteld tussen de fermentatie van XOS. Daarentegen zorgden XOS voor een relatief hogere boterzuurproductie, dat een bescherming zou bieden tegen darmkanker. AXOS arm aan FA werden het snelst gefermenteerd en hierdoor werden er sneller gunstige korte ketenvetzuren gevormd. Gebonden FA verlaagde de fermentatiesnelheid van arabinose terwijl fermentatievloeistof met vrij FA een lagere enzymactiviteit vertoonden. Een tragere koolhydraatfermentatie is daarom niet nadelig, aangezien de fermentatie ervan eerder in het distale colon gelegen zal zijn, waardoor ze daar de schadelijke proteïnefermentatie kunnen onderdrukken. AXOS vertoonden ook een goede antioxidantcapaciteit die daalde gedurende de fermentatie indien vrij FA gemetaboliseerd werd.

Deze studie toont aan dat AXOS prebiotische en antioxidanteigenschappen combineren. FA beïnvloedt de fermentatie van AXOS en bepaalt de antioxidantcapaciteit van AXOS.

SUMMARY

Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) and xylo-oligosaccharides (XOS) are hydrolysis products of arabinoxylan, a major structural constituent of the cell wall of cereals. Recently AXOS are introduced as prebiotic food ingredients. AXOS consist of a β -1,4-linked D-xylose backbone substituted with monomeric α -L-arabinose side chains. AXOS with a low arabinose substitution are called XOS. Some of the arabinose side chains are esterified to ferulic acid (FA), a well known antioxidant. Antioxidant properties of AXOS and the influence of FA on these are ill studied. Furthermore, the impact of the degree of polymerization (DP) and FA on the prebiotic potential of XOS and AXOS, respectively, is less studied.

To study the impact of FA on antioxidant and prebiotic properties of AXOS, two sets of AXOS samples, which had within one set a similar carbohydrate backbone but varied mainly in the occurrence of FA, were successfully produced and characterized. AXOS were FA poor or rich, and FA occurred in a bound, free or cross-linked form. In addition, two XOS samples with a different DP were characterized and used for study the impact of the DP of XOS on their prebiotic properties.

The AXOS samples were subjected to a Trolox equivalent antioxidant capacity and an Oxygen radical antioxidant capacity assay to study the impact of free, bound and cross-linked FA on the antioxidant capacity of AXOS. The presence of FA was the major factor which determined the antioxidant activity of AXOS. AXOS bound FA still had good antioxidant properties, but less than free FA. Cross-linking of FA further decreased its antioxidant capacity.

The prebiotic properties of XOS and AXOS were examined during an *in vitro* fermentation, using inoculum obtained from the effluent of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem reactor. Within the tested DP range (3-13), almost no differences in fermentation of XOS were observed. However, XOS fermentation led to a relative increase of butyric acid production, which might have protective effects against colon cancer. FA poor AXOS were fermented the fastest and consequently led to the highest concentrations of beneficially short chain fatty acids. AXOS bound FA decreased the rate of arabinose fermentation and free FA decreased enzyme activity in the fermentation medium. Slowly fermentable compounds could be of interest as their fermentation is partly shifted to the distal colon where they may suppress protein fermentation. AXOS also exerted high antioxidant capacity, which decreased during fermentation when free FA was further metabolized.

This study indicates that AXOS combine prebiotic and antioxidant properties. FA influences the fermentation and determines the antioxidant capacity of AXOS.

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

ΔAbs	extinctiewaarde van Trolox/staal gecorrigeerd met extinctiewaarde van een blanco
ABTS ^{•-}	(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonaat)
ABAP	(2,2'-azobis-(2-amidinopropaan)HCl)
AX	arabinoxylan
AXOS	arabinoxylanoligosachariden
(A)XOS	(arabino-)xylanoligosachariden
AX(OS)	arabinoxylan(oligosachariden)
A/X	verhouding arabinose tot xylose
CF	correctiefactor
diFA	diferulinezuur
DP	(gemiddelde) polymerisatiegraad
ds	droge stof
FA	ferulinezuur
FAE	ferulinezuuresterasen
GC	gaschromatografie
HPAEC-IPAD	hoge performantie anion-uitwisselingschromatografie met geïntegreerde gepulseerde amperometrische detectie
IS	interne standaard
KKVZ	korte ketenvetzuren
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
MS	monosachariden
nkat	nanokatal (nmol/s)
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
pNP	p-nitrofenol
pNP-Ara	p-nitrofenyl-α-L-arabinofuranoside
pNP-Xyl	p-nitrofenyl-β-D-xylopyranoside
RF	responsfactor
Rico	regressiecoëfficiënt
SHIME	<i>Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>
TEAC	Trolox equivalent antioxidantcapaciteit
TFA	trifluorazijnzuur
XOS	xylo-oligosachariden

INHOUDSTAFEL

VOORWOORD	I
SAMENVATTING.....	II
SUMMARY	III
LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN	IV
INHOUDSTAFEL	V
CONTEXT EN DOELSTELLINGEN	1
DEEL 1. LITERATUUROVERZICHT.....	2
HOOFDSTUK 1. DE DARMMICROBIOTA	3
1.1 Microbiële gemeenschap in de darmen.....	3
1.2 Belang van de darmmicrobiota voor de gastheer.....	4
1.3 Probiotica, prebiotica en synbiotica	7
1.4 Nagaan van prebiotische eigenschappen via <i>in vitro</i> fermentatie-experimenten	8
HOOFDSTUK 2. STRUCTURELE OPBOUW EN VOORKOMEN VAN ARABINOXYLANEN EN FERULINEZUUR	10
2.1 Arabinoxylanen.....	10
2.1.1 Structurele opbouw van arabinoxylanen.....	10
2.1.2 Voorkomen van arabinoxylanen in de tarwekorrel	11
2.2 Ferulinezuur.....	13
2.2.1 Structuur en structurele rol van ferulinezuur.....	13
2.2.2 Voorkomen van ferulinezuur in de tarwekorrel	14
HOOFDSTUK 3. ARABINOXYLANOLIGOSACHARIDEN EN XYLANOLIGOSACHARIDEN	15
3.1 Productie	15
3.2 Prebiotische eigenschappen van (arabino-) xylanoligosachariden	16
3.2.1 Resistentie tegen maagzuur, hydrolyse door humane enzymen en gastro-intestinale absorptie	16
3.2.2 Fermentatie door darmmicro-organismen.....	17
3.2.3 Selectief stimuleren van de groei en/of activiteit van darmmicro-organismen die geassocieerd zijn met gezondheid en welzijn.....	19
3.3 De biobeschikbaarheid van ferulinezuur en zijn invloed op de fermentatie van AX(OS)	19
3.3.1 Biobeschikbaarheid van ferulinezuur	20
3.3.2 Invloed van ferulinezuur op enzymatische afbraak.....	20
3.3.3 Invloed van ferulinezuur op darmbacteriën	21
3.4 Mogelijke gezondheidsgerelateerde effecten van AXOS	22
3.4.1 Gezondheidsgerelateerde effecten van prebiotische (A)XOS	22
3.4.2 Gezondheidsgerelateerde effecten van ferulinezuur.....	23
DEEL 2. EXPERIMENTEEL WERK	25
HOOFDSTUK 4. AANMAAK EN STRUCTURELE KARAKTERISERING VAN EEN SET VAN XOS EN AXOS STALEN.....	26
4.1 Inleiding.....	26
4.2 Materialen	26
4.3 Methoden	26
4.3.1 Aanmaak van AXOS.....	26

4.3.2	Bepaling van het vochtgehalte	28
4.3.3	Bepaling van het asgehalte	28
4.3.4	Bepaling van het proteïnegehalte	29
4.3.5	Bepaling van het gehalte aan totale, gereduceerde en vrije monosachariden.....	30
4.3.6	Bepaling van het totale en vrije ferulinezuurgehalte	33
4.4	Resultaten en discussie	35
4.4.1	Aanmaak van FA aangerijkte AXOS.....	35
4.4.2	Structurele karakterisatie van XOS en AXOS	36
4.5	Conclusie	38
HOOFDSTUK 5. DE ANTIOXIDANTCAPACITEIT VAN XOS EN AXOS		39
5.1	Inleiding.....	39
5.2	Materialen	39
5.3	Methoden	39
5.3.1	Trolox equivalent antioxidantcapaciteit test	39
5.3.2	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> test	41
5.3.3	Statistische analyse	42
5.3	Resultaten en discussie	43
5.3.1	Trolox equivalent antioxidantcapaciteit test	43
5.3.1.1	Optimalisatie van de TEAC test voor XOS en AXOS	43
5.3.1.2	Antioxidantcapaciteit van XOS en AXOS	45
5.3.2	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> test	48
5.3.3	Vergelijking van de Trolox equivalent antioxidantcapaciteit en de <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> test	49
5.4	Conclusie	50
HOOFDSTUK 6. IN VITRO FERMENTATIE VAN XOS EN AXOS		52
6.1	Inleiding.....	52
6.2	Materialen	52
6.3	Methoden	52
6.3.1	<i>In vitro</i> fermentatie met behulp van het effluent van de SHIME reactor	52
6.3.2	Bepaling van het gehalte aan totale monosachariden	53
6.3.3	Bepaling van de XOS samenstelling op basis van hun polymerisatiegraad	53
6.3.4	Bepaling van het totale en vrije ferulinezuurgehalte	54
6.3.5	Bepaling van de pH	55
6.3.6	Bepaling van het gehalte aan korte ketenvetzuren.....	55
6.3.7	Bepaling van het ammoniakgehalte	56
6.3.8	Bepaling van de enzymactiviteit	57
6.3.8.1	Voorbehandeling	57
6.3.8.2	Endoxylanase activiteit	58
6.3.8.3	Arabinofuranosidase en xylosidase activiteit	59
6.3.9	Bepaling van de antioxidantcapaciteit.....	60
6.3.10	Statistische analyse	60
6.4	Resultaten	61
6.4.1	Inleiding	61
6.4.2	Afbraak van (A)XOS tijdens <i>in vitro</i> fermentatie.....	61
6.4.2.1	Afbraak van de koolhydraatstructuur van (A)XOS gedurende fermentatie	61
6.4.2.2	Veranderingen in vrij en gebonden FA tijdens fermentatie van AXOS.....	63
6.4.3	Geproduceerde metabolieten tijdens <i>in vitro</i> fermentatie van AXOS	65
6.4.3.1	Vorming van lineaire KKVZ en verandering in pH	65
6.4.3.2	Vorming van proteolytische componenten	67
6.4.4	Enzymactiviteit tijdens <i>in vitro</i> fermentatie van (A)XOS	68

6.4.4.1	Endoxylanasen	68
6.4.4.2	Xylosidasen	68
6.4.4.3	Arabinofuranosidasen.....	70
6.4.4.4	Locatie van enzymen	71
6.4.5	De antioxidantcapaciteit van AXOS tijdens <i>in vitro</i> fermentatie	74
6.5	Discussie	75
6.5.1	Algemene opmerkingen over de <i>in vitro</i> fermentatie	75
6.5.2	Invloed van polymerisatiegraad op <i>in vitro</i> fermentatie van XOS.....	76
6.5.3	Invloed van ferulinezuur op <i>in vitro</i> fermentatie van AXOS	79
6.6	Conclusie	82
ALGEMENE BESPREKING EN BESLUIT		83
LITERATUURLIJST		87
VULGARISERENDE SAMENVATTING		100

CONTEXT EN DOELSTELLINGEN

Men is zich meer en meer bewust van de relatie tussen voeding en gezondheid. Daarom raden gezondheids- en voedingsorganisaties een verhoogde consumptie van vezelrijke producten, onder meer granen, aan en breidt de markt met functionele voeding zich uit. Aan functionele voedingsmiddelen zijn één of meerdere gezondheidsbevorderende ingrediënten, bijvoorbeeld probiotica, prebiotica, antioxidanten en/of vitaminen, toegevoegd. Prebiotica zijn niet-verteerbare levensmiddeleningredienten, die selectief de groei en/of de activiteit van één of meerdere soorten bacteriën in de dikke darm stimuleren, en daardoor de gezondheid van de gastheer bevorderen. Inuline-type fructanen en galacto-oligosachariden zijn tot op heden de meest bestudeerde prebiotica. Recent werd ook aangetoond dat arabinoxylanoligosachariden (AXOS) prebiotische eigenschappen bezitten. AXOS kunnen aangemaakt worden door fysische, chemische of enzymatische hydrolyse van producten rijk aan arabinoxylan, zoals tarwezemel. Ze zijn opgebouwd uit een lineaire keten van β -1,4-gebonden D-xylopyranosyl eenheden, waaraan α -L-arabinofuranosyleenheden gekoppeld kunnen zijn. Bijkomend kan ferulinezuur (FA), een gekend antioxidant, veresterd voorkomen aan arabinose.

AXOS worden gekarakteriseerd op basis van hun polymerisatiegraad (DP), arabinosesubstitutiegraad en FA-gehalte. Het effect van deze eerste twee structurele kenmerken op de prebiotische eigenschappen van AXOS is reeds onderzocht. Het effect van de DP echter op de prebiotische eigenschappen van xylo-oligosachariden (XOS) is nog niet onderzocht, wegens het minder voorhanden zijn van XOS met een hogere DP. De impact van het voorkomen van FA veresterd op prebiotische eigenschappen van AXOS is tot op heden sterk onderbelicht gebleven. Ook de mogelijke antioxidanteigenschappen van AXOS zijn slechts weinig onderzocht.

In deze studie worden AXOS stalen geproduceerd met variërende gehalten aan FA om de antioxidanteigenschappen van AXOS en de impact van FA hierop te bestuderen. Verder wordt ook een *in vitro* fermentatie-experiment, met inoculum afkomstig van het effluent van de “*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*” reactor, opgezet om zowel de invloed van de DP als het voorkomen van FA op de prebiotische eigenschappen van respectievelijk XOS als AXOS te bestuderen.

DEEL 1

LITERATUUROVERZICHT

HOOFDSTUK 1

DE DARMMICROBIOTA

Men is er steeds meer van overtuigd dat de microbiota in het gastro-intestinaal stelsel een belangrijke rol spelen in de darm- en gastheergezondheid. De darmmicro-organismen hebben namelijk belangrijke metabolische, trofische en beschermende functies (Guarner & Malagelada, 2003). Hierbij worden *Bifidobacterium* en *Lactobacillus* veelal aanzien als gezondheids-bevorderende bacteriën. Na een bespreking van de microbiële gemeenschap in de darmen zal in dit hoofdstuk het belang van een goede darmmicrobiota voor de gastheergezondheid verder toegelicht worden. Vervolgens zullen enkele strategieën besproken worden om de samenstelling van de microbiota te beïnvloeden en op deze manier de gezondheid van de gastheer te bevorderen. Tenslotte zal er dieper ingegaan worden op technieken om de fermentatie in het gastro-intestinaalstelsel na te bootsen.

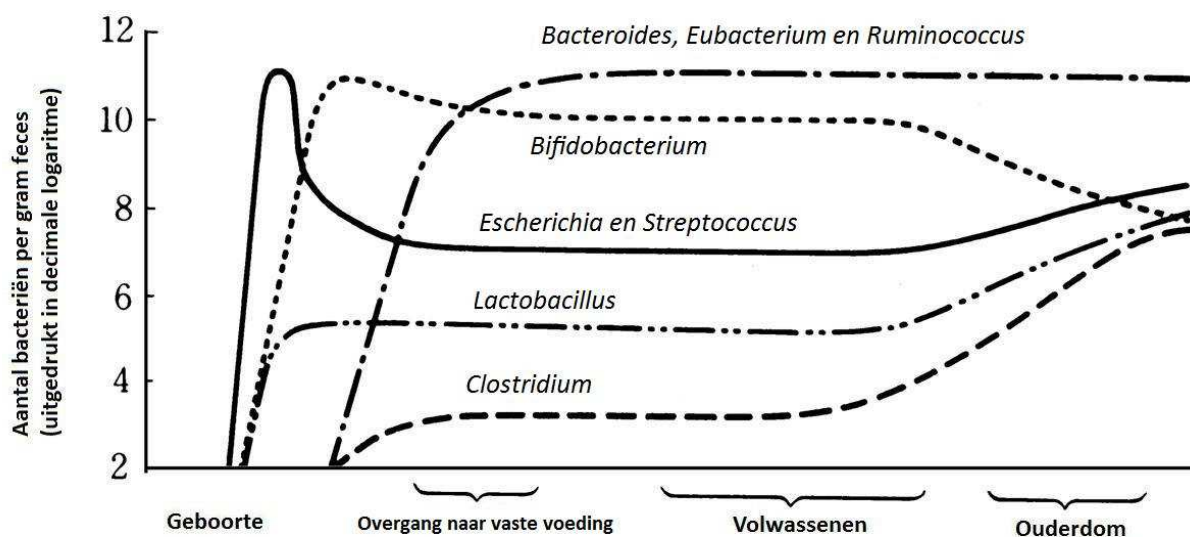
1.1 Microbiële gemeenschap in de darmen

In het gehele gastro-intestinaal stelsel van de mens leeft een enorme diversiteit aan bacteriën. In de dikke darm worden ongeveer 10^{12} micro-organismen per gram darminhoud aangetroffen (Nicholson *et al.*, 2005; Neish, 2009). De darmmicrobiota is het microbiële ecosysteem dat zich in onze darmen bevindt en in contact staat met de darmmucosa. Onderzoek naar de microbiële samenstelling van de darmmicrobiota is zeer complex en toont aan dat de darm voornamelijk (60 - 90%) gedomineerd wordt door anaerobe bacteriën, die voornamelijk behoren tot de genera *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* en *Ruminococcus*. Facultatief anaerobe bacteriën, zoals deze behorende tot de genera *Escherichia*, *Streptococcus* en *Lactobacillus*, komen minder talrijk voor in de darm (Mitsuoka, 1996; Fanaro *et al.*, 2003; Guarner & Malagelada, 2003; Nicholson *et al.*, 2005).

Verschillende invloeden (voeding, levensstijl, hygiëne en antibiotica) bepalen de samenstelling van de microbiota in de mens (Fanaro *et al.*, 2003; Turnbaugh *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). Voor de geboorte is de mens steriel. De manier waarop de mens ter wereld komt bepaalt welke micro-organismen het lichaam als eerste zullen koloniseren (Long & Swenson, 1977; Gronlund *et al.*, 1999). Een vaginale geboorte zal zorgen voor een microbiële wereld gelijkend aan die van de

vagina van de moeder, die voornamelijk bestaat uit lactobacillen en bifidobacteriën. Bij een geboorte met een keizersnede zullen voornamelijk huidbacteriën zoals *Staphylococcus* en *Propionibacterium* species, afkomstig van het verplegend personeel, zich nestelen in het menselijk lichaam (Fanaro *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2012). De microbiële kolonisatie wordt ook beïnvloed door het type van dieet (borst- of flessenvoeding) gedurende de eerste maanden (Long & Swenson, 1977; Yoshioka *et al.*, 1983; Fanaro *et al.*, 2003). Gedurende de ontwikkeling tot volwassene zal de samenstelling van de darmmicrobiota, voornamelijk door de introductie van vaste levensmiddelen, zich voortdurend aanpassen tot de persoonlijke microbiële identiteit gevormd is. Het aantal bifidobacteriën zal dalen en andere bacteriën zoals *Clostridia* en lactobacillen zullen toenemen in aantal (Figuur 1.1). Wanneer men dan volwassen is, zal er een relatief stabiele bacteriële samenstelling gevormd zijn (Mitsuoka, 1996; Clemente *et al.*, 2012).

De microbiële samenstelling blijft echter beïnvloedbaar via bacteriën of andere voedingscomponenten in de voeding, zoals verder toegelicht wordt in § 1.3. Vele bacteriesoorten zijn geëvolueerd en aangepast om te leven en groeien in het menselijke darmkanaal. Sommige soorten worden als gezondheidsbevorderend beschouwd, terwijl andere eerder een negatief effect hebben op de gezondheid van de gastheer (§ 1.2) (Gibson & Roberfroid, 1995).



Figuur 1.1: Verandering in microbiële gemeenschap gedurende het levensverloop van de mens (Mitsuoka, 1996).

1.2 Belang van de darmmicrobiota voor de gastheer

Commensale bacteriën aanwezig in de darmen vormen een natuurlijke verdedigingsbarrière en oefenen een belangrijke metabolische, trofische en beschermende functie uit op de epitheelcellen in de dikke darm door de productie van diverse metabolieten (O'Hara & Shanahan, 2006).

De belangrijkste **metabolische** functie van de darmbacteriën is de anaerobe fermentatie van onverteerbare voedingscomponenten, waaronder enkele koolhydraten of proteïnen. Hierbij spreekt men in het kader van koolhydraten vaak over dieetvezels zoals niet-zetmeel polysachariden, resistent zetmeel en oligosachariden (inuline en fructo-oligosachariden). Volgens de Europese Commissie (2008) zijn dieetvezels “koolhydraatpolymeren van drie of meer monomere eenheden, die niet gehydrolyseerd worden door endogene enzymen in de dunne darm van mensen”. Afbraak van deze complexe koolhydraten vindt plaats in de dikke darm via fermentatie door micro-organismen zoals *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, sacharolytische *Clostridium* en *Lactobacillus* species, die een variëteit aan polysacharidasen en glycosidasen kunnen produceren. Koolhydraatfermentatie is echter een samenwerking van vele verschillende bacteriële species en enzymen (Englyst *et al.*, 1987; Cummings & Macfarlane, 1991; Gibson & Roberfroid, 1995). Eindproducten van deze fermentatie zijn voornamelijk lineaire korte ketenvetzuren (KKVZ) (azijnzuur, propionzuur en boterzuur), gassen (CO₂ en H₂) en melkzuur (Cummings *et al.*, 1987). Ook de groei van de darmbacteriën wordt gestimuleerd, wat zorgt voor een hogere hoeveelheid bacteriële massa (Guarner & Malagelada, 2003). KKVZ worden snel geabsorbeerd in de dikke darm en vervolgens gemetaboliseerd op verschillende plaatsen in het lichaam: boterzuur door de darmepitheelcellen, propionzuur en azijnzuur (deels) door de lever en azijnzuur (deels) door de spieren en andere perifere weefsels (Cummings *et al.*, 1987). Deze KKVZ hebben belangrijke fysiologische functies in het lichaam van de gastheer (§ 3.4). Zo is boterzuur een belangrijke energiebron voor de darmcellen en reguleert het de groei en differentiatie van deze cellen. Azijnzuur zal in de spieren als basis voor de vetzuursynthese dienst doen. Propionzuur zou zorgen voor een lagere glycaemische respons op glucose, het inhiberen van lipogenese en het verlagen van cholesterolsynthese (Cummings *et al.*, 1987; Lopez *et al.*, 1999; Guarner & Malagelada, 2003). KKVZ verbeteren bovendien de absorptie van mineralen (Lopez *et al.*, 1999). Bovendien zorgen ze ook voor de synthese van vitaminen zoals vitamine K, biotine en folaat (Conly *et al.*, 1994; Hill, 1997). Vermits de productie van lineaire KKVZ algemeen aanzien wordt als heilzaam voor de gastheer (Wong *et al.*, 2006), worden bacteriën zoals bifidobacteriën, lactobacillen en *Eubacterium* als gezondheidsbevorderende bacteriën beschouwd (Mitsuoka, 1996; Swennen *et al.*, 2006a). Fermentatie van koolhydraten is energetisch gunstiger dan proteïnefermentatie (Van Loo, 2004). Bijgevolg zullen bacteriën preferentieel energie vrij maken uit koolhydraten. In het begin van de dikke darm, het proximale colon, is er een hogere nutriëntbeschikbaarheid waardoor er voornamelijk koolhydraatfermentatie plaatsvindt, een grotere productie van KKVZ en een snellere bacteriële groei optreedt. Op het einde van de dikke darm, het distale colon, waar er reeds depletie is aan koolhydraten, zal voornamelijk proteïnefermentatie plaatsvinden (Cummings *et al.*, 1987; Cummings & Macfarlane, 1991; Fooks *et al.*, 1999).

Proteolytische micro-organismen zorgen met behulp van hun peptidaseactiviteit voor anaerobe afbraak van proteïnen en peptiden, afkomstig van het dieet, bacteriële secreties, afgebrokkelde epitheelcellen en mucine (Macfarlane *et al.*, 1986). Door degradatie van aminozuren worden vertakte KKVZ (isoboterzuur en isovalerinezuur) en echter ook potentieel toxische componenten zoals ammoniak, fenolen (p-cresol), amines en thiolen gevormd. Ten gevolge van een verhoogde proteolytische afbraak zal de darmzuurtegraad dalen waardoor de groei van pathogene bacteriën toegelaten wordt. Deze metaboliëten worden niet gevormd tijdens koolhydraatfermentatie (Macfarlane *et al.*, 1986; Cummings *et al.*, 1987; Cummings & Macfarlane, 1991; Fooks *et al.*, 1999). Bacteriën die deze putrefactie producten, toxines en co-carcinogene substanties produceren, worden als schadelijk voor de gezondheid van de gastheer beschouwd. Deze bacteriën behoren voornamelijk tot de proteolytische *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Escherichia* en *Bacillus* (Vissek, 1978; Macfarlane *et al.*, 1986; Cummings & Macfarlane, 1991; Gibson & Roberfroid, 1995; Mitsuoka, 1996).

Een tweede functie van de darmmicrobiota is het **trofische effect** van de KKVZ op het darmepitheel. Ze stimuleren de groei en differentiatie van epitheelcellen in de dikke darm, waarbij voornamelijk boterzuur van belang is als energiebron (Frankel *et al.*, 1994; Guarner & Malagelada, 2003). KKVZ zorgen voor 60-70% van de energie die epitheelcellen nodig hebben. Deze KKVZ worden deels afgebroken tot CO₂ en ketonlichamen en dienen zo als precursoren voor de vetsynthese in de mucosa (Cummings & Macfarlane, 1991).

Een laatste belangrijke taak van de microbiële gemeenschap is om de gastheer bij te staan in de **verdediging** tegen het binnendringen van exogene micro-organismen. De microbiota, mucosa en mucus vormen samen de mucosale barrière. Deze laag zal gezondheidsbevorderende componenten doorlaten en het toetreden van mogelijks schadelijke componenten verhinderen (Aureli *et al.*, 2011). De commensaal bacteriën vormen hier een belangrijke eerste linie door het vasthechten aan de mucosa waardoor adhesie van andere, mogelijk pathogene bacteriën, verhinderd wordt en competitie voor receptorplaatsen zich voordoet (Voragen, 1998; Guarner & Malagelada, 2003). Bovendien produceren ze antimicrobiële componenten (bacteriociden) en zijn ze in staat om beschikbare nutriënten meer efficiënt te gebruiken dan de concurrerende bacteriën (nutriënt competitie) (Guarner & Malagelada, 2003). Voorts leidt de productie van KKVZ tot een antimicrobiële werking op bepaalde bacteriën, waaronder pathogene species, aangezien die niet kunnen vertoeven in dit aangezuurd milieu (Cummings *et al.*, 1987; Mitsuoka, 1996). Het geheel van deze biologische verdedigingsmechanismen, die het innestelen van pathogene bacteriën weerhouden, wordt "kolonisatieresistentie" genoemd (Thompson-Chagoyán *et al.*, 2005; Bakken, 2009).

1.3 Probiotica, prebiotica en synbiotica

Onderzoek naar de functionaliteit van het diverse ecosysteem in de darm leidde naar meer inzicht in de relatie tussen de microbiota en onze gezondheid. Zo is de idee ontstaan om via het aanbrengen van veranderingen in de darmmicrobiota de gastheergezondheid te verbeteren. Hieruit zijn de concepten pro-, pre- en synbiotica ontstaan, die in deze paragraaf verder toegelicht worden.

De term **probiotica** werd het eerst gebruikt door Lilly en Stillwell in 1965 en is afgeleid van twee Griekse woorden: 'pro' en 'bios', die 'voor' en 'leven' betekenen (Lilly & Stillwell, 1965; Fioramonti *et al.*, 2003). De betekenis van deze term stond initieel voor 'groei stimulerende factor voor bacteriën' en is doorheen de tijd veranderd. In 2001 gaf het FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*) de volgende definitie voor probiotica: "*Levende micro-organismen die toegediend in voldoende hoge concentraties een gezondheidsvoordeel voor de gastheer kunnen opleveren*" (Aureli *et al.*, 2011). Om een goede werking van probiotica te garanderen, moeten de micro-organismen voldoen aan een aantal voorwaarden: veilig zijn voor de gastheer, resistent zijn tegen maagzuur en pancreassecreties, adhesie vertonen aan epitheelcellen, selectieve antimicrobiële activiteit hebben, adhesie van pathogene bacteriën inhiberen, resistentie bieden aan antibiotica, tolerant zijn aan voedingsadditieven en stabiel zijn in de voedselmatrix (Gibson & Roberfroid, 1995; Fioramonti *et al.*, 2003). Verder heeft het EFSA hieromtrent nog geen claims goedgekeurd, daar ze stellen dat er geen oorzakelijk verband gevonden kan worden tussen probiotica en de geclaimde gezondheidseffecten (Swennen *et al.*, 2006a; Katan, 2012). De meest gebruikte probiotica zijn species van *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* en *Streptococci* (Fooks & Gibson, 2002).

Om het aantal gezondheidsbevorderende bacteriën te verhogen in de dikke darm kan men in plaats van probiotica ook voedingsingrediënten, **prebiotica** genaamd, nuttigen die dienst doen als nutriënt voor deze bacteriën. Prebiotica zijn "*niet-verteerbare levensmiddeleningrediënten die die selectief de groei en/of activiteit van één of meerdere soorten bacteriën in de dikke darm stimuleren, en daardoor de gezondheid van de gastheer bevorderen*" (Gibson & Roberfroid, 1995). Voedingsingrediënten moeten aan een aantal criteria voldoen, vooraleer ze als prebiotica beschouwd mogen worden. Het eerste criterium is de weerstand tegen maagzuur, hydrolyse door humane enzymen en gastro-intestinale absorptie. Ten tweede is het nodig dat prebiotica gefermenteerd kunnen worden door de darmmicrobiota. Als laatste voorwaarde moet de inname van prebiotica selectief de groei en/of activiteit van darmbacteriën, die geassocieerd zijn met gezondheid en welzijn, stimuleren (Gibson & Roberfroid, 1995). De meest onderzochte prebiotica zijn inuline en fructo-oligosachariden (Gibson *et al.*, 1995). Gezondheidsbevorderende bacteriën die gestimuleerd worden door prebiotica zijn voornamelijk bifidobacteriën en lactobacillen. Aangezien

deze bacteriën grotendeels een sacharolytische activiteit uitoefenen, zal de inname van prebiotica zorgen voor een verhoogde koolhydraatfermentatie en een verlaagde proteolytische activiteit in het colon (Gibson & Roberfroid, 1995).

Pro- en prebiotica kunnen ook samen toegediend worden, namelijk als **synbiotica** (Gibson & Roberfroid, 1995). Gibson en collega's (1995) geven er volgende definitie aan: "*Synbiotica zijn een mengsel van probiotica en prebiotica die een gezondheidsvoordeel hebben voor de gastheer, door de overleving en innestelling van levende microbiële voedingssupplementen in het gastro-intestinaal kanaal te verbeteren en door de groei en/of metabolische activiteit van één of meerdere gezondheidsbevorderende bacteriën selectief te stimuleren*".

1.4 Nagaan van prebiotische eigenschappen via *in vitro* fermentatie-experimenten

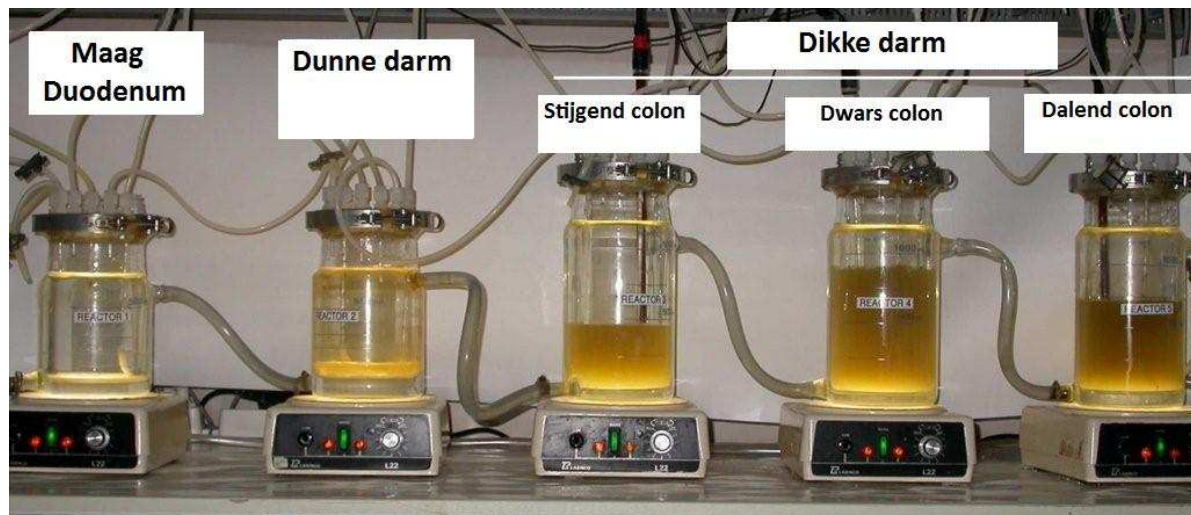
Er is een toenemend bewustzijn van het belang van darmmicrobiota voor de menselijke gezondheid. Om de fermentatie van prebiotica en het effect op de samenstelling en activiteit van darmmicrobiota in het colon na te gaan, zijn verscheidene *in vitro* systemen ontwikkeld. Deze systemen kunnen gaan van eenvoudige incubatie-experimenten met geïsoleerde bacterieculturen tot complexe systemen, die het volledige gastro-intestinaal stelsel simuleren. Hierbij wordt het gebruik van proefpersonen of -dieren vermeden en wordt de staalname vereenvoudigd.

In een eerste techniek maakt men gebruik van **geïsoleerde bacterieculturen**, waarmee men de invloed van voedingscomponenten op één bacteriesoort kan onderzoeken. Hierbij worden media gebruikt waar enkel de onderzochte soort op kan groeien. Deze hebben echter het nadeel dat er geen rekening gehouden wordt met het relatieve voorkomen van deze bacteriële soort in de darmgemeenschap, noch met competitie en *crossfeeding* met andere bacteriën (Broekaert *et al.*, 2011).

Verder bestaan er ook experimenten waarbij gebruik gemaakt wordt van bacteriën geïsoleerd uit **fecaal water** (waterige fase van feces) van proefpersonen. Fecale stalen van een proefpersoon, die al dan niet gedurende een bepaalde tijd een aangepast dieet heeft gevolgd, worden gehomogeniseerd en gecentrifugeerd, waarbij het supernatant het fecaal water voorstelt. Deze stalen worden anaeroob geïncubeerd op 37 °C om de fermentatie van de te onderzoeken voedingscomponent te bestuderen (Venturi *et al.*, 1997; Nordling *et al.*, 2003).

Er bestaan echter ook **complexere systemen**, die het menselijke maag-darmkanaal nauwkeuriger nabootsen, zoals de "*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*" (SHIME) (Figuur 1.2) en TNO *in vitro* modellen die enerzijds het bovenste maagdarmkanaal, TIM-1 genoemd, en anderzijds het menselijke colon, TIM-2 genoemd, simuleren. De SHIME is een dynamisch model

dat de microbiële wereld van het darmkanaal in stand houdt gedurende een aantal maanden. Deze reactor is opgebouwd uit 5 reactorvaten die continu gemengd worden en op 37 °C gehouden worden. De 5 vaten stellen de maag, dunne darm (jejunum en ileum), stijgend, transversaal en dalend colon voor. Gasuitwisseling met de omgeving wordt uitgesloten door de vaten onder N₂ – atmosfeer te houden, met continue pH controle en correctie om pH condities in het stijgend, transversaal en dalend colon nauwkeuriger na te bootsen. Een fecaal staal van een gezonde vrijwilliger die de voorbije 6 maanden geen antibioticum ingenomen had, wordt geïnoculeerd in de SHIME reactor en de reactor werd op vaste momenten met een basisdieet gevoed. Verder is staalname in de verschillende componenten van de simulator mogelijk (Molly *et al.*, 1994; De Boever *et al.*, 2000).



Figuur 1.2: Voorstelling van de “*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*”.

Het gebruik van de SHIME reactor heeft echter ook beperkingen daar het niet mogelijk is de absorptie van metabolieten doorheen het darmepitheel te onderzoeken, wat wel bij TIM-1 en TIM-2 nagebootst wordt. Verder is het ook niet mogelijk om fysiologische processen van de darmcellen te bestuderen, zoals actief transport of feedback mechanismen (Minekus *et al.*, 1995; Van Craeyveld *et al.*, 2008; Anson *et al.*, 2009a; Broekaert *et al.*, 2011). Met bovenstaande methoden is het bijgevolg niet mogelijk om volledig inzicht te verkrijgen in veranderingen die plaats vinden in het microbieel ecosysteem in de darmen.

HOOFDSTUK 2

STRUCTURELE OPBOUW EN VOORKOMEN VAN ARABINOXYLANEN EN FERULINEZUUR

De celwand van plantaardig materiaal is voornamelijk opgebouwd uit cellulose, arabinoxylan (AX), β -glucanen, pectine en lignine (Saulnier *et al.*, 2007). Bij granen, behorende tot de grassenfamilie (*Gramineae* L.), zoals tarwe, gerst, rogge, haver, sorghum en rijst vormen AX de voornaamste structurele componenten in de celwand (Carpita & Gibeaut, 1993; Ishii, 1997). AX zijn niet-zetmeelpolysachariden met een complexe structuur waarvan de structuur en gehalten verschillen naargelang het gewastype (Izydorczyk & Biliaderis, 1995, 2006).

In de graankorrel zorgen AX, samen met andere polysachariden, voor de opbouw en stevigheid van de celwand en behouden ze zo de integriteit van de weefsels in de plant (Fincher & Stone, 1986). Hierin speelt FA een belangrijke rol door het koppelen van verschillende structurele componenten zoals AX, lignine, ... (Fry, 1986; Ishii, 1997).

Daar tarwe in het vervolg van de thesis aan bod zal komen en de tarweproductie meer land inneemt dan welke ander graansoort ook in Europa (FAOSTAT, 2010), wordt er eerst ingegaan op de structuur en het voorkomen van AX in de tarwekorrel. Vervolgens wordt ook de structuur en het voorkomen van FA besproken.

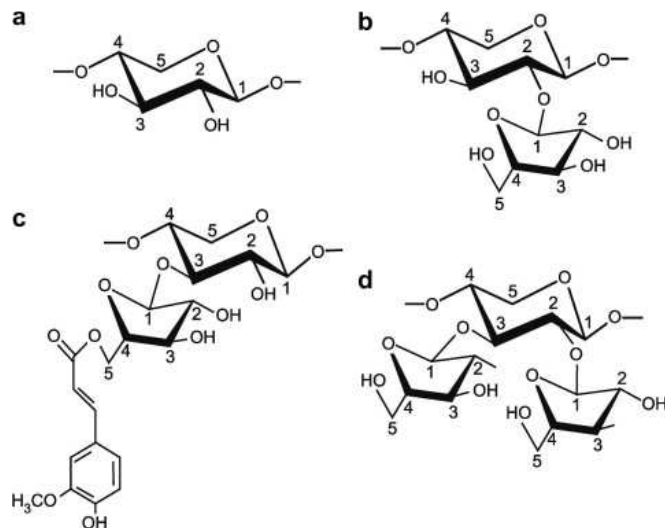
2.1 Arabinoxylanen

2.1.1 Structurele opbouw van arabinoxylanen

AX vormen een heterogene groep van structureel verschillende polymeren. Deze complexe koolhydraten zijn opgebouwd uit een lineaire keten van β -1,4-gebonden D-xylopyranosyl eenheden, waaraan α -L-arabinofuranosyl eenheden gekoppeld kunnen zijn op de O-2 en/of O-3 positie van een xylose-eenheid (Figuur 2.1) (Perlin, 1951; Brillouet *et al.*, 1982; Fincher & Stone, 1986; Hoffmann *et al.*, 1991). Uronzuren, zoals glucuronzuren en 4-O-methyl-glucuronzuren, acetylgroepen en korte oligomeren, opgebouwd uit L-arabinose, D-xylose, D-galactose en D-glucose, kunnen ook gebonden zijn op de xylanketen (Brillouet *et al.*, 1982; Shibuya & Iwasaki, 1985; Izydorczyk & Biliaderis, 1995). Op de O-5-positie van een arabinosyleenheid op de xylanketen kunnen hydroxykaneelzuren,

voornamelijk FA en p-coumarinezuren, veresterd zijn (Smith & Hartley, 1983; Maes & Delcour, 2002).

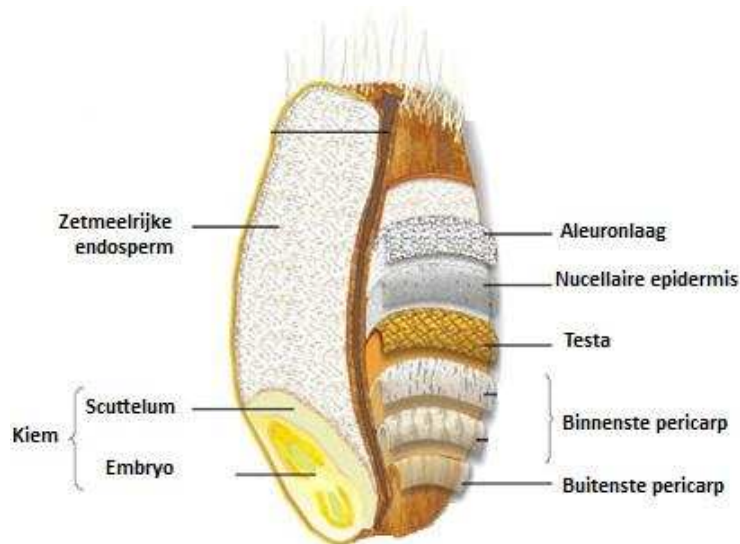
De verhouding van arabinose tot xylose (A/X-ratio) wordt de (gemiddelde) arabinose-substitutiegraad genoemd en geeft aan in welke mate de AX-keten vertakt is. De A/X-ratio en de verdeling arabinose op de xylanketen varieert in de tarwekorrel naargelang het weefsel (Izydorczyk & Dexter, 2008).



Figuur 2.1: Structurele elementen van arabinoxylan (AX): (a) niet-gesubstitueerde D-xylopyranosyl eenheid, (b) D-xylopyranosyl eenheid op de O-2 gesubstitueerd met een arabinofuranosyl eenheid, (c) monogesubstitueerd D-xylopyranosyl eenheid met op O-3-positie een arabinofuranosyl eenheid met ferulinezuur gebonden op de O-5-positie en (d) D-xylopyranosyl residu op de O-2- en O-3-positie gesubstitueerd met arabinofuranosyl eenheden (Courtin & Delcour, 2002).

2.1.2 Voorkomen van arabinoxylanen in de tarwekorrel

De tarweplant, waarvan *Triticum aestivum* L. en *Triticum durum* Desf. de meest gecultiveerde species zijn ter wereld, produceert eenzaadlobbige vruchten. De tarwekorrel is opgebouwd uit verschillende weefsels met elk een verschillende samenstelling en eigenschappen. De tarwekorrel bestaat uit de kiem, het endosperm en de (botanische) zemel (Figuur 2.2). De kiem bevat het embryo en scuttelum. Het endosperm kan verder opgedeeld worden in het zetmeelrijke endosperm en de aleuronlaag. De botanische zemel is opgebouwd uit het pericarp (vruchtwand), de testa (zaadhuid) en de nucellaire epidermis. Het pericarp omhult het gehele zaad en is zelf opgebouwd uit het buitenste pericarp en het binnenste pericarp. Tijdens het vermalen van de tarwekorrel zal het zetmeelrijke endosperm herleid worden tot bloem en gescheiden worden van de buitenste graanlagen, tarwezemel genoemd. In deze benaming wordt de aleuronlaag en een overblijfsel van het endosperm mee tot de tarwezemel beschouwd (Fincher & Stone, 1986; Antoine *et al.*, 2003; Saulnier *et al.*, 2007; Delcour & Hosenev, 2010).



Figuur 2.2: Opbouw van de tarwekorrel (naar Saulnier *et al.*, 2007).

Naast variaties in AX-samenstelling in verschillende gewassen, zal de AX-samenstelling sterk afhankelijk zijn van het weefseltype (Tabel 2.1). Cellen in het endospermweefsel zijn arm aan AX (ca. 2%). De cellen bevatten grote zetmeelrijke vacuolen, waarbij de celwanden rijk zijn aan AX (64%). De A/X-ratio van AX in tarwe endosperm varieert van 0,5 tot 0,9 (Mares & Stone, 1973; Barron *et al.*, 2007; Delcour & Hosney, 2010). De kiem bevat hogere hoeveelheden AX (ca. 11%) en deze AX verschillen sterk van de AX in het zetmeelrijke endosperm door hun hoge A/X-ratio (ca. 1,35) (Barron *et al.*, 2007). De zemel is voor ongeveer 20-25% opgebouwd uit AX, waarvan slechts 6% waterextraheerbaar is. Deze waterextraheerbare AX hebben een A/X-ratio van ca. 0,45 (Lequart *et al.*, 1999; Maes & Delcour, 2002; Amrein *et al.*, 2003).

Ook binnen de zemel zijn er echter grote verschillen in de samenstelling tussen de verschillende lagen. Uit onderzoek blijkt dat het buitenste pericarp opgebouwd is uit het hoogste gehalte aan AX (ca. 45%), terwijl de aleuronlaag het minst AX rijk is (ca. 20%). De eerst genoemde laag bevat tevens sterk gesubstitueerde AX (A/X-ratio = 1,20), met een hoog gehalte aan digesubstitueerde xylosyleenheden, in vergelijking met de aleuronlaag, de nucellaire epidermis en de testa (A/X-ratio < 0,5). Deze lagen hebben bovendien een lagere A/X-ratio dan het zetmeelrijke endosperm (Benamrouche *et al.*, 2002; Antoine *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2005; Barron *et al.*, 2007). Aangezien de tarwezemel een rijke bron is aan AX, is het interessant om tarwezemel te gebruiken voor de productie van AXOS (§ 3.1) (Maes & Delcour, 2002).

Tabel 2.1: De hoeveelheid arabinoxylan (% droge stof), de arabinosesubstitutiegraad en het gehalte aan fenolzuren ($\mu\text{g}/\text{mg}$) in de verschillende celwandweefsels van een tarwekorrel.

Weefsel	AX ¹ (% ds ²)	A/X-ratio ³	FA ⁴	diFA ⁵	Referentie
Kiem	11,3 - 11,5	1,3 - 1,4	0,3 - 3,5	< 1	1
Zetmeelrijke endosperm	1,5 - 2,3	0,5 - 0,9	< 0,1	< 1	1, 2
Aleuronlaag	17,6 - 23,9	0,3 - 0,5	6,5 - 9,0	< 1	1, 3, 4, 5
Binnenste pericarp + testa + nucellaire epidermis	37,4 - 40,1	0,3 - 0,4	4,7 - 6,0	< 1	1, 3, 4, 5
Buitenste pericarp	42,6 - 46,9	1,1 - 1,3	2,0 - 4,4	2,0 - 4,3	1, 3, 4, 5

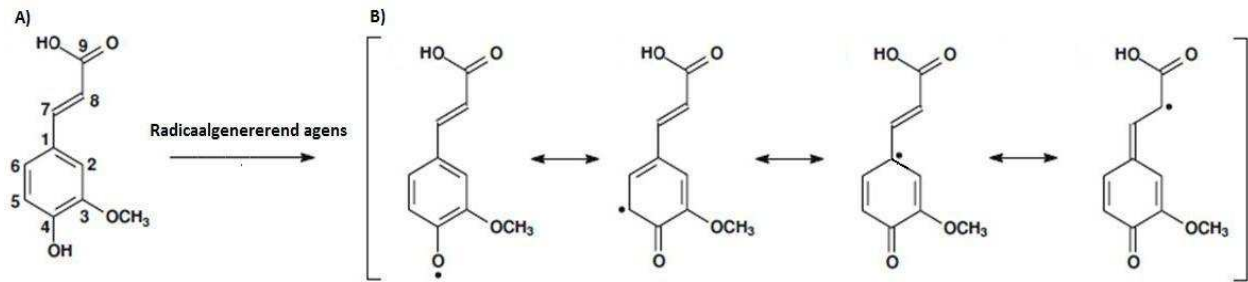
¹AX: arabinoxylan. ²ds: droge stof. ³A/X-ratio: arabinosesubstitutiegraad. ⁴FA: ferulinezuur. ⁵diFA: diferulinezuur. Referenties: 1: Barron *et al.*, 2007; 2: Saulnier *et al.*, 2007; 3: Antoine *et al.*, 2003; 4: Parker *et al.*, 2005; 5: Benamrouche *et al.*, 2002.

2.2 Ferulinezuur

FA is een fenolzuur dat aanwezig is in plantaardig materiaal en voornamelijk voorkomt in de zemel van granen, de schil van fruit en de wortels en pel van groenten (Zhao & Moghadasian, 2008). In tarwe is FA zelfs het meest voorkomende fenolzuur (Smith & Hartley, 1983; Iiyama *et al.*, 1990; Graf, 1992). FA is een intermediair metaboliet tijdens de biosynthese van lignine en heeft een structurele rol in de celwand van plantaardig materiaal. Tevens worden antioxidanteigenschappen toegeschreven aan FA, aangezien het molecuul door zijn door resonantie gestabiliseerde structuur dienst kan doen als een radicaalvangende molecuul (Graf, 1992).

2.2.1 Structuur en structurele rol van ferulinezuur

FA (3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-propeenzuur) (Figuur 2.3A) is een fenolzuur dat behoort tot de hydroxykaneelzuurderivaten (Graf, 1992). FA is een fenolische component met een hydroxyl- en methoxygroep gebonden op de aromatische ring en op de parapositie van hydroxylgroep bevindt zich een propeenzuurzijketen. In planten wordt FA gevormd vertrekkende van de aminozuren fenylalanine en tyrosine. FA komt voornamelijk voor in de *trans* vorm in plantenmateriaal (Graf, 1992). Er bestaat ook een *cis* vorm van FA die gevormd kan worden door isomerisatie onder invloed van UV licht tijdens opslag in waterig midden (Fenton *et al.*, 1978).



Figuur 2.3: A) chemische structuur van ferulinezuur, B) radicalair reactiemechanisme gebaseerd op Graf (1992).

De compositie van celwandcomponenten, zoals AX, pectine, lignine, cellulose en proteïnen, bepalen de structurele en functionele rol van de celwand. Hierbij speelt FA een belangrijke rol, daar deze celwandcomponenten verbonden kunnen zijn met een ester- of etherbinding aan respectievelijk de carboxyl- of fenolgroep van FA. Verknoping van deze componenten verhoogt de structurele celwandstevigheid (Scalbert *et al.*, 1985; Iiyama *et al.*, 1990; Iiyama *et al.*, 1994; Ishii, 1997; Hatfield *et al.*, 1999). Hierbij worden in aanwezigheid van een vrij radicaalgenererend agens (bijvoorbeeld een peroxidase in aanwezigheid van waterstofperoxide) tijdelijke fenoxylradicalen van FA gegenereerd (Figuur 2.3B) die met elkaar kunnen reageren ter vorming van diferulinezuur (*diferulic acid*, diFA) (Fry *et al.*, 2000). Daar FA meerdere reactieve plaatsen heeft, kunnen verschillende dimeren, waarvan het 8-5'-dimeer het meest voorkomende is, maar ook tri- en tetrameren van FA gevormd worden (Fry *et al.*, 2000; Bunzel *et al.*, 2003, 2005; Dobberstein & Bunzel, 2010).

2.2.2 Voorkomen van ferulinezuur in de tarwekorrel

Zoals hierboven al vermeld, is FA in verschillende plantaardig materialen te vinden. Het kan aanwezig zijn in vrije vorm of covalent gebonden aan AX, lignine of andere biopolymeren (Graf, 1992). Het gehalte aan vrij FA in granen is zeer laag tot verwaarloosbaar (0,1-0,5% van totale FA) (Li *et al.*, 2008; Zhao & Moghadasian, 2008).

FA komt in hogere concentraties voor in de zemellagen dan in het zetmeelrijke endosperm (<1 µg/g) (Tabel 2.1) (Barron *et al.*, 2007). De fenolzuren die aanwezig zijn in de zemellagen zijn voornamelijk (95%) FA (*trans* + *cis*) en dehydrodimeren van FA. De hoogste concentraties zijn te vinden in de aleuronlaag (6,5 - 9,0 µg/g). De aanwezigheid van hoge hoeveelheden diFA in het buitenste pericarp (2 - 4 µg/g) weerspiegelt de hoge graad van verknoping van de AX-ketens via FA en heeft een belangrijk effect op de functionele eigenschappen van de celwand (Antoine *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2005; Barron *et al.*, 2007). Ondanks het feit dat FA geassocieerd is met arabinose, valt er voor de verschillende weefsels geen verband te leggen tussen de A/X-ratio en het FA-gehalte (Tabel 2.1).

HOOFDSTUK 3

ARABINOXYLANOLIGOSACHARIDEN EN XYLANOLIGOSACHARIDEN

De laatste jaren is er meer interesse in de hydrolytische afbraakproducten van AX en xylan, respectievelijk AXOS en XOS, omwille van hun nutritionele eigenschappen (Broekaert *et al.*, 2011). AXOS bestaan hierbij uit een mengsel van arabinose gesubstitueerde en niet-arabinose gesubstitueerde XOS. Hydrolyse kan plaatsvinden bij de eigenlijke productie van XOS of AXOS ((A)XOS), maar ook tijdens de verwerking van graangebaseerde levensmiddelen of in het colon tijdens fermentatie van AX.

In dit hoofdstuk wordt er eerst dieper ingegaan op de productie van (A)XOS, waarna de prebiotische eigenschappen van (A)XOS beschreven worden. Vervolgens wordt ook aandacht besteed aan het effect van FA op de fermentatie van (A)XOS, aangezien dit een belangrijk aspect is in het onderzoek van dit proefschrift. In een laatste deel worden positieve fysiologische effecten ten gevolge van (A)XOS, en het hierbij geassocieerde FA, op het menselijk lichaam beschreven.

3.1 Productie

De productie van (A)XOS, vertrekkende van AX in de tarwekorrel of van AX-aangerijkte fracties zoals tarwezemel, kan zowel fysisch, enzymatisch als chemisch uitgevoerd worden (Kabel *et al.*, 2002a; Swennen *et al.*, 2006b; Akpinar *et al.*, 2009; Van Craeyveld *et al.*, 2009). Hieronder wordt er dieper ingegaan op deze drie productiemethoden.

Door extensieve **kogelmolenbehandeling** worden covalente bindingen van AX fysisch verbroken wat leidt tot de productie van AXOS. Deze methode laat toe AXOS met hoge A/X-ratio (0,65) te produceren. Door in te spelen op het toerental en vermalingstijd kan de ketenlengte van de geproduceerde AXOS gevarieerd worden (Van Craeyveld *et al.*, 2009).

Swennen *et al.* (2006b) ontwikkelden een **enzymbaseerde procedure** voor de productie van AXOS afkomstig van tarwezemelen op pilotschaal, zonder de nood aan een chemische voorbehandeling. Door opeenvolgende incubatie met hittestabiel α -amylase (Termamyl) en peptidase (Neutrase) en het wassen van de tarwezemelsuspensie worden respectievelijk zetmeel en proteïnen gehydrolyseerd en verwijderd. Vervolgens worden de tarwezemelen, die nog hoofdzakelijk

bestaan uit AX, verder geïncubeerd met β -D-1,4-endoxylanasen geproduceerd door *Bacillus subtilis*. Deze enzymen worden in het vervolg van het proefschrift endoxylanasen genoemd en werken *ad random* in op de hoofdketen door het hydrolyseren van de β -1,4-glycosydische bindingen van de xylanruggengraat, ter vorming van kleinere fragmenten die beter oplosbaar zijn (Biely, 1985). Na filtratie en koken, om enzymen te denatureren, wordt er een oplossing verkregen van AXOS. Voor een verdere opzuivering wordt er ook een ionuitwisseling toegepast om mineralen te verwijderen (Swennen *et al.*, 2006b). Naast het vermijden van gebruik van chemicaliën, biedt deze methode het voordeel dat arabinose geboden blijft tijdens de procedure en dat door wijziging van reactiecondities (enzymconcentratie, incubatietijd en – temperatuur) AXOS met verschillende structurele eigenschappen geproduceerd kunnen worden. De aanwezigheid van arabinosesubstitutie verlaagt echter wel de efficiëntie van de enzymatische hydrolyse van plantcelwanden en bijgevolg de (A)XOS opbrengst (Lequart *et al.*, 1999; Benamrouche *et al.*, 2002; Maes *et al.*, 2004).

(A)XOS worden ook geproduceerd door **hydrothermale behandeling** of **autohydrolyse**. Hierbij wordt een waterige oplossing van tarwezemelen eerst thermisch voorbehandeld, waarbij zetmeel in oplossing gaat en verwijderd wordt. Vervolgens wordt de temperatuur opgedreven tot 200 – 220 °C, waardoor water ioniseert ter vorming van H_3O^+ . Dit kation zal zorgen voor de depolymerisatie en deacetylatie van de xylanketen, waarbij het vrijzetten van azijnzuur de oplossing verder aanzuurt (Garrote *et al.*, 2002; Kabel *et al.*, 2002a; Rose & Inglett, 2010). Deze drastische methode zorgt echter voor de productie van XOS, in plaats van AXOS (Kabel *et al.*, 2002a), daar de α -binding tussen arabinofuranosyl en xylose-eenheid minder stabiel is dan de β -1,4-binding tussen de xylose-eenheden onderling (Voragen, 1998). Ook wordt er in dit proces een grote variëteit aan ongewenste componenten gevormd, waardoor uitgebreide zuivering noodzakelijk is (Garrote *et al.*, 2002; Kabel *et al.*, 2002a).

3.2 Prebiotische eigenschappen van (arabino-) xylanoligosacchariden

Recent zijn (A)XOS voorgesteld als nieuwe prebiotica (Grootaert *et al.*, 2007). Vooraleer deze als prebiotica beschouwd kunnen worden, moeten ze voldoen aan de in § 1.3 beschreven criteria.

3.2.1 Resistentie tegen maagzuur, hydrolyse door humane enzymen en gastro-intestinale absorptie

Opdat prebiotica de dikke darm kunnen bereiken, is het noodzakelijk dat ze niet gedegradeerd worden door maagzuur en humane enzymen of geabsorbeerd worden gedurende het traject doorheen het gastro-intestinaal stelsel. Onderzoek toont aan dat hydrolyse van de

glycosidische β -bindingen van de AXOS ruggengraat bij pH 2,0 en 37 °C, condities relevant voor het nabootsen van de maag, slechts na drie dagen optreedt. Na één dag wordt er wel reeds hydrolyse van de zwakkere α -bindingen, waarmee de arabinose-eenheden gebonden zijn aan de xylanketen, vastgesteld (Voragen, 1998; Courtin *et al.*, 2009). Deze tijdspanne is echter langer dan de verblijftijd in de maag. Verder in het darmstelsel wordt er een minder zuur milieu gecreëerd (pH > 5).

AXOS zijn degradeerbaar door inwerking van verschillende enzymen (Biely, 1985). Sleutelenzymen in deze afbraak zijn endoxylanasen (§ 3.1). Daarnaast spelen ook β -xylosidasen, α -L-arabinofuranosidasen en ferulinezuuresterasen, die in het verdere vervolg van dit proefschrift respectievelijk xylosidase, arabinofuranosidase en FAE genoemd worden, een rol in de verdere afbraak van AXOS. Xylosidasen verwijderen xylose-eenheden van het niet-reducerende uiteinde van de AXOS-keten (Biely, 1985). Arabinofuranosidasen splitsen de α -binding waarmee arabinose gelinkt is aan de xylose ruggengraat en FAE zetten FA vrij door het breken van de esterbinding met arabinose (Grootaert *et al.*, 2007). Het voorkomen van menselijke enzymen met de hier omschreven werking, werd nog niet beschreven (Holloway *et al.*, 1980; Englyst & Cummings, 1985; Grootaert *et al.*, 2007; Broekaert *et al.*, 2011).

Substanties die tijdens de vertering geabsorbeerd worden in de maag of dunne darm zullen de dikke darm niet bereiken om daar door micro-organismen gefermenteerd te worden. Een *in vitro* experiment toonde aan dat zowel lage DP AXOS als complexe hoge DP AXOS nagenoeg niet verteerd worden onder condities die de maag en dunne darm nabootsen (Sanchez *et al.*, 2009). Verder vindt er ook geen absorptie van (A)XOS plaats ter hoogte van de maag en dunne darm (Holloway *et al.*, 1980; Sandberg *et al.*, 1981; Englyst & Cummings, 1985). Hieruit kan geconcludeerd worden dat (A)XOS nagenoeg intact het menselijk colon bereiken.

3.2.2 Fermentatie door darmmicro-organismen

De fermenteerbaarheid van (A)XOS wordt geëvalueerd op basis van de degradeerbaarheid van de keten, de productie van KKVZ, melkzuur en gasen (CO₂ en H₂) en de verminderde aanwezigheid van toxische componenten (ammoniak, *p*-cresol, amines en thiolen) (Broekaert *et al.*, 2011).

(A)XOS kunnen gefermenteerd worden door micro-organismen aanwezig in het colon. De belangrijkste koolhydraatfermenterende species in het colon behoren tot de genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* en *Clostridium* (Gibson & Roberfroid, 1995). Deze micro-organismen beschikken, in tegenstelling tot de mens, wel over de in § 3.2.1 beschreven enzymen die geschikt zijn voor degradatie van (A)XOS. Daar micro-organismen hoge DP (A)XOS niet kunnen opnemen, produceren ze extracellulaire endoxylanasen die het polymeer

degraderen tot kleinere oligo- en monosachariden (Biely, 1985). Deze producten kunnen door de microbiota opgenomen worden of in het medium achterblijven en gebruikt worden door micro-organismen die geen endoxylanasen bezitten. In de cel worden AXOS door xylosidase en arabinofuranosidase activiteit afgebroken tot monosachariden en verder gefermenteerd tot KKVZ. In aanwezigheid van glucose treedt er repressie op van de enzymactiviteit van endoxylanasen, arabinofuranosidase en xylosidasen. Bijgevolg is de activiteit van AXOS degraderende enzymen lager in het proximale colon (Biely, 1985; Kulkarni *et al.*, 1999; Grootaert *et al.*, 2009). Verder hebben de DP en A/X-ratio een invloed op de fermenteerbaarheid van de AXOS-keten. Talrijke *in vitro* fermentatie studies werden uitgevoerd om deze invloeden te onderzoeken.

Een hogere **DP** gaat gepaard met een tragere fermentatie van (A)XOS doorheen het darmstelsel, waardoor deze koolhydraten nog aanwezig kunnen zijn in het distale deel van het colon en daar de proteolytische activiteit veranderen in een meer sacharolytisch metabolisme. Fermentatie van hoge DP (A)XOS zorgt bijgevolg voor een sterkere daling in de productie van fenol, p-cresol en vertakte KKVZ en hogere productie van lineaire KKVZ in het distale colon in vergelijking met lage DP (A)XOS (Glitsø *et al.*, 1999; Cloetens *et al.*, 2008; Van Craeyveld *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2009). Terwijl (A)XOS met lage DP (DP < 5) eerder een stijging in azijnzuur- en boterzuurconcentraties teweeg brengen (Van Craeyveld *et al.*, 2008), zorgt fermentatie van hoge DP (A)XOS voor een sterke azijnzuur- en propionzuurproductie (Lopez *et al.*, 1999; Hopkins *et al.*, 2003). Dit toont aan dat de aanwezigheid van dergelijke moeilijk fermenteerbare koolhydraten in het distale colon de gezondheid van de gastheer gunstig beïnvloedt.

Ten tweede kan de **arabinosesubstitutie** de AXOS fermentatie beïnvloeden. De aanwezigheid van arabinose beschermt fysisch de xylanketen tegen xylanolytische bacteriën door plaatselijk de enzymactiviteit te hinderen (Karppinen *et al.*, 2000). Een lage substitutiegraad zorgt bijgevolg voor een meer uitgesproken fermentatie (Amrein *et al.*, 2003; Damen *et al.*, 2011). Degraderatie van AXOS resulteert in een verhoging van de A/X-ratio van de niet-gefermenteerde fractie, waaruit afgeleid kan worden dat fracties met een hoge A/X-ratio moeilijker degradeerbaar zijn en degradatie ervan meer in het distale colon zal plaatsvinden (Glitsø *et al.*, 1999; Karppinen *et al.*, 2000; Amrein *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2004; Damen *et al.*, 2011). Andere onderzoeken tonen echter aan dat de fermentatiesnelheid van AXOS (met gelijkaardige DP) zeer gelijkend is en de aanwezigheid van arabinose bijgevolg geen invloed heeft op de fermenteerbaarheid (Kabel *et al.*, 2002b; Van Craeyveld *et al.*, 2008). De verschillende bevindingen kunnen mogelijks verklaard worden door de onderzochte A/X-ratio's, waarbij een negatieve impact op de fermenteerbaarheid van AXOS slechts optreedt bij een A/X-ratio hoger dan 1,0 (Van Craeyveld *et al.*, 2008).

AXOS met verschillende DP en A/X-ratio kunnen gefermenteerd worden door microbiota met productie van KKVZ die resulteren in positieve effecten voor de menselijke gezondheid. Dit effect kan

verlengd worden tot het distale deel van het colon door gebruik te maken van AXOS met hoge DP. Naast de invloed van chemische structuur van AX, zal ook de aanwezige microbiële populatie de degradeerbaarheid van AXOS beïnvloeden (Glitsø *et al.*, 1999; Hopkins *et al.*, 2003).

3.2.3 Selectief stimuleren van de groei en/of activiteit van darmmicro-organismen die geassocieerd zijn met gezondheid en welzijn

Een belangrijk criterium voor het prebiotische effect van (A)XOS is dat ze de groei van gezondheidsbevorderende bacteriën stimuleren. Met behulp van microbiële technieken, zoals onder andere denaturerende gradiënt gelelektroforese en kwantitatieve polymerase ketenreactie, is het mogelijk veranderingen in de microbiële gemeenschap te analyseren. Uit onderzoek blijkt dat (A)XOS als een selectief substraat werken, daar het gefermenteerd kan worden door gezondheidsbevorderende bacteriën behorende tot *Bifidobacterium* species. Ook een aantal *Bacteroides* en *Lactobacillus* species zijn hiertoe in staat, weliswaar minder efficiënt. Andere darmbacteriën zoals *E. coli*, *Enterococci* en een aantal *Clostridium* species, die vaak als slecht voor de gezondheid beschouwd worden, kunnen (A)XOS slechts weinig of niet fermenteren (Van Laere *et al.*, 2000; Crittenden *et al.*, 2002; Vardakou *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2009; Broekaert *et al.*, 2011).

Bifidobacterium en *Lactobacillus* species bezitten enzymen om (A)XOS, maar geen AX, efficiënt te gebruiken (Van Laere *et al.*, 2000; Crittenden *et al.*, 2002; Hopkins *et al.*, 2003; Vardakou *et al.*, 2007; Van Craeyveld *et al.*, 2008; Broekaert *et al.*, 2011). Productie van azijnzuur en melkzuur tijdens (A)XOS fermentatie, maar niet bij de fermentatie van AX, wijst op de directe betrokkenheid van bifidobacteriën, die deze twee KKVZ produceren (Kabel *et al.*, 2002b; Hopkins *et al.*, 2003; Broekaert *et al.*, 2011). Polymeer AX zal eerst gefermenteerd moeten worden door *Roseburia* en *Bacteroides* species die extracellulaire endoxylasanen produceren, vooraleer het verder gefermenteerd kan worden door andere bacteriën (Chassard *et al.*, 2007).

AX zijn dus slechts weinig of niet bifidogeen, terwijl hun hydrolyseproducten de groei en/of activiteit van *Bifidobacterium* species stimuleren (Sanchez *et al.*, 2009; Cloetens *et al.*, 2010).

3.3 De biobeschikbaarheid van ferulinezuur en zijn invloed op de fermentatie van AX(OS)

De matrix waarin FA voorkomt heeft een aanzienlijke invloed op de biobeschikbaarheid van FA in het lichaam. *Vice versa* heeft FA ook een impact op de hydrolytische afbraak van FA gebonden structuren en kan ook vrij FA inhiberend werken op enzymen. Naast de verminderde enzymactiviteit, kan FA ook een toxisch effect uitoefenen op de microbiota.

3.3.1 Biobeschikbaarheid van ferulinezuur

FA, ingenomen via de voeding, zou door zijn antioxidantcapaciteit gezondheidsbevorderende effecten hebben bij de mens. Hiervoor is het echter noodzakelijk dat deze componenten biobeschikbaar zijn (Adam *et al.*, 2002).

In de tarwekorrel is slechts een klein deel van FA in **vrije vorm** aanwezig. Vrije FA kan gemakkelijk opgenomen worden in het ganse gastrointestinaal stelsel, waarbij absorptie voornamelijk plaats vindt in de maag. Na opname circuleert FA in de bloedbaan doorheen het lichaam en wordt het verder gemetaboliseerd (conjugatie met glucuronzuur en/of sulfaat) door de lever. Dit conjugaat zal vervolgens via de urine uitgescheiden worden (Adam *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2003; Zhao & Moghadasian, 2008).

FA is voornamelijk aanwezig in de zemel, waar het als **estergebonden** aan koolhydraten en andere celwandcomponenten voorkomt. Daar er amper menselijke FAE voorkomen in het lichaam, is bio toegankelijkheid FA in deze zemelmatrix zeer laag en is de biobeschikbaarheid van FA bijgevolg gelimiteerd (Anson *et al.*, 2009b). Gebonden FA in de zemelmatrix zal onveranderd het colon bereiken, waar het gefermenteerd kan worden door de werking van bacteriële FAE. Hierdoor zal de biobeschikbaarheid van deze fenolzuren verbeteren, hoewel nog steeds een deel van het gebonden FA niet toegankelijk zal zijn voor afbraak en dus onveranderd uitgescheiden wordt (Saura-Calixto *et al.*, 2007; Anson *et al.*, 2009a). In het colon vrijgestelde FA en diFA worden snel gemetaboliseerd door micro-organismen en/of geabsorbeerd door de darmwand (Kroon *et al.*, 1997; Andreasen *et al.*, 2001b; Zhao & Moghadasian, 2008). Het vrijgestelde FA is echter wel lang genoeg in het lichaam aanwezig om zijn antioxidantwerking uit te oefenen (§ 3.4.2) (Srinivasan *et al.*, 2007; Saura-Calixto, 2011). Tijdens microbiële transformatie zal FA hydrogenatie, demethylatie en dehydroxylatie ondergaan ter vorming van voornamelijk 3,4-dihydroxyfenylpropionzuur, 3-hydroxyfenylpropionzuur en 3-fenylpropionzuur (Russell *et al.*, 2008; Anson *et al.*, 2009a).

3.3.2 Invloed van ferulinezuur op enzymatische afbraak

In de tarwekorrel komt FA bijna uitsluitend voor als estergebonden aan celwandpolymeren waar ze bijdragen tot de celwandstevigheid door oxidatieve verknoping van verschillende celwandcomponenten (§ 2.2.1) (Scalbert *et al.*, 1985).

Ten eerste geeft FA-verknoping aanleiding tot dichtere structuren waardoor het de **toegankelijkheid** van hydrolytische enzymen verlaagt (Iiyama *et al.*, 1994; Grabber *et al.*, 1998; Lequart *et al.*, 1999). Dit resulteert in een verminderde degradeerbaarheid door micro-organismen en een verlaagde absorptie in het colon (Andreasen *et al.*, 2001a). FA-verknoopte AX en niet-verknoopte AX die in het gastro-intestinaal stelsel terecht komen, zullen minder eenvoudig

gedegradeerd worden door endoxylanasen ter vorming van oplosbare AXOS (Adam *et al.*, 2002; Zhao & Moghadasian, 2008). AX dienen echter in oplossing te zijn voor efficiënte werking van FAE (Grabber *et al.*, 1998; Andreasen *et al.*, 2001a). Naargelang het type FAE kunnen monomere FA en/of diFA vrijgesteld worden (Andreasen *et al.*, 2001b). Na vrijzetting van FA van de arabinosezijketens kan verdere enzymatische afbraak plaatsvinden (Kroon *et al.*, 1997). FA-verknoping heeft bijgevolg een belangrijke impact op de snelheid en de mate waarin AX(OS) gefermenteerd kunnen worden (Bunzel *et al.*, 2001).

Ten tweede kunnen fenolzuren de enzymatische hydrolyse en fermentatie inhiberen door **complexatie** van enzymen aanwezig in het colon. Fenolische componenten kunnen interageren met het enzym ter vorming van een inactief enzym-inhibitorcomplex. Het betreffen voornamelijk de residu's, gelegen aan het oppervlak van het enzym, die zullen interageren met fenolzuren via een hydrofobe interactie of waterstofbrugvorming. Het enzym ondergaat dan een conformationele verandering waardoor het zijn enzymactiviteit verliest (Rohn *et al.*, 2002; Boukari *et al.*, 2011).

3.3.3 Invloed van ferulinezuur op darmbacteriën

Fenolische componenten zouden ook selectief de groei van een aantal micro-organismen kunnen onderdrukken en zo leiden tot een verminderde fermentatie van (A)XOS. Bij opname zullen fenolzuren dissociëren waardoor de celmembraanpotentialiaal verandert en het membraan meer permeabel wordt. Verder wordt de adenosinetrifosfaat (ATP) synthese beïnvloed door een verstoorde werking van de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase pomp. Grampositieve bacteriën zijn door het ontbreken van een buitenmembraan meer gevoelig aan de aanwezigheid van fenolzuren in het medium (Cueva *et al.*, 2010; Merkl *et al.*, 2010). De antimicrobiële werking van fenolzuren wordt bepaald door de pK_a -waarde en de chemische structuur (het aantal en de posities van substituenten op de benzeenring en de gesatureerde ketenlengte), die een invloed heeft op het lipofiel karakter van het molecule (Cueva *et al.*, 2010; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011). De invloed van fenolzuren op de groei van darmbacteriën is verder nog afhankelijk van het micro-organisme en de gebruikte concentratie (Yuan *et al.*, 2005b). Onderzoek toonde aan dat fenolzuren een inhiberende werking hebben op de groei van *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Listeria* en een aantal *Lactobacillus* en *Bacteroides* species, maar dat ze de groei van een aantal andere *Bacteroides* en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* en *Pseudomonas* species niet beïnvloeden of zelfs stimuleren (Hopkins *et al.*, 2003; Koo & Cho, 2004; Lee *et al.*, 2006; Cueva *et al.*, 2010; Merkl *et al.*, 2010; Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011). Sommige lactobacillen zijn zelfs in staat om fenolzuren te metaboliseren (Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011). Het bifidogeen effect van AXOS wordt dus niet onderdrukt door de aanwezigheid van FA (Yuan *et al.*, 2005b). Verder onderzoek is nodig naar het mogelijke negatieve effect *in vivo* van gebonden of vrijgezet FA op de microbiota.

3.4 Mogelijke gezondheidsgerelateerde effecten van AXOS

Epidemiologische studies suggereren een verband tussen de consumptie van volkoren producten en de preventie van chronische aandoeningen zoals verschillende vormen van kanker, cardiovasculaire aandoeningen, neurodegeneratieve ziekten, ... Het gezondheidsbevorderend effect, verkregen door inname van vezelrijke producten, wordt vaak toegewezen aan de dieetvezelfractie of hiermee geassocieerde componenten, zoals FA. Hieronder wordt er dieper ingegaan op de therapeutische eigenschappen die geferuloyleerde AXOS kunnen bieden, waarbij het interessant is te kijken naar zowel de prebiotische effecten als de antioxidanteigenschappen (Broekaert *et al.*, 2011).

3.4.1 Gezondheidsgerelateerde effecten van prebiotische (A)XOS

Gezondheidsvoordelen die gerelateerd zijn aan prebiotica zijn grotendeels te wijten aan hun fermentatieproducten, de KKVZ. Deze worden geassocieerd met een verbeterde minerale absorptie, vetzuurmetabolisme, glucosemetabolisme en immuunsysteem en een verminderd risico op colonkanker.

Als eerste gezondheidseffect zouden KKVZ zorgen voor een verbeterde **absorptie** van calcium-, magnesium- en ijzerionen. Slechts een deel van de mineralen uit de voeding zal opgenomen worden in de dunne darm, het overige deel zal accumuleren in de dikke darm onder de vorm van onoplosbaar calciumfosfaat. Hoge concentraties KKVZ verhogen de darmzuurtegraad en verbeteren zo de oplosbaarheid en bijgevolg de biobeschikbaarheid van mineralen (Lopez *et al.*, 1999).

Ten tweede spelen (A)XOS een rol in de regulatie van het **vetzuurmetabolisme**, daar ze de serum triacylglyceriden- en cholesterolconcentraties, die geassocieerd worden met hart- en vaatziekten, kunnen reduceren (Lopez *et al.*, 1999; Broekaert *et al.*, 2011). Mechanismen voor deze effecten zijn nog niet helemaal begrepen. Een verklaring zou liggen bij de door fermentatie geproduceerde KKVZ. Propionzuur inhibeert namelijk het cholesterolmetabolisme en lipogenese in de lever. Azijnzuur echter stimuleert deze reactiewegen (Swennen *et al.*, 2006a; Wong *et al.*, 2006). Daar de fermentatie van AXOS de azijnzuur/propionzuur verhouding verlaagt (Kabel *et al.*, 2002b), zouden deze substraten mogelijk het risico op cardiovasculaire aandoeningen kunnen verlagen.

Vervolgens is er aangetoond dat (A)XOS een rol spelen in het **glucosemetabolisme**, meer bepaald zouden ze de glycemische controle verbeteren daar werd vastgesteld dat ze de glucose- en insulineniveaus in het bloed verlagen na een maaltijd bij zowel gezonde als Type-II diabetespatiënten (Lu *et al.*, 2004). Bovendien zou propionzuur de gluconeogenese verminderen en de glycolyse in de lever stimuleren (Swennen *et al.*, 2006a).

Een ander gezondheidsbevorderende effect van AX is het beïnvloeden van het mucosale **immuunsysteem** in de darm door het verhogen van de immuunrespons (verhoogde interleukine-2 en

interferon- γ productie) (Ogawa *et al.*, 2005). Melkzuurbacteriën, waarvan hun groei gestimuleerd wordt door fermentatie van (A)XOS, zouden de darmepitheelcellen kunnen binnendringen en leiden tot activatie van het lymfweefsel (Manning & Gibson, 2004).

Dierenstudies suggereren dat het dieet een grote rol zou spelen in de ontwikkeling van **darmkanker**. Verlaagde concentraties dieetvezel worden geassocieerd met een verhoogd risico op darmkanker (Mitsuoka, 1996). Zoals eerder gezegd kan het dieet veranderingen aanbrengen in de samenstelling van de darmmicrobiota. Het potentieel kankerreducerend effect van (A)XOS is meervoudig. De fermentatie van (A)XOS zou leiden tot (i) een verlaagde proteïnefermentatie en de hiermee geassocieerde productie van toxische componenten (Cummings & Macfarlane, 1991; Cloetens *et al.*, 2008), (ii) een toegenomen groei van gezondheidsbevorderende bacteriën, die carcinogenen kunnen detoxifiëren (Mitsuoka, 1996; Van Laere *et al.*, 2000) en (iii) een verhoogde productie van KKVZ (Van Craeyveld *et al.*, 2008). Het aanzurend effect van deze KKVZ zorgt voor een verminderde productie van procarcinogenen door een inhiberende werking op de groei van *Bacteroides* en *Clostridium* en een verminderde ammoniumabsorptie door protonatie (Wong *et al.*, 2006). Boterzuur oefent bijgevolg een inhiberende werking uit op de groei van carcinoomcellen via inhibitie van de celproliferatie (Wong *et al.*, 2006).

Naast de bovenstaande gezondheidsvoordelen zijn er ook **ongewenste effecten** gerapporteerd bij inname van (A)XOS, zoals laxatieve gevolgen, flatulentie en darmkrampen. Het voorkomen en de ernst van deze effecten zijn dosis- en persoonsafhankelijk (Grasten *et al.*, 2003; Swennen *et al.*, 2006a).

Belangrijk is op te merken dat deze resultaten meestal verkregen zijn door gebruik te maken van *in vitro* studies of dierenproeven en het bewijs voor effecten op de gezondheid van de mens meestal niet onweerlegbaar is. Verder wordt de inname van deze prebiotische middelen slechts op 'korte perioden' opgevolgd en zijn de effecten op lange termijn moeilijk aan te tonen, terwijl bovenstaande aandoeningen wel lange termijn ziekten zijn.

Ondanks het groeiend bewijs van de gezondheidsbevorderende effecten van prebiotica, zijn alle gezondheidsclaims hieromtrent geweigerd door EFSA. Desalniettemin is er een gezondheidsclaim voor tarwezemel in relatie met een verhoogde fecale bulk en reductie in darmtransittijd goedgekeurd (EFSA, 2010). Verder is er ook een claim omtrent AX goedgekeurd. Inname van tarwe endosperm AX (8 g/100 g van beschikbare koolhydraten) vermindert de post-prandiale glycaemische respons (EFSA, 2011).

3.4.2 Gezondheidsgerelateerde effecten van ferulinezuur

Één van de best bestudeerde activiteiten van FA is zijn **antioxidantcapaciteit**. FA heeft dit te danken aan zijn mogelijkheid om door botsing met een radicaal R^{\bullet} een door resonantie gestabiliseerd

fenoxylradicaal te vormen na abstractie van een waterstofatoom op de 4-hydroxylgroep. Dit produceert een niet-radicalair product RH en een fenoxylradicaal dat meer stabiel is dan het origineel radicaal daar het radicalair elektron over het hele molecuul gedelokaliseerd kan worden (Figuur 2.3). Door condensatie met een ander radicaal vindt terminatie van het radicaal-ketenmechanisme plaats (Graf, 1992; Yuan *et al.*, 2005a; Srinivasan *et al.*, 2007).

FA kan omwille van bovenstaande mechanisme een bescherming bieden tegen verschillende **oxidatieve stress gerelateerde aandoeningen** (Zhao & Moghadasian, 2008). Onderzoek in dierenstudies en *in vitro* studies suggereert dat vrij FA een inhiberende werking zou uitoefenen tegen carcinogenesis. Vrije radicalen en reactieve zuurstofspecies worden aanzien als een belangrijke factor in het ontstaan van kankers door het veroorzaken van oxidatieve schade aan kritische cellulaire moleculen (DNA, proteïnen en lipiden) (Graf, 1992; Srinivasan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Antioxidanten, zoals FA, kunnen hier tegen optreden. Daarnaast verminderen AXOS de door koperionen geïnduceerde vetoxidatie van *low density lipoproteins* (LDL), en dit zelfs sterker dan vrij FA (Ohta *et al.*, 1997; Katapodis *et al.*, 2003). Vervolgens zou vrij FA een reductie in LDL-cholesterol, triacylglycerolen, fosfolipiden, ... teweegbrengen door het verlagen van de activiteit van bepaalde enzymen (Graf, 1992; Srinivasan *et al.*, 2007). FA rijke AXOS zouden tevens een bescherming kunnen bieden tegen oxidatieve stress in diabetische ratten door het verlagen van de bloedglucose niveaus in vergelijking met natriumferulaat en vitamine C (Ou, S. *et al.*, 2007).

Verder zou FA ook een bescherming bieden tegen **neurodegeneratieve ziekten** zoals de ziekte van Alzheimer. Deze ziekten worden gerelateerd met oxidatieve stress door vrije radicalen, aangezien deze radicalen kunnen zorgen voor neuronale disfunctie. FA vermindert bijgevolg hersenschade door het vangen van deze vrije radicalen (Srinivasan *et al.*, 2007).

Ook kan FA, door zijn antioxidantpotentieel, zorgen voor het verzachten van de **schadelijke effecten van UV-licht**. Door de aanwezigheid van meerdere geconjugeerde dubbele bindingen kan het UV-stralen absorberen, waardoor de vorming van een stabiel fenoxylradicaal gekatalyseerd wordt. Na toevoeging van een waterstofatoom op het C-8 atoom, wordt er een mengsel van *cis*- en *trans*-FA bekomen. Dit mechanisme zorgt voor de inhibitie van de isomerisatie van andere componenten en beschermt zo lichtgevoelige componenten tegen oxidatieve schade (Graf, 1992). Door zijn UV- absorberende eigenschappen, wordt FA aanzien als belangrijke fotoprotectie van de huid (Graf, 1992).

Er dient opgemerkt te worden dat de preventieve en therapeutische werkzaamheid van FA echter afhankelijk is van zijn fysiologische concentraties, wat bepaald wordt door de absorptie en metabolisatie van FA in het lichaam (Zhao & Moghadasian, 2008).

DEEL 2

EXPERIMENTEEL WERK

HOOFDSTUK 4

AANMAAK EN STRUCTURELE KARAKTERISERING VAN EEN SET VAN XOS EN AXOS STALEN

4.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt een set van XOS en AXOS stalen structureel gekarakteriseerd en de chemische samenstelling ervan besproken. Hierbij werden twee reeksen AXOS aangemaakt die voornamelijk verschillen in hun FA samenstelling. Deze stalen werden verder gebruikt om de impact van FA op antioxidanteigenschappen (Hoofdstuk 5) en het prebiotische potentieel van AXOS (Hoofdstuk 6) te bestuderen. Daarnaast werden twee XOS stalen toegevoegd aan deze set stalen om de invloed van de DP van XOS op hun prebiotisch potentieel (Hoofdstuk 6) te onderzoeken.

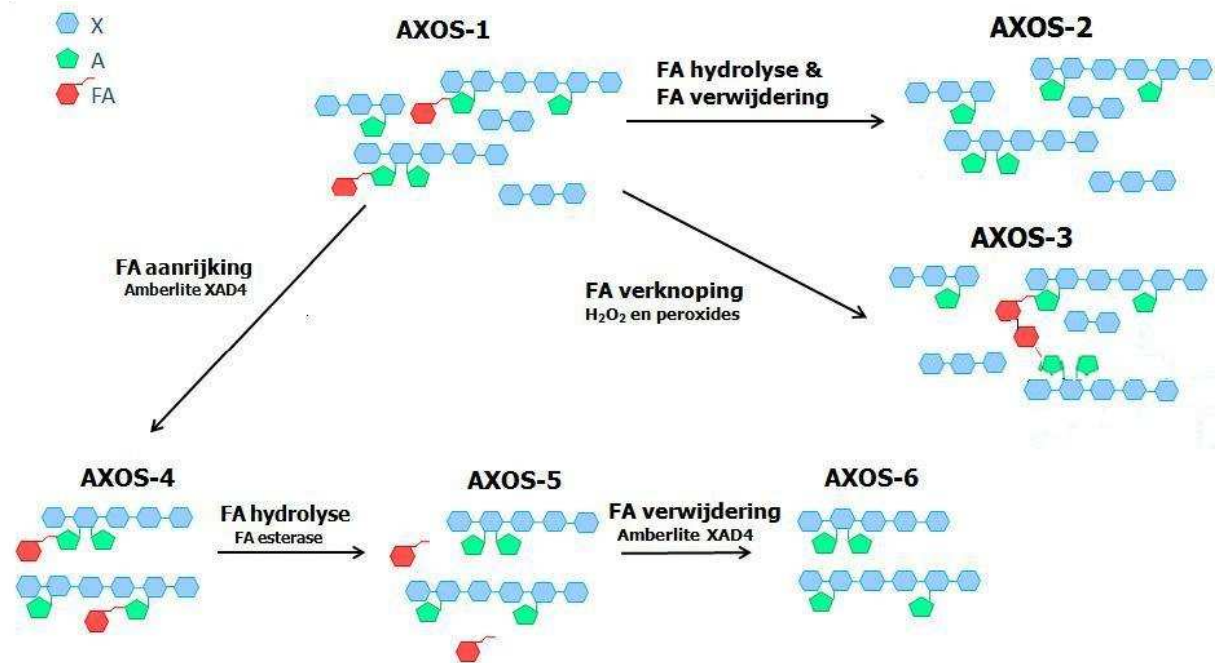
4.2 Materialen

De gebruikte reagentia en chemicaliën waren van analytische graad en afkomstig van Sigma-Aldrich (Bornem, België), tenzij anders vermeld. In dit proefschrift werd er gebruik gemaakt van lage DP XOS (Shandong Longlive Bio-technology Co., Ltd, Qingdao, China), hoge DP XOS (Megazyme, Bray, Ireland) en AXOS-1 (Fugeia NV, Leuven, België).

4.3 Methoden

4.3.1 Aanmaak van AXOS

In Figuur 4.1 wordt een schematisch overzicht gegeven van de aanmaak van AXOS-2 tot AXOS-6. Om de invloed van FA op fermentatie te onderzoeken werden drie AXOS stalen bereid met eenzelfde suikerstructuur die enkel verschillen in hoeveelheid vrij en gebonden FA: gebonden FA rijke AXOS (**AXOS-4**), vrij FA rijke AXOS (**AXOS-5**) en FA arme AXOS (**AXOS-6**). Hierbij werd AXOS-4 eerst aangemaakt vertrekkende van (**AXOS-1**) door aanrijking in FA. Verder werd AXOS-1 gebruikt voor de aanmaak van twee andere AXOS stalen, namelijk een AXOS staal arm aan FA (**AXOS-2**) en een FA-verknoopt AXOS staal (**AXOS-3**). De FA aanrijking zal uitgebreider besproken worden in het resultatengedeelte (§ 4.4.1).



Figuur 4.1: Schematisch overzicht van de aanmaak van AXOS-2 tot en met AXOS-6 vertrekkende van AXOS-1 door FA aanrijking, FA verknoping, FA hydrolyse en/of FA verwijdering.

FA aanrijking werd uitgevoerd met behulp van een Amberlite XAD-4, een polymerisch resin met affiniteit voor fenolische componenten, kolom. AXOS-1 werden opgelost in water (125 g/l) en op de kolom gebracht. Daarna werd er achtereenvolgens geëluëerd met water, ethanol-water (10/90, v/v) en ethanol-water (50/50, v/v) en hogere concentratie van ethanol. De verschillende fracties werden per eluent afzonderlijk opgevangen. Ethanol werd verwijderd met behulp van een rotavap (Rotavapor R3000 Büchi Labortechnik AG, Flawil, Zwitserland) en de verschillende fracties werden gevriesdroogd en gebruikt voor verdere analyse.

Om een staal te **verarmen** aan FA werd FA eerst enzymatische gehydrolyseerd, met behulp van FAE, en vervolgens verwijderd, door gebruik te maken van een Amberlite XAD-4 kolom. In een eerste stap werd een waterige oplossing van AXOS (5 g/100 ml) op 50 °C gebracht en geïncubeerd met een overmaat FAE gedurende 24 uur. Nadien werd het FAE hittegeïnactiveerd bij 100 °C gedurende 15 minuten. Een deel van dit staal werd vervolgens gevriesdroogd. In een tweede stap werd FA verwijderd door de oplossing opnieuw over een Amberlite XAD-4 kolom te brengen. Nadien werd opeenvolgend geëluëerd met water en ethanol-water (10/90, v/v), ethanol-water (50/50, v/v) en hogere concentratie van ethanol. De niet-geadsorbeerde, water en ethanol-water (10/90, v/v) geëluëerde fracties vormden een FA arme fractie en werden gecombineerd en gevriesdroogd. Op basis van deze FA verarming werden AXOS-2 aangemaakt vertrekkende van AXOS-1. Wanneer gestart werd van AXOS-4, rijk aan gebonden FA, werden door enkel de enzymatisch FA hydrolyse AXOS-5, rijk aan vrij FA, bekomen. AXOS-6 werden vervolgens aangemaakt door uit AXOS-5 FA te verwijderen met behulp van de Amberlite XAD-4 kolom.

Ten derde werd ook een **verknoping** van FA gerealiseerd door FA radicalair te koppelen aan elkaar met behulp van een overmaat waterstofperoxide en mierikswortel peroxidase. Nadien werd de overmaat waterstofperoxide omgezet tot water en zuurstof met behulp van een catalase en werden de enzymen hittegeïnactiveerd. Op deze manier werden AXOS-3 uit AXOS-1 aangemaakt.

4.3.2 Bepaling van het vochtgehalte

Procedure

Het vochtgehalte werd bepaald aan de hand van AACC methode 44-15A (AACC, 2003). De weegschaaltjes werden op voorhand gedroogd gedurende minstens 60 minuten bij 130 °C en afgekoeld in een exsiccator. De massa van de gekoelde weegschaaltjes (m_k) werd bepaald alvorens ongeveer 0,5 g staal (m_s) hierin af te wegen. Vervolgens werden de weegschaaltjes met het staal geplaatst in een oven op 130 °C gedurende 120 minuten. De weegschaaltjes werden opnieuw gewogen (m_f) nadat ze 45 minuten afgekoeld waren in een exsiccator.

Dataverwerking

Het vochtgehalte werd bepaald op basis van het gewichtsverlies gedurende droging:

$$\text{Vochtgehalte (\%)} = \frac{(m_s(g) + m_k(g) - m_f(g)) \times 100}{m_s(g)}$$

Het vochtgehalte werd enkel bepaald voor AXOS-1, lage DP XOS en hoge DP XOS. Voor de gelyofiliseerde AXOS stalen werd een vochtgehalte van 5% aangenomen.

4.3.3 Bepaling van het asgehalte

Principe

Het asgehalte werd bepaald volgens AACC-methode 08-01 (AACC, 2003) en is het massaverlies in droge stof van een product na verbranding bij 590 °C onder gestandaardiseerde condities.

Procedure

De porseleinen kroesjes werden eerst gedurende 60 minuten in een moffeloven bij 590 °C geplaatst. Na 45 minuten afkoelen in een exsiccator, werd het tarragewicht van de kroesjes nauwkeurig bepaald (m_k). Vervolgens werd hierin ongeveer 0,5 g staal (m_s) nauwkeurig afgewogen en werd het kroesje verhit in een zandbad (100 °C) tot het staal verkoold was. Nadien werden de kroesjes gedurende 16 uur in een moffeloven bij 590 °C gezet tot een constant gewicht bereikt werd.

Door verbranding werden alle organische verbindingen omgezet tot CO₂, H₂O en andere gassen. Enkel de anorganische fractie bleef over in de kroesjes. Tenslotte werd na 45 minuten afkoelen in een exsiccator opnieuw het gewicht van de kroesjes met het overblijvend staal nauwkeurig bepaald (m_f). De bepaling van het asgehalte werd in triplo uitgevoerd.

Dataverwerking

Het asgehalte werd bepaald op basis van het gewichtsverlies gedurende verassing:

$$\text{Asgehalte (\%)} = \frac{(m_f (g) - m_k (g)) \times 100}{m_s (g) \times (100 - \text{vochtgehalte staal (\%)})}$$

Het asgehalte werd enkel bepaald voor AXOS-1, lage DP XOS en hoge DP XOS.

4.3.4 Bepaling van het proteïnegehalte

Principe

Het proteïnegehalte van de XOS en AXOS stalen werd bepaald via de methode van Bradford (1976). De meting is gebaseerd op het vormen van een complex tussen 'Briljant Blauw G' en proteïnen (voornamelijk via basische aminozuren zoals arginine, lysine en histidine) in een zuur milieu. Door de complexvorming verschuift het absorptiemaximum van 465 naar 595 nm. De gemeten extinctiewaarde bij 595 nm is een maat voor het proteïnegehalte.

Procedure

Stalen werden opgelost in een concentratie van 3 mg/ml. Aan 1,0 ml van deze oplossing werd 1,0 ml Bradford reagent toegevoegd. De blancowaarde werd bepaald door 1,0 ml gedeïoniseerd water in plaats van staal te gebruiken. Verder werd met behulp van Bovine Serum Albumine een calibratiecurve met gekende proteïneconcentraties (1–10 µg/ml) opgesteld. Hierbij werd aan 1,0 ml standaardoplossing 1,0 ml Bradford reagent toegevoegd. Na incubatie bij kamertemperatuur gedurende 30 minuten, werd de extinctie van de oplossing gemeten bij 595 nm (Ultrospec III UV/vis spectrofotometer, Pharmacia Biotech, Piscataway, VS).

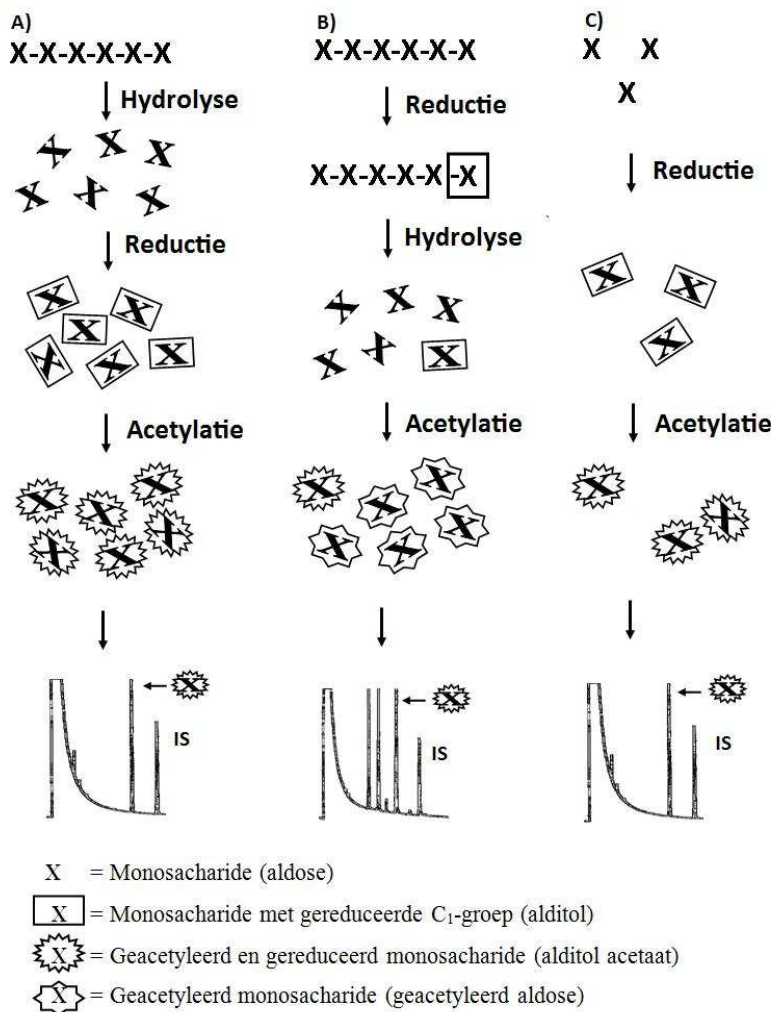
Dataverwerking

Met behulp van de richtingscoëfficiënt van de calibratiecurve werd via de met de blancowaarde gecorrigeerde extinctiewaarde het proteïnegehalte bepaald.

4.3.5 Bepaling van het gehalte aan totale, gereduceerde en vrije monosachariden

Principe

De onderstaand beschreven methode voor kwantificeren van monosachariden (MS) is gebaseerd op de methode van Courtin *et al.* (2000). In deze experimenten wordt het gehalte aan totale, gereduceerde en vrije MS bepaald (Figuur 4.2). De methode is driedelig: hydrolyse, reductie en acetylatie. De bekomen alditolacetaten worden geanalyseerd met gaschromatografie (GC). Aan de hand van deze methode is het mogelijk om het (A)XOS-gehalte, de A/X-ratio en DP te bepalen.



Figuur 4.2: Schematische voorstelling van de procedure voor bepaling van het totale (A), reducerend (B) en vrij (C) suikergehalte gebaseerd op Courtin *et al.* (2000).

Bepaling van het totale suikergehalte

De XOS en AXOS stalen (10,0 mg) werden nauwkeurig afgewogen, opgelost in 5,0 ml 2,0 N trifluorazijnzuur (TFA) en vervolgens **gehydrolyseerd** gedurende 60 minuten bij 110 °C.

Alvorens te starten met de **reductie** van de MS, werd er aan 3,0 ml van het gekoelde en

gehydrolyseerd materiaal 1,0 ml interne standaard (IS) toegevoegd. De IS werd bereid door 100,0 mg allose op te lossen in 100,0 ml benzoëzuur-oplossing (50%). De stalen werden geplaatst in ijs en in basisch milieu gebracht door toevoeging van 1,0 ml NH_3 (25%). Door het aanbrengen van een druppel octanol werd schuimvorming tijdens de reductie geminimaliseerd. De reductie van monosachariden tot alditolen werd uitgevoerd door toediening van 200 μl ammoniumhydroxide-natriumborohydride-oplossing (200 mg NaBH_4 per ml 2,0 M NH_3) en deze te verwarmen gedurende 30 minuten bij 40 °C. De reactie werd stopgezet door aan te zuren met 400 μl azijnzuur.

Als laatste stap werden de alditolen **geacetyleerd**. Aan 500 μl van het gereduceerde staal werd 500 μl 1-methylimidazol (katalysator) toegevoegd. Vervolgens werd 5,0 ml azijnzuuranhydride toegevoegd en 10 minuten later werd 1,0 ml ethanol toegediend. Na 5 minuten werd 10,0 ml gedeïoniseerd water toegevoegd en tenslotte werd bromofenolblauw-oplossing (0,04%) 5 minuten later toegevoegd. De stalen werden op ijswater geplaatst en 5,0 ml 7,5 M KOH-oplossing werd twee maal toegevoegd met een tussenpauze van enkele minuten. Na deze stap was een scheiding zichtbaar tussen een bovenste gele organische fase met de gevormde alditolacetaten en een onderste blauwe waterige fase. Door een rustfase van 30 minuten in ijswater werd de scheiding bevorderd. Voor detectie van de alditolacetaten werd de bovenste fase afgezonderd en gedroogd met watervrij natriumsulfaat en in een *vial* voor analyse gebracht. De stalen werden in triplo geanalyseerd.

Per reeks stalen werd er telkens ook een ijkoplossing geanalyseerd. Hiervoor werd 40,0 mg L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose en D-glucose nauwkeurig afgewogen en opgelost in 100,0 ml benzoëzuuroplossing (50%). Aan 2,5 ml ijkoplossing werd 0,5 ml geconcentreerde TFA en 1,0 ml IS toegevoegd. De ijkoplossing onderging vervolgens de reductie en acetylatie zoals hierboven beschreven voor de stalen en werd tevens in triplo geanalyseerd.

De alditolacetaten werden gescheiden op een Supelco SP 2380 polaire kolom (30 m; 0,32 mm interne diameter; 0,2 μm filmdikte) (Supelco, Bellefonte, PA, VS) in een Agilent GC (Agilent 6890 series, Wilmington, DE, VS), uitgerust met autosampler en vlamionisatiedetector. Als draaggas werd helium gebruikt en scheiding vond plaats bij 225 °C. De injectie- en detectietemperatuur bedroegen 270 °C.

Bepaling van het gereduceerde suikergehalte

Bij de bepaling van het gereduceerde suikergehalte werden dezelfde stappen zoals hierboven beschreven uitgevoerd, maar in een andere volgorde. Hierbij vond de hydrolyse pas plaats na de reductie, zodat enkel de reducerende suikers op het einde van de procedure als alditolacetaten gedetecteerd werden.

Het nauwkeurig afgewogen staal werd in 2,5 ml gedeïoniseerd water opgelost. Zowel aan de

stalen als aan de ijken werd 500 μl IS toegevoegd. Vervolgens werd de reductie uitgevoerd door achtereenvolgens 50 μl NH_3 (25%), 5 druppels octanol en 200 μl ammoniumhydroxide-natriumborohydride-oplossing (200 mg NaBH_4 per ml 2,0 M NH_3) toe te voegen en deze te verwarmen gedurende 30 minuten bij 40 °C. De reactie werd stopgezet door voorzichtig aan te zuren met 400 μl azijnzuur.

Als tweede stap vond er de hydrolyse plaats van zowel de stalen als de ijken. Hiervoor werd 500 μl geconcentreerd TFA toegevoegd aan 2,5 ml van de gereduceerde stalen en gedurende 60 minuten gehydrolyseerd bij 110 °C. Vervolgens werden de stalen geacetylerd en geanalyseerd zoals beschreven bij bepaling van het totale suikergehalte.

Bepaling van het vrije suikergehalte

Voor bepaling van de vrije suikers verliep de procedure gelijkaardig aan deze van reducerende suikers, maar vond er geen hydrolyseplaats plaats, zodat enkel vrije suikers als alditolacetaten gedetecteerd werden.

Dataverwerking

De alditolacetaten werden geïdentificeerd op basis van de retentietijden van de MS in de ijkoplossingen. Kwantificatie van de verschillende MS gebeurde door het bepalen van de responsfactor (RF). RF'en worden gedefinieerd als de verhoudingen van de massa van de componenten en allose in de standaard ten opzichte van de verhouding van hun respectievelijke piekoppervlakten bij GC.

$$RF = \left(\frac{\text{massa MS}}{\text{massa IS}} \right)_{\text{standaard}} \times \left(\frac{\text{piekoppervlakte IS}}{\text{piekoppervlakte MS}} \right)_{\text{standaard}}$$

Het percentage aan een bepaald MS in het staal werd als volgt berekend:

$$MS (\%) = \left(\frac{\text{piekoppervlakte MS}}{\text{piekoppervlakte IS}} \right) \times RF \times \left(\frac{\text{massa IS}}{\text{massa DS staal}} \right) \times \frac{1}{CF} \times 100$$

Voor elk MS werd er een correctiefactor (CF) in rekening gebracht voor de verliezen gedurende de zure hydrolyse die aanleiding gaven tot een onderschatting van het werkelijke gehalte aan MS. De correctiefactoren die gebruikt werden zijn 0,97; 0,96; 0,94; 0,95; 0,95 voor respectievelijk arabinose, xylose, mannose, galactose en glucose. Met behulp van de totale, gereduceerde en vrije MS gehalten kon het percentage AXOS, de A/X-ratio en de DP van de (A)XOS en het oligomeer

glucose gehalte in de stalen bepaald worden. In de formules werd er gecorrigeerd voor gehalten aan vrije MS aanwezig in het staal. Hierbij worden in de formules xylose en arabinose afgekort door respectievelijk X en A.

$$DP = \frac{(\text{totaal } X (\%) - \text{vrije } X (\%)) + (\text{totale } A (\%) - \text{vrije } A (\%))}{\text{reducerende } X (\%) - \text{vrije } X (\%)}$$

$$AXOS (\%) = (\text{totale } X (\%) - \text{vrije } X (\%) + \text{totale } A (\%) - \text{vrije } A (\%)) \times 0,88$$

$$A/X - \text{ratio} = \frac{\text{totale } A (\%) - \text{vrije } A (\%)}{\text{totale } X (\%) - \text{vrije } X (\%)}$$

$$\text{Oligomeer glucose - gehalte (\%)} = \text{totaal glucose (\%)} \times 0,9$$

De factoren 0,88 en 0,90 werden gebruikt voor de correctie voor de opname van water door respectievelijke de pentosen of hexosen tijdens de hydrolyse van de koolhydraten.

4.3.6 Bepaling van het totale en vrije ferulinezuurgehalte

Principe

Hydrolysecondities, gebruikt voor de vrijzetting van gebonden FA, zijn gebaseerd op de methode van Lempereur *et al.* (1997). Het verdere verloop van de hieronder beschreven procedure voor kwantificeren van FA is gebaseerd op de methode van Dobberstein en Bunzel (2010). Hierbij wordt het gehalte aan fenolzuren bepaald met *reversed-phase* HPLC. De fenolzuren (hydrofobe componenten) in het polair solvent hebben een affiniteit voor de hydrofobe stationaire fase. Het verlagen van de polariteit van de mobiele fase bekrachtigt de hydrofobe interacties tussen de fenolische componenten en het solvent waardoor deze componenten desorberen en gekwantificeerd kunnen worden met behulp van een UV-detector.

Procedure

Voor de bepaling van het **totale gehalte** aan FA werd een nauwkeurig afgewogen hoeveelheid staal opgelost in 1,0 ml gedeïoniseerd water. De alkalische hydrolyse werd uitgevoerd na toevoeging van 1,0 ml 4,0 M NaOH. De stalen werden gedurende 120 minuten al roerend geïncubeerd bij 35 °C, onder N₂-atmosfeer en afgeschermd van licht. Vervolgens werden de stalen aangezuurd tot pH 2,0 met behulp van de benodigde hoeveelheden 0,1 en 1,0 M HCl. Daarna werd IS (500 µg koffiezuur/ml methanol) toegevoegd. Extractie van de fenolzuren vond plaats door

2,0 ml diethylether toe te voegen, de stalen krachtig te schudden en af te centrifugeren (200 g, 5 minuten, 20 °C). De diethylether fractie werd afgepipetteerd en gecollecteerd in een donkere *vial*. De extractie werd nog een tweede maal herhaald. Na het drogen van de organische fase onder N₂-stroom werd het residu heropgelost in methanol en gefilterd (0,45 µm, polyethersulfon, Millipore, Billerica, Massachusetts, VS). Variatie van FA-gehalten over de stalen werd opgevangen door in de procedure de hoeveelheid IS en het eindvolume methanol af te stellen op het verwachte FA-gehalte van de stalen. Zo werd er 200 µl IS voor de FA rijke AXOS stalen en 25 µl IS voor de FA arme AXOS en XOS stalen toegevoegd en werden de fenolzuren heropgelost in respectievelijk 2,0 ml en 250 µl methanol. De stalen werden in triplo geanalyseerd. Per reeks stalen werd er telkens ook een ijkoplossing geanalyseerd. Hiervoor werd ongeveer 1,0 mg koffiezuur, 4-hydroxybenzaldehyde, *trans*-p-coumarinezuur, vanilline en *trans*-FA nauwkeurig afgewogen en opgelost in 20,0 ml methanol. Staal (20 µl) werd geïnjecteerd en gescheiden met een Luna Phenyl-Hexyl kolom (250 mm; 4,6 mm interne diameter; 5 µm partikelgrootte; Phenomenex, Utrecht, Nederland) in een LC-20AT modulaire HPLC toestel (Shimadzu, Kyoto, Japan). De elutiesnelheid was 1,0 ml/min en de kolomtemperatuur was 45 °C. De gebruikte elutiesolventen waren TFA (1 mM), acetonitril/1mM TFA (90/10 (v/v)) en methanol/1mM TFA (90/10 (v/v)). De elutiegradiënt is weergegeven in Tabel 4.1. UV-detectie (Shimadzu, UV-10A detector) werd uitgevoerd bij 280 en 320 nm.

Voor de kwantificatie van **vrij** FA werd er gestart met het oplossen van bepaalde hoeveelheid staal in 2,0 ml deïoniseerd water. Er werd er geen hydrolysestap uitgevoerd en de stalen werden aangezuurd tot pH 2,0. Vanaf hier verliep de procedure zoals hierboven beschreven voor de totale FA bepaling waarbij 25 µl IS toegevoegd werd en stalen nadien opgelost werden in 250 µl methanol.

Tabel 4.1: Gebruikte elutiegradiënt voor ferulinezuurscheiding met behulp van RP-HPLC.

Tijd (min)	TFA (1 mM) (%)	Acetonitril/1mM TFA (90/10 (v/v)) (%)	Methanol/ 1mM TFA (90/10 (v/v)) (%)
0-10	87	13	0
20	77	20	3
25	70	25	5
30	25	50	25
35-45	87	13	0

Dataverwerking

Het vrije en totale FA-gehalte werd bepaald met behulp van een RF bekomen met de ijkoplossing via hetzelfde principe zoals beschreven voor MS bepaling met behulp van GC (§ 4.3.5).

4.4 Resultaten en discussie

4.4.1 Aanmaak van FA aangerijkte AXOS

Met behulp van een Amberlite XAD-4 kolom werden vertrekkende van AXOS-1 FA rijke AXOS aangemaakt. Een deel (41%) van de op de kolom gebrachte AXOS adsorbeerde niet en wordt de 'doorloop' genoemd. Hierin kwam 25% van de op de kolom gebrachte FA terecht. Door achtereenvolgens te elueren met gedeïoniseerd water en 10% ethanol, werden respectievelijk 27% en 21% van de op de kolom gebrachte AXOS gedesorbeerd. Opmerkelijk was dat beide fracties samen slechts 3% van het initieel FA bevatten. In de laatste fractie, geëluëerd met 50% en hogere concentraties van ethanol, kwamen slechts 11% van de oorspronkelijke AXOS terecht terwijl een hoog gehalte van de initiële FA (72%) hierin aanwezig was.

In Tabel 4.2 wordt de suikersamenstelling en het totaal gehalte aan FA van AXOS-1 en de hierboven genoemde fracties weergegeven.

Tabel 4.2: De suikersamenstelling en totaal ferulinezuurgehalte (%) van de verschillende fracties bekomen tijdens aanrijking van ferulinezuur in AXOS-1 uitgedrukt op droge stof basis.

Fractie	AXOS-1	Doorloop	Water	10% ethanol	50% en hogere concentraties ethanol
AXOS (% ds¹)	74 (± 2)	75 (± 2)	75 (± 1)	64 (± 1)	78 (± 1)
A/X²	0,22 (± 0,01)	0,25 (± 0,01)	0,12 (± 0,01)	0,32 (± 0,01)	0,36 (± 0,01)
DP³	4,7 (± 0,2)	4,3 (± 0,1)	3,5 (± 0,1)	7,3 (± 0,1)	9,2 (± 0,2)
Oligomeer glucose (% ds)	17 (± 1)	18 (± 1)	15 (± 1)	32 (± 1)	8 (± 2)
Totaal FA (% ds)	1,68 (± 0,04)	1,11 (± 0,23)	0,16 (± 0,07)	0,03 (± 0,01)	11,7 (± 0,1)

¹ ds: droge stof. ²A/X: gemiddelde arabinose op xylose verhouding. ³DP: gemiddelde polymerisatiegraad.

Het AXOS staal dat op de kolom gebracht werd, had een AXOS-gehalte van 74%; A/X-ratio van 0,22; een DP van 4,7 en een totaal FA-gehalte van 1,68%. De niet-geadsorbeerde fractie had een gelijkaardige suikerstructuur dan AXOS-1, maar een lager FA-gehalte (0,89%). Na elutie met gedeïoniseerd water werden AXOS met een AXOS-gehalte van 75% opgevangen. Deze fractie had een lagere A/X-ratio (0,12), DP (3,5) en FA-gehalte (0,16%) dan het startstaal AXOS-1. Elutie met 10% ethanol leidde tot desorbtië van AXOS met een hoger A/X-ratio (0,32) en DP (7,3) in vergelijking met het startstaal. Deze AXOS hadden echter een laag AXOS-gehalte (64%) en ondanks de hoge A/X-ratio een laag FA-gehalte (0,03%). De AXOS opgevangen na elutie met 50% en hogere concentraties ethanol werden gekenmerkt door een opmerkelijk hoog FA-gehalte van 11,7%. De A/X-ratio en DP van deze AXOS bedroeg respectievelijk 0,36 en 9,2. Grotere AXOS moleculen hebben immers meer

kans op de aanwezigheid van een FA. Het gebonden FA rijke AXOS staal (AXOS-4), gebruikt voor verdere experimenten, werd bekomen door de 50% en hogere concentraties ethanolfracties van verschillende fractioneringen met behulp van Amberlite XAD-4 bij elkaar te voegen.

4.4.2 Structurele karakterisatie van XOS en AXOS

De koolhydraatsamenstelling, het FA-, proteïne- en asgehalte van de set XOS en AXOS stalen worden weergegeven in Tabel 4.3. Vanaf hier worden de stalen voorgesteld door een code zodat de naam van de stalen meer informatie verstrekt over de structurele kenmerken van de stalen. De code is opgebouwd uit XOS of AXOS gevolgd door de DP, A/X-ratio en het FA voorkomen. Bij deze laatste wordt zowel het totale gehalte als een letter die aanduidt in welke vorm FA voornamelijk voorkomt weergegeven, waarbij, **b**, **v** of **c** voor respectievelijk gebonden, vrij of gecrosslinkt staat. Bij XOS is deze laatste aanduiding niet gemaakt, omwille van het lage FA-gehalte.

De lage en hoge DP XOS stalen (respectievelijk XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1) hadden een (A)XOS-gehalte van respectievelijk 80 en 77%. Deze stalen verschilden voornamelijk door hun DP, waarbij XOS-3-0,04-<0,1 een DP van 3,2 hadden en de DP van XOS-13-0,05-<0,1 12,8 bedroeg. Tevens bevatte XOS-3-0,04-<0,1 een opmerkelijk hoger gehalte aan oligomeer glucose (11%) in vergelijking met XOS-13-0,05-<0,1 (2%). Aangezien het XOS stalen betreft, waren de xyloseketens weinig arabinose gesubstitueerd en waren de A/X verhoudingen bijgevolg laag (0,04 en 0,05 voor respectievelijk XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1). Het FA-gehalte in deze stalen was laag (respectievelijk 0,06 en < 0,01%). Lage FA waarden werden verwacht aangezien XOS slechts een lage A/X-ratio hebben. Het proteïne- en asgehalte van de XOS-3-0,04-<0,1 (respectievelijk 0,01 en < 0,01%) en XOS-13-0,05-<0,1 (0,08% as) was zeer laag.

AXOS-5-0,22-1,7**b** werden gebruikt voor de aanmaak van de verschillende AXOS stalen. Dit basisstaal werd gekenmerkt door een AXOS-gehalte van 74%, DP van 4,7 en A/X-ratio van 0,22. Door de arabinosubstitutie kwam beduidend meer FA voor (1,68%) in vergelijking met de gehalten terug te vinden in de XOS stalen. Daarnaast bevatte het staal 17% oligomeer glucose; 0,24% proteïnen en 0,02% as. Door FA hydrolyse en verwijdering van AXOS-5-0,22-1,7**b** werden AXOS-2 (AXOS-4-0,19-0,2**v**) bekomen met een iets lagere DP en A/X-ratio (respectievelijk 4,2 en 0,19). In § 4.4.1 werd tevens vastgesteld dat de niet-geadsorbeerde, water en 10% ethanol geëluëerde fractie uit kleinere AXOS bestond. Het FA-gehalte bedroeg slechts 0,23% FA na hydrolyse en verwijdering van FA. Verknoping van FA had geen effect op de suikersamenstelling en structuur waardoor AXOS-5-0,22-1,7**b** en AXOS-3 (AXOS-5-0,23-1,7**c**) enkel verschilden in de vorm waarin FA voorkomt, namelijk als monomeer in AXOS-5-0,22-1,7**b** ten opzichte van di- of hogere oligomeren in AXOS-5-0,23-1,7**c** (slechts 0,07% FA als monomeer). De di- of hogere oligomere vormen van FA werden niet gekwantificeerd vanwege het ontbreken van standaarden.

Tabel 4.3: De suikersamenstelling, ferulinezuursamenstelling, proteïne- en asgehalte van de verschillende XOS en AXOS stalen op droge stof basis uitgedrukt.

	Lage DP XOS XOS-3-0,04-<0,1	Hoge DP XOS XOS-13-0,05-<0,1	AXOS-1 AXOS-5-0,22-1,7b	AXOS-2 AXOS-4-0,19-0,2v	AXOS-3 AXOS-5-0,23-1,7c	AXOS-4 AXOS-10-0,38-7,2b	AXOS-5 AXOS-9-0,39-6,9v	AXOS-6 AXOS-9-0,36-0,9v
AXOS (% ds¹)	80 (± 2)	77 (± 1)	74 (± 2)	73 (± 4)	74 (± 3)	74 (± 1)	72 (± 1)	74 (± 1)
A/X²	0,04 (± 0,01)	0,05 (± 0,01)	0,22 (± 0,01)	0,19 (± 0,01)	0,23 (± 0,01)	0,38 (± 0,01)	0,39 (± 0,01)	0,36 (± 0,03)
DP³	3,2 (± 0,1)	12,8 (± 0,1)	4,7 (± 0,2)	4,2 (± 0,2)	4,7 (± 0,2)	9,6 (± 0,1)	9,1 (± 0,1)	8,5 (± 0,1)
Oligomeer glucose (% ds)	11 (± 1)	2 (± 0,1)	17 (± 1)	18 (± 1)	19 (± 1)	12 (± 1)	12 (± 1)	12 (± 1)
Totaal FA (% ds)	0,06 (± 0,01)	< 0,01	1,68 (± 0,04)	0,23 (± 0,03)	0,07 ⁴ (± 0,01)	7,16 (± 0,33)	6,90 (± 0,13)	0,86 (± 0,08)
Vrij FA (% ds)	< 0,01	< 0,01	0,01 (± 0,03)	0,16 (± 0,02)	< 0,01 ⁴	0,07 (± 0,01)	5,61 (± 0,07)	0,56 (± 0,03)
Gebonden FA (% ds)	< 0,05 (± 0,01)	< 0,01	1,67 (± 0,04)	0,07 (± 0,03)	0,07 ⁴ (± 0,01)	7,09 (± 0,33)	1,29 (± 0,15)	0,30 (± 0,08)
Proteïnegehalte (% ds)	0,01 (± 0,01)	/ ⁵	0,24 (± 0,02)	0,28 (± 0,01)	0,27 (± 0,02)	0,07 (± 0,01)	0,10 (± 0,02)	0,03 (± 0,01)
Asgehalte (% ds)	< 0,01	0,08 (± 0,01)	0,02 (± 0,01)	/ ⁶	/ ⁶	/ ⁶	/ ⁶	/ ⁶

¹ ds: droge stof. ² A/X: gemiddelde arabinose op xylose verhouding. ³ DP: gemiddelde polymerisatiegraad. ⁴ monomeer FA. Totale FA-gehalte is hetzelfde als bij AXOS-1, maar FA komt voornamelijk voor als di- of trimeren. ⁵ niet bepaald wegens onoplosbaarheid van het staal. ⁶ niet bepaald wegens hoge hoeveelheden staal nodig voor bepaling.

Daarnaast werden ook gebonden FA rijke AXOS (AXOS-10-0,38-7,2**b**) geproduceerd vertrekkende van AXOS-5-0,22-1,7**b** (§ 4.4.1). Het FA-gehalte van deze AXOS bedroeg 7,2% en kwam hoofdzakelijk als gebonden voor (7,1%). AXOS-10-0,38-7,2**b** hadden een hogere DP (9,6) en A/X-ratio (0,38) in vergelijking met AXOS-5-0,22-1,7**b**. Na de aanrijking met behulp van Amberlite XAD-4 bevatten de AXOS tevens een lager glucose- en proteïnegehalte (respectievelijk 11,7 en 0,7%). AXOS-10-0,38-7,2**b** werd vervolgens onderworpen aan een FAE behandeling waardoor 81% FA afgesplitst werd en het staal voornamelijk vrij FA (5,6%) en minder gebonden FA (1,3%) bevatte. AXOS-5 (AXOS-9-0,39-6,9**v**) werd op zijn beurt over de Amberlite XAD-4 kolom gebracht om FA te verwijderen ter productie van AXOS-6 (AXOS-9-0,36-0,9**v**), een AXOS staal arm aan FA (0,86% totaal FA). De A/X-ratio van AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v** bedroeg respectievelijk 0,39 en 0,36 en was gelijkaardig aan de A/X-ratio van AXOS-10-0,38-7,2**b** (0,38). Ook de DP van AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v** (respectievelijk 9,1 en 8,5) was gelijkaardig aan de DP van AXOS-10-0,38-7,2**b** (9,6). Het proteïnegehalte was net als voor alle XOS en AXOS stalen laag, respectievelijk 0,10 en 0,03%. AXOS-10-0,38-7,2**b**, AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v** waren bijgevolg zeer gelijkend qua suikerstructuur van de AXOS, maar verschilden voornamelijk in gehalten aan vrij en gebonden FA.

4.5 Conclusie

In dit hoofdstuk werd een set AXOS geproduceerd en werd de chemische samenstelling van de XOS en AXOS stalen bepaald. XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1 hadden een uitéénlopende DP (respectievelijk 3,2 en 12,8) en worden verder gebruikt om de invloed van DP op het prebiotische potentieel van XOS te onderzoeken (Hoofdstuk 6). Verder werden vertrekkende van AXOS-5-0,22-1,7**b** vijf verschillende AXOS, die op basis van hun AXOS structuur in twee sets kunnen ingedeeld worden, succesvol aangemaakt. Zo hebben enerzijds AXOS-5-0,22-1,7**b**, AXOS-4-0,19-0,2**v** en AXOS-5-0,23-1,7**c** en anderzijds AXOS-10-0,38-7,2**b**, AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v** een gelijkaardige suikerstructuur. Binnen één set varieerden de AXOS voornamelijk in het voorkomen van FA, dat ofwel veel of weinig, vrij of gebonden of gecrosslinkt voorkwam. Dit is bijgevolg interessant om de invloed van FA op de antioxidanteigenschappen van AXOS te bestuderen (Hoofdstuk 5). AXOS-10-0,38-7,2**b**, AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v** hebben een gelijkaardig ruggengraat maar zijn respectievelijk rijk aan gebonden FA, rijk aan vrij FA en FA arm. Met behulp van deze set AXOS werden tevens de invloed van vrij en gebonden FA op de antioxidant en prebiotische eigenschappen van AXOS tijdens *in vitro* fermentatie geëvalueerd.

HOOFDSTUK 5

DE ANTIOXIDANTCAPACITEIT VAN XOS EN AXOS

5.1 Inleiding

Tijdens het aeroob metabolisme in het menselijk lichaam kan zuurstof gereduceerd worden ter vorming van reactieve zuurstof species. Het lichaam is hier tegen beschermd door de aanwezigheid van antioxidanten, die deze vrije radicalen neutraliseren. Wanneer deze vrije radicalen echter in overmaat aanwezig zijn, kan oxidatieve stress optreden wat vervolgens kan leiden tot vetperoxidatie, proteïne-oxidatie, DNA schade, ... en hierdoor aanleiding geven tot ziekten (Sies, 1994; Wang *et al.*, 2008). Voor antioxidanten is het lichaam deels aangewezen op de voeding. Fenolische componenten, zoals FA dat voornamelijk aanwezig is in de zemel van granen, groenten, fruit en koffie (Zhao & Moghadasian, 2008), zijn in staat om dergelijke vrije radicalen te abstraheren ter vorming van een door resonantie gestabiliseerd fenoxylradicaal (Graf, 1992). In dit hoofdstuk wordt dieper ingegaan op het antioxidantpotentieel van AXOS en de invloed van (gebonden, vrij of verknoopt) FA hierop.

5.2 Materialen

De gebruikte reagentia en chemicaliën waren van analytische graad en afkomstig van Sigma-Aldrich, tenzij anders vermeld. In dit hoofdstuk werd de antioxidant-capaciteit van XOS en AXOS stalen onderzocht.

5.3 Methoden

5.3.1 Trolox equivalent antioxidantcapaciteit test

Principe

De onderstaand beschreven procedure voor bepaling van de antioxidantcapaciteit is gebaseerd op de methode van van den Berg *et al.* (1999) met enkele modificaties. In de Trolox equivalent antioxidantcapaciteit (TEAC) test wordt de antioxidantcapaciteit bepaald met behulp van de kleurafname na reactie van de in een staal aanwezige antioxidanten met een op voorhand

gegenereerde gekleurde radicaaloplossing. Hierbij wordt de antioxidantcapaciteit uitgedrukt ten opzichte van een standaard antioxidant, namelijk Trolox, een wateroplosbaar vitamine C-analoog.

Procedure

Een $ABTS^{\bullet-}$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonaat) radicaaloplossing werd dagvers aangemaakt door een 2,3 mM ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropaan)HCl) en 0,23 mM $ABTS^{2-}$ oplossing (in McIlvaine buffer, bereid door ongeveer 70% van 0,20 M dinatriumfosfaat en 30% 0,10 M citroenzuur te combineren om ten einde een pH van 6,5 te verkrijgen) te verhitten op 70 °C gedurende ongeveer 12 minuten. Door thermische behandeling splitste het thermolabiel ABAP met vorming van twee radicalen, die onstabiel waren en verder reageerden met $ABTS^{2-}$. Hierdoor werden 'meer stabiele' $ABTS^{\bullet-}$ radicalen gevormd die kleur gaven aan de oplossing. De radicaaloplossing diende een extinctie van 0,70 (\pm 0,02) te hebben voor verder gebruik.

Voor optimalisatie van de procedure voor het meten van de antioxidantcapaciteit van (A)XOS, werden per staal verschillende verdunningen getest. De TEAC test bleek immers voor sommige componenten concentratieafhankelijk te zijn (van den Berg *et al.*, 1999). Daarom werd onderzocht in welk meetbereik er een lineair verband gevonden kon worden tussen de verdunning en de antioxidantcapaciteit, ten einde bij een juiste FA, XOS en AXOS concentratie de antioxidantmetingen uit te voeren. De geteste concentraties waren 0,1-4,2 mg/l (0,5-20,0 μ M), 30-1500 mg/l en 6-400 mg/l (finale concentraties in de cuvetten) voor respectievelijk FA, XOS-3-0,04-0,1 en AXOS-5-0,22-1,7b.

Voor het meten van de antioxidantcapaciteit werd aan 40 μ l van het staal 1960 μ l $ABTS^{\bullet-}$ oplossing toegevoegd. De extinctie werd na exact 6 minuten gemeten bij 734 nm (Ultrospec III UV/vis spectrofotometer, Pharmacia Biotech). Een calibratiecurve met gekende concentraties (1,0 - 25,0 μ M, finale concentratie in cuvet) aan Trolox werd opgesteld om op basis hiervan de antioxidantcapaciteit van de stalen uit te drukken. Tevens werd een blancowaarde bepaald door 40 μ l ethanol (Trolox en FA) of gedeïoniseerd water (AXOS en XOS stalen) toe te voegen aan $ABTS^{\bullet-}$ oplossing in plaats van staal. De stalen werden bij verscheidene verdunningen aan de test onderworpen en de analyse werd per verdunning in duplo uitgevoerd.

Dataverwerking

Voor de berekeningen werd er gewerkt met gecorrigeerde extinctiewaarden ($|\Delta Abs|$) voor de ijk en stalen, bepaald door het verschil te nemen van de ijk/staalextingtie en de bijhorende blanco-extinctie. De richtingscoëfficiënt (afgekort als Rico in onderstaande formules) van de Trolox calibratiecurve werd gebruikt om de antioxidantcapaciteit van de stalen te bepalen:

$$Rico = \frac{|\Delta Abs_{Trolox}|}{[Trolox]}$$

De antioxidantcapaciteit werd uitgedrukt in $\mu\text{mol Trolox per g staal}$ via onderstaande formule. Hiervoor werd eerst de concentratie van het staal in het cuvet (g/l) bepaald op het moment van de meting, rekening houdend met 1/50 verdunning gedurende de test en de verdunningsfactor van het staal alvorens aanvang van de test.

$$\text{Antioxidantcapaciteit } (\mu\text{mol Trolox/g staal}) = \frac{|\Delta Abs_{staal}|}{Rico \times [AXOS_{staal}]}$$

Aangezien we geïnteresseerd zijn in de invloed van FA en zijn verschijningsvorm op de antioxidantcapaciteit van AXOS, werd de antioxidantcapaciteit verder ook uitgedrukt via een $TEAC_{FA}$ waarde ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$) berekend op basis van het FA-gehalte. Hierbij wordt reeds van de veronderstelling uitgegaan dat de antioxidantcapaciteit van AXOS uitsluitend door FA bepaald wordt. De $TEAC_{FA}$ waarde geeft de antioxidantcapaciteit van FA, op molaire basis, in het staal relatief ten opzichte van de antioxidantcapaciteit van Trolox weer. Op deze manier wordt een mogelijk verband tussen de antioxidantcapaciteit en het FA-gehalte duidelijker. Om deze waarde te bepalen werd de gecorrigeerde extinctiewaarde gedeeld door de Rico en de concentratie van (totaal) FA (μM , zoals ook Trolox uitgedrukt werd) in het staal.

$$TEAC_{FA} = \frac{|\Delta Abs_{staal}|}{Rico \times [FA_{staal}]}$$

5.3.2 Oxygen radical absorbance capacity test

Principe

Het bepalen van de antioxidantcapaciteit via de ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) test, waarbij fluoresceïne gebruikt wordt als fluorescente probe, is gebaseerd op de methode beschreven door Ou *et al.* (2001) met enkel aanpassingen. Hierbij wordt de beschermende invloed van een antioxidant achterhaald door bepaling van de inhibitie van de door peroxyradicalen, aangemaakt door de thermische decompositie van azo-componenten, veroorzaakte oxidatie van fluoresceïne. De antioxidantcapaciteit werd opnieuw uitgedrukt ten opzichte van de antioxidantcapaciteit van Trolox. Deze analyses werden uitgevoerd in het laboratorium van Vlaams Centrum voor Bewaring van Tuinbouwproducten (VCBT, KU Leuven).

Procedure

FA, XOS en AXOS stalen werden bereid in concentraties gelijk aan de concentraties zoals bepaald voor de TEAC test (§ 5.3.1), aangezien de resultaten van deze test ook uitgedrukt werden ten opzicht van Trolox. Hierbij werd per staal gewerkt met twee concentraties die telkens nog 8, 11,7 en 20 maal verdund werden voor analyse door een autosampler (Multiprobe probell plus, Perlin Elmer, Zaventem, België). De reactie werd uitgevoerd in natriumfosfaat buffer (75 mM, pH 7,4). In elke *well* van een microtiterplaat werd aan 50 μ l verdund staal 100 μ l fluoresceïne (61 nM, finale concentratie in natriumfosfaat buffer) toegevoegd door een autosampler, waarna de plaat geïncubeerd werd voor 30 minuten bij 37 °C. Na deze preïncubatie werd 50 μ l van een 19,125 mM ABAP oplossing (0,208 g in 10 ml natriumfosfaat buffer) toegediend om de reactie te starten. De excitatie bij 485 nm en emissie bij 520 nm werd onmiddellijk gemeten bij 37 °C door een fluorescentie microplaat lezer (Spectramax M2^e, Molecular devices, Wokingham, Verenigd Koninkrijk). De fluorescentie werd elke minuut gemeten gedurende 60 minuten. Gedurende de reactie werd fluoresceïne geoxideerd en daalde de fluorescentie. Een calibratiecurve met gekende concentraties aan Trolox (2,0 - 7,0 μ M in natriumfosfaat buffer, finale concentratie in cuvet) werd opgesteld om op basis hiervan de antioxidantcapaciteit van de stalen uit te drukken. Tevens werd een blancowaarde bepaald door natriumfosfaat buffer te gebruiken in plaats van staal.

Dataverwerking

Voor de berekeningen werd er gewerkt met de gecorrigeerde oppervlakte onder de fluorescentiecurve van de ijk en stalen, bepaald door het verschil te nemen van de ijk/staal oppervlakte en de bijhorende blanco-oppervlakte. Ook hier werd de vergelijking van de Trolox calibratiecurve gebruikt om de antioxidantcapaciteit van de stalen te bepalen. De antioxidantcapaciteit werd opnieuw uitgedrukt in μ mol Trolox/g staal en in μ mol Trolox/ μ mol FA (ORAC_{FA}).

5.3.3 Statistische analyse

De statistische verwerking werd uitgevoerd met behulp van SAS-software 9.2 (SAS *institute* Inc., Cary, NC, VS). Na het uitvoeren van een twee-staps ANOVA-test, werd een Tukey-test ($p < 0,05$) gebruikt om significante verschillen tussen groepsgemiddelden te achterhalen.

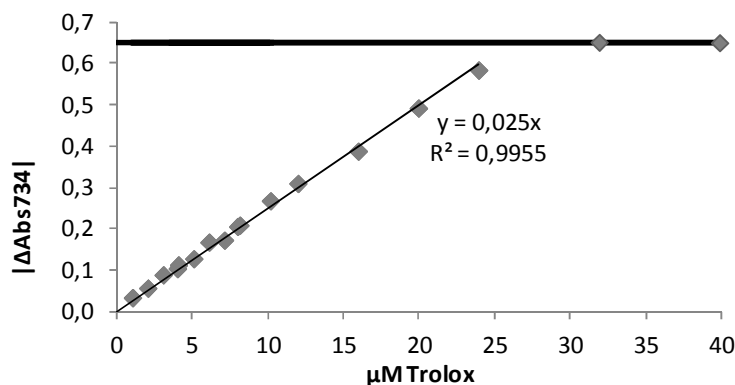
5.3 Resultaten en discussie

5.3.1 Trolox equivalent antioxidantcapaciteit test

5.3.1.1 Optimalisatie van de TEAC test voor XOS en AXOS

Om de antioxidant sterkte van verschillende (A)XOS te onderzoeken, werd deze test eerst geoptimaliseerd voor XOS-3-0,04-0,1 en AXOS-5-0,22-1,7b als model voor respectievelijk andere XOS en AXOS. Hierbij werd er gewerkt met andere condities dan beschreven door van den Berg (1999). In deze test werd de ABTS^{•-} radicaaloplossing bereid in McIlvaine buffer (pH 6,5), die meer relevant is voor het nabootsen van de dikke darm, aangezien AXOS niet geabsorbeerd worden in de bloedbaan. Hiervoor werd eerst gecontroleerd dat de ABTS^{•-} radicaaloplossing eenzelfde concentratie radicalen kon induceren, zoals de radicaaloplossing in fosfaatbuffer (0,10 M; pH 7,4) zoals beschreven door van den Berg *et al.* (1999). Bovendien vertoonden beide ABTS^{•-} radicaaloplossingen eenzelfde stabiliteit en verliep de reactie van deze radicalen met Trolox gelijk (resultaten niet weergegeven).

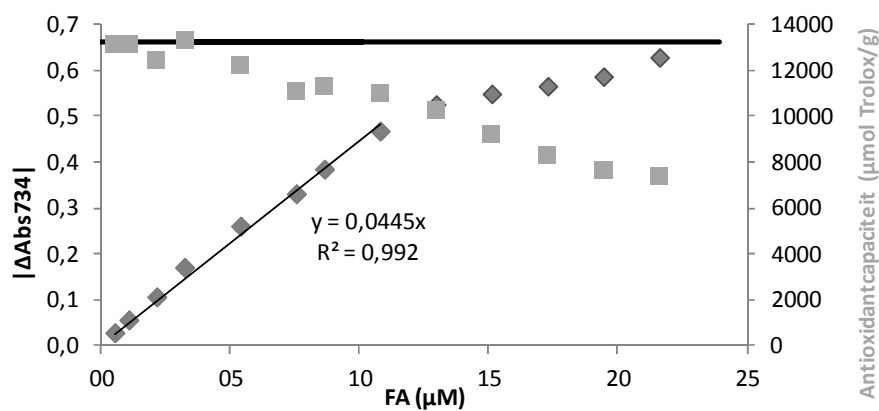
In de eerste plaats werd onderzocht in welke concentratierange de Trolox een lineair daling in absorbantie veroorzaakte. De antioxidantcapaciteitsbepaling van Trolox bleek lineair te zijn bij $|\Delta\text{Abs}|$ waarden tussen 0,0 – 0,6 (Figuur 5.1), wat overeenstemt met een concentratiebereik van 0 – 24 μM Trolox. De vette horizontale lijn geeft de maximale $|\Delta\text{Abs}|$ waarde weer, welke overeenstemt met het bekomen van een radicaalvrije buffer door volledige reactie van de radicalen met het antioxidant. Deze waarde werd bereikt bij analyse van een Trolox concentratie van boven de 26 μM en bijgevolg werd er niet met deze hogere concentratie gewerkt.



Figuur 5.1: De $|\Delta\text{Abs}|$ bij 734 nm in functie van concentratie Trolox (μM) met aanduiding van het lineaire gebied en de maximale $|\Delta\text{Abs}|$ in McIlvaine buffer.

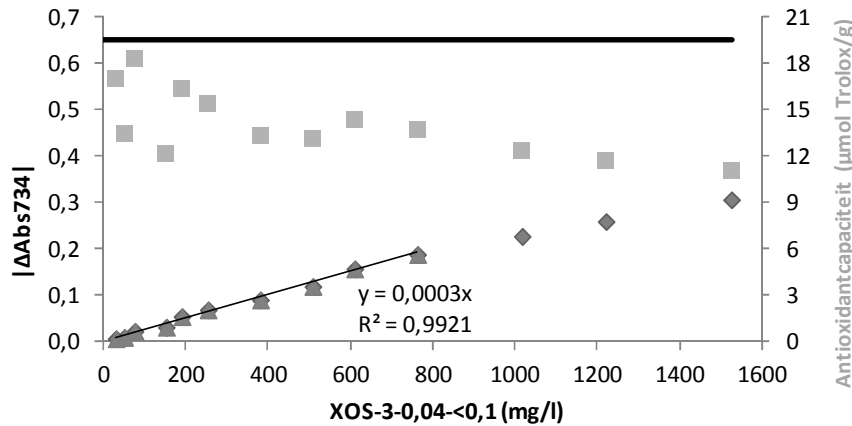
Het lineaire meetbereik van Trolox is overigens niet noodzakelijk hetzelfde als dat voor andere antioxidanten in deze test. Daarom werd ook het lineaire meetbereik van zowel vrij FA, XOS en AXOS bepaald. De $|\Delta\text{Abs}|$ en de antioxidantcapaciteit worden in functie van de concentratie FA, XOS of AXOS weergegeven in respectievelijk Figuren 5.2, 5.3 en 5.4.

De $|\Delta\text{Abs}|$ steeg in functie van de concentratie FA en kende een lineair verloop tot een $|\Delta\text{Abs}|$ van 0,5; wat overeenstemt met een concentratie van 11 μM FA. Bij het testen van hogere concentraties van FA werd er relatief gezien een lagere absorptiedaling waargenomen. Ook de antioxidantcapaciteit in functie van de FA concentratie is weergegeven in Figuur 5.2. In het lineaire meetbereik, zou in principe een constante antioxidantcapaciteit bekomen moeten worden. Daar er hier bij zeer lage concentraties gewerkt werd, varieerde echter de hiermee bepaalde antioxidantcapaciteit in dit meetbereik. Hierdoor is er besloten om, bij de bepaling van de antioxidantcapaciteit (uitgedrukt in $\mu\text{mol Trolox/g}$ FA), te meten bij meerdere concentraties die aanleiding geven tot $|\Delta\text{Abs}|$ waarden tussen 0,1 - 0,5.



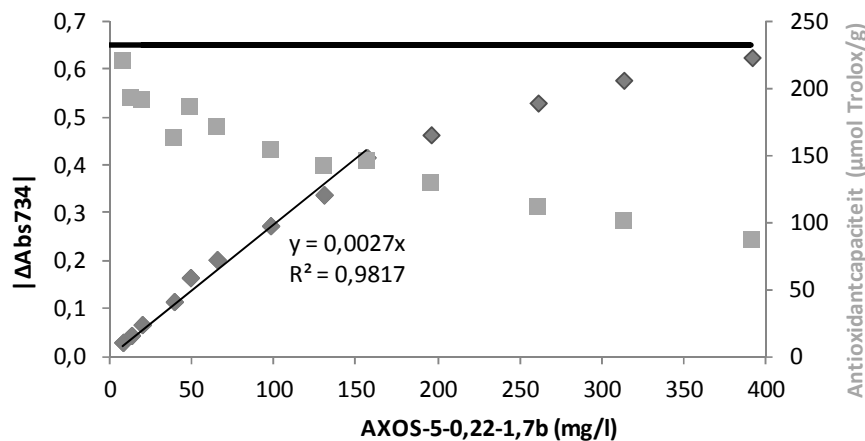
Figuur 5.2: De $|\Delta\text{Abs}|$ bij 734 nm (licht grijze vierkanten) en antioxidantcapaciteit ($\mu\text{mol Trolox/g}$) (donker grijze ruiten) in functie van concentratie FA (μM) na 6 minuten met aanduiding van het lineaire gebied en de maximale $|\Delta\text{Abs}|$ in McIlvaine buffer.

Het verband tussen de geteste concentratie XOS-3-0,04- $<0,1$ en de $|\Delta\text{Abs}|$ was lineair tot op een concentratie van 800 mg XOS/ml (Figuur 5.3). Vanwege een lage antioxidantcapaciteit van XOS werd zelfs bij zeer hoge XOS concentraties de maximale $|\Delta\text{Abs}|$ waarde, waarbij alle radicalen onschadelijk gemaakt zijn, niet behaald. Voor optimale bepaling van de antioxidantcapaciteit van XOS werd verder gewerkt met XOS concentraties die aanleiding geven tot $|\Delta\text{Abs}|$ waarden tussen 0,0 en 0,2.



Figuur 5.3: De $|\Delta Abs|$ bij 734 nm (licht grijze vierkanten) en antioxidantcapaciteit ($\mu\text{mol Trolox/g}$) (donker grijze ruiten) in functie van concentratie XOS-3-0,04-<0,1 (mg/l) na 6 minuten met aanduiding van het lineaire gebied en de maximale $|\Delta Abs|$ in McIlvaine buffer.

Tussen 0 en 150 mg AXOS-5-0,22-1,7b/l, werd met de TEAC test een lineair verloop vastgesteld tussen de AXOS concentratie en de absorptiedaling (Figuur 5.4), terwijl een concentratie van 400 mg AXOS/l of meer in staat is alle radicalen weg te reageren. Bij de lagere concentraties, leidt de antioxidantcapaciteitsberekening echter tot grotere fouten. Daarom werd er gekozen om voor bepaling van de antioxidantcapaciteit van AXOS verder te werken met concentraties die aanleiding geven tot een $|\Delta Abs|$ bij 714 nm tussen 0,1 en 0,4.



Figuur 5.4: De $|\Delta Abs|$ bij 734 nm (licht grijze vierkanten) en antioxidantcapaciteit ($\mu\text{mol Trolox/g}$) (donker grijze ruiten) in functie van concentratie AXOS-5-0,22-1,7G (mg/l) na 6 minuten met aanduiding van het lineaire gebied en de maximale $|\Delta Abs|$ in McIlvaine buffer.

5.3.1.2 Antioxidantcapaciteit van XOS en AXOS

Met de kennis van het optimale meetbereik van XOS en AXOS in de TEAC test werd de antioxidantcapaciteit van XOS en de verschillende AXOS bepaald (Tabel 5.1).

Tabel 5.1: De berekende antioxidantcapaciteit ($\mu\text{mol Trolox/g}$ droge stof) en TEAC_{FA} waarde ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$) bekomen via de TEAC test van FA, XOS en AXOS.

	Antioxidantcapaciteit	
	$\mu\text{mol Trolox/g ds}^1$	TEAC_{FA} waarde ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$)
FA	11867 (± 926) ^a	2,3 ($\pm 0,2$) ^a
XOS-3-0,04-<0,1	10 ($\pm 0,2$) ^b	/ ²
XOS-13-0,05-<0,1	/ ²	/ ²
AXOS-5-0,22-1,7 b	132 (± 5) ^c	1,6 ($\pm 0,1$) ^{bc}
AXOS-4-0,19-0,2 v	49 (± 3) ^d	4,1 ($\pm 0,3$) ^{de}
AXOS-5-0,23-1,7 c	82 (± 5) ^e	1,1 ($\pm 0,1$) ^b
AXOS-10-0,38-7,2 b	656 (± 44) ^f	1,8 ($\pm 0,1$) ^c
AXOS-9-0,39-6,9 v	1295 (± 83) ^g	3,6 ($\pm 0,2$) ^d
AXOS-9-0,36-0,9 v	184 (± 11) ^h	4,2 ($\pm 0,2$) ^e

¹ds: droge stof. ²Antioxidantcapaciteitsbepaling niet mogelijk door te lage antioxidantcapaciteit. Waarden in dezelfde kolom voor eenzelfde test gevolgd door een verschillende letter zijn significant verschillend van elkaar ($p < 0,05$).

De antioxidantcapaciteit van de XOS en AXOS stalen was gelegen tussen $10 \pm 0,2$ en $1295 \pm 83 \mu\text{mol Trolox/g ds}$. Hierbij vertoonden XOS-3-0,04-<0,1 de laagste antioxidantcapaciteit. AXOS stalen vertoonden algemeen een sterkere antioxidantwerking in vergelijking met XOS. AXOS-5-0,22-1,7**b** hadden een antioxidantcapaciteit die 10 keer groter was ($132 \pm 5 \mu\text{mol Trolox/g ds}$). Hierbij zou de aanwezigheid van FA een belangrijke rol spelen, aangezien Anson *et al.* (2008) concludeerden dat de hoge antioxidantcapaciteit van de aleuronlaag veroorzaakt werd door het hoge FA-gehalte. AXOS-4-0,19-0,2**v** en AXOS-5-0,23-1,7**c** vertoonden een lagere antioxidant-capaciteit (respectievelijk 49 ± 3 en $82 \pm 5 \mu\text{mol Trolox/g ds}$) in vergelijking met het basisstaal. Ze hadden een gelijkaardige koolhydraatstructuur, maar AXOS-4-0,19-0,2**v** waren armer in FA en in AXOS-5-0,23-1,7**c** waren de FA verknoopt. In dit laatste staal kwam FA in dezelfde hoeveelheid voor als in AXOS-5-0,22-1,7**b**, maar dan in dimere of andere oligomere vorm, wat de antioxidantcapaciteit van de resulterende AXOS verlaagde. De antioxidantcapaciteit van fenolzuren is afhankelijk van het aantal vrije fenolische hydroxylgroepen, de aanwezigheid van alkylketen en de resonantiestabiliteit, bijgevolg zorgt dimerisatie voor een verandering in de antioxidantcapaciteit (Garcia-Conesa *et al.*, 1997). Algemeen daalt de antioxidantcapaciteit van FA na verknoping, echter een uitzondering werd vastgesteld door Garcia-Conesa *et al.* (1999) voor 8'-8' diFA door de betere resonantiestabiliteit. Arts *et al.* (2002) stelden ook een verzwakking van de antioxidantwerking vast na interactie van FA met proteïnen. Het FA-gehalte van AXOS-4-0,19-0,2**v** bedroeg slechts 14% van het FA-gehalte van AXOS-5-0,22-1,7**b**, desondanks was de antioxidantcapaciteit slechts 63% lager.

Gelijkaardige trends konden vastgesteld worden bij vergelijking van AXOS-10-0,38-7,2**b**, AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v**. Deze drie stalen hadden een gelijkaardige AXOS-structuur en verschilden enkel in hun FA-gehalten (Tabel 4.3). Bij aanmaak van AXOS-10-0,38-7,2**b** uit AXOS-5-0,22-1,7**b** steeg de antioxidantcapaciteit in vijfvoud ($656 \pm 44 \mu\text{mol Trolox/g ds}$), waarbij de stijging van het FA-gehalte ongeveer van dezelfde aard was. Opvallend was dat na vrijzetting van FA, de antioxidantcapaciteit verdubbelde naar $1295 \pm 83 \mu\text{mol Trolox/g ds}$ in AXOS-9-0,39-6,9**v**. AXOS-9-0,36-0,9**v**, aangemaakt vertrekkende van AXOS-9-0,39-6,9**v** door FA verwijdering, beschikten vervolgens over een veel lagere antioxidantcapaciteit ($184 \pm 11 \mu\text{mol Trolox/g ds}$), weliswaar niet te verwachten op basis van de daling aan FA (88%) in vergelijking met AXOS-10-0,38-7,2**b**. Hieruit blijkt dat de hoeveelheid FA aanwezig in het AXOS staal een rol speelt in de antioxidantcapaciteit van AXOS maar dat ook de vorm waarin dit voorkomt van belang is. Eerder werk toonde aan dat de antioxidantcapaciteit van FA daalt wanneer deze veresterd voorkomt aan suikers, in vergelijking met vrij FA (Garcia-Conesa *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 1999; Subba Rao & Muralikrishna, 2002). Daarentegen tonen een aantal studies een sterkere antioxidantwerking bij AXOS in vergelijking met vrij FA (Ohta *et al.*, 1994; Ohta *et al.*, 1997; Katapodis *et al.*, 2003; Rao & Muralikrishna, 2006). Bij deze studies werd de antioxidantcapaciteit in een LDL-oxidatie model gemeten en speelt de partiticoëfficiënt tussen hydrofiele en lipofiele fase een rol. Deze was hoger bij AXOS, in vergelijking met vrij FA, waardoor de toegankelijkheid van deze antioxidanten naar de vrije radicalen groter was.

Om het effect van de vorm waarin FA voorkomt verder te bestuderen, werd de antioxidantcapaciteit ook uitgedrukt met een TEAC_{FA} waarde ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$) en werd tevens de antioxidantcapaciteit van vrij FA bepaald. Hierbij wordt de veronderstelling gemaakt dat FA de voornaamste bijdrage levert tot de antioxidantcapaciteit van AXOS. Voor XOS werd deze TEAC_{FA} waarde niet bepaald aangezien het FA-gehalte zeer laag was. Volgens Rao *et al.* (2006) kon de aanwezigheid van uronzuren een bijdrage leveren aan de antioxidantcapaciteit van (A)XOS. Vermits het lage FA-gehalte in XOS, zouden acetylgroepen en uronzuren hier een relevante bijdrage kunnen leveren aan het antioxidantpotentieel van XOS. Voor de AXOS stalen kon er echter geen link gevonden worden tussen het acetyl- en uronzuurgehalte en de antioxidantcapaciteit (resultaten niet weergegeven). De link tussen FA en het antioxidantcapaciteit van AXOS wordt hieronder verder beschreven.

De antioxidantcapaciteit van **vrij FA** bedroeg $2,3 (\pm 0,2)$, wat betekent dat FA een 2,3 maal sterker antioxidant is dan Trolox en $2,3 \mu\text{mol Trolox}$ nodig is om eenzelfde hoeveelheid ABTS^{\bullet} radicalen te vangen als $1 \mu\text{mol}$ vrij FA. De bepaalde TEAC waarde stemde overeen met wat eerder vastgesteld werd in literatuur (2,0 door Garcia-Conesa *et al.* (1999); 2,3 door Gómez-Ruiz *et al.* (2007) en 2,5 door Anson *et al.* (2008)). Wanneer **FA veresterd** voorkwam aan arabinose bleek uit de resultaten dat de antioxidantcapaciteit van FA significant zwakker was, namelijk $1,6 (\pm 0,1)$ en

1,8 ($\pm 0,1$) voor respectievelijk AXOS-5-0,22-1,7**b** en AXOS-10-0,38-7,2**b**. Deze bevindingen werden ook vastgesteld door de eerder vernoemde studies (Garcia-Conesa *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 1999; Subba Rao & Muralikrishna, 2002). FA bleek in gebonden toestand minder snel vrije radicalen te kunnen abstraheren. Bovendien, hoewel Rao (2006) en Veenachri (Veenashri & Muralikrishna, 2011) vaststelden dat de DP, arabinosesubstitutie, acetyl- en glucuronzuurgroepen een belangrijke rol spelen in de antioxidantcapaciteit van AXOS, kon deze invloed niet waargenomen worden bij onze stalen, daar de structureel verschillende AXOS (AXOS-5-0,22-1,7**b** en AXOS-10-0,38-7,2**b**) resulteerden in eenzelfde TEAC_{FA} waarde. Mogelijk is deze invloed enkel waar te nemen indien het DP - verschil van de stalen groter is. Wanneer daarentegen FA deels **vrijgezet** werd, steeg de antioxidantcapaciteit sterk, zelfs hoger dan vrij FA *as such*. Een significante stijging in antioxidantcapaciteit werd aangetroffen bij AXOS-4-0,19-0,2**v** ($4,1 \pm 0,3$), AXOS-9-0,39-6,9**v** ($3,6 \pm 0,2$) en AXOS-9-0,36-0,9**v** ($4,2 \pm 0,2$), waarbij respectievelijk 70, 81 en 65% van het aanwezig FA in vrije toestand voorkwam (Tabel 4.3). Dit ogenschijnlijk synergetisch effect kon echter niet bevestigd worden door vrij FA toe te voegen aan AXOS (resultaten niet weergegeven). **FA verknoping** zoals bij AXOS-5-0,23-1,7**c** resulteerde in een sterke daling van de antioxidantcapaciteit ($1,1 \pm 0,1$ $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$) wat erop wijst dat FA een deel van zijn antioxidantcapaciteit wanneer het dimeriseert, zoals ook geconcludeerd werd door Garcia-Conesa *et al.* (1997).

5.3.2 Oxygen radical absorbance capacity test

In Tabel 5.2 wordt de antioxidantcapaciteit van FA, XOS en de verschillende AXOS weergegeven ten opzicht van massa ds van het staal en $\mu\text{mol FA}$ in het staal aanwezig, bepaald via de ORAC test.

Net zoals bij de TEAC test hadden XOS-3-0,04- $<0,1$ de laagste antioxidantcapaciteit (25 ± 3 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$) en AXOS-9-0,39-6,9**v** de hoogste (2000 ± 149 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$). AXOS-5-0,22-1,7**b** hadden een antioxidantcapaciteit van 296 ± 32 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$. FA verarming (AXOS-4-0,19-0,2**v**) en FA verknoping (AXOS-5-0,23-1,7**c**) resulteerde ook hier in een daling van de antioxidantcapaciteit, respectievelijk tot 65 ± 8 en 129 ± 19 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$. FA aanrijking van AXOS-5-0,22-1,7**b** leidde tot een stijging van de antioxidantcapaciteit tot 1786 ± 197 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$. Vrijzetting van FA uit AXOS-10-0,38-7,2**b** leidde hier echter slechts tot een lichte stijging in antioxidantcapaciteit (2000 ± 149 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$; AXOS-9-0,39-6,9**v**) en geen verdubbeling zoals waargenomen bij de TEAC test. Verwijdering van de vrijgezette FA resulteerde opnieuw tot een daling in antioxidantcapaciteit (295 ± 29 $\mu\text{mol Trolox/g ds}$). Uit bovenstaand blijkt opnieuw dat de FA concentratie een belangrijke rol speelt in de antioxidantcapaciteit van AXOS, maar het effect van de verschijningsvorm van FA zich anders uit in de ORAC test dan in de TEAC test.

Opnieuw belichten we het verband tussen FA en de antioxidantcapaciteit verder door de resultaten uit te drukken in $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$ in het staal, hier afgekort als ORAC_{FA} . De antioxidantcapaciteit van vrij FA bedroeg $4,3 \pm 0,5 \mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$ (vergelijkbaar met 3,9 zoals gevonden door Gómez-Ruiz *et al.* (2007) en bijgevolg was FA een 4,3 maal sterker antioxidant dan Trolox. In tegenstelling tot de TEAC test, was de antioxidantcapaciteit van gebonden FA in deze test niet significant verlaagd in vergelijking met vrij FA *as such*, namelijk $3,4 \pm 0,4$ en $4,8 \pm 0,5$ voor respectievelijk AXOS-5-0,22-1,7b en AXOS-10-0,38-7,2b. Vrijzetting van FA leidde echter wel opnieuw tot een significante verhoging van de antioxidantcapaciteit, zoals te zien was bij AXOS-4-0,19-0,2v ($5,5 \pm 0,7$), AXOS-9-0,39-6,9v ($5,6 \pm 0,4$) en AXOS-9-0,36-0,9v ($6,7 \pm 0,6$). Verknoping van FA resulteerde ook hier in een significante daling van de antioxidantcapaciteit ($1,5 \pm 0,2$ voor AXOS-5-0,23-1,7c).

Tabel 5.2: De berekende antioxidantcapaciteit (uitgedrukt in $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ droge stof en $\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$) bepaald via de ORAC test van FA, XOS en AXOS.

	Antioxidantcapaciteit	
	$\mu\text{mol Trolox}/\text{g ds}^1$	ORAC_{FA} ($\mu\text{mol Trolox}/\mu\text{mol FA}$)
FA	$22397 (\pm 2552)^a$	$4,3 (\pm 0,5)^{ab}$
XOS-3-0,04-<0,1	$25 (\pm 3)^b$	$/^2$
XOS-13-0,05-<0,1	$/^2$	$/^2$
AXOS-5-0,22-1,7b	$296 (\pm 32)^c$	$3,4 (\pm 0,4)^a$
AXOS-4-0,19-0,2v	$65 (\pm 8)^d$	$5,5 (\pm 0,7)^c$
AXOS-5-0,23-1,7c	$129 (\pm 19)^e$	$1,5 (\pm 0,2)^d$
AXOS-10-0,38-7,2b	$1786 (\pm 197)^f$	$4,8 (\pm 0,5)^{bc}$
AXOS-9-0,39-6,9v	$2000 (\pm 149)^g$	$5,6 (\pm 0,4)^c$
AXOS-9-0,36-0,9v	$295 (\pm 29)^c$	$6,7 (\pm 0,6)^e$

¹ds: droge stof. ²Antioxidantcapaciteitsbepaling niet mogelijk door te lage waarden. Waarden in dezelfde kolom voor eenzelfde test gevolgd door een verschillende letter zijn significant verschillend van elkaar ($p < 0,05$).

5.3.3 Vergelijking van de Trolox equivalent antioxidantcapaciteit en de Oxygen radical absorbance capacity test

In zowel de TEAC als ORAC test werd de antioxidantcapaciteit gemeten door de inhibitie van geïnduceerde vrije radicalen, deze testen verschilden echter op een aantal vlakken met elkaar. Aangezien de gebruikte buffer bij de TEAC test geen invloed uitoefende op de antioxidantcapaciteitsmeting werd er vanuit gegaan dat dit ook zo het geval zal zijn bij de ORAC test, waardoor deze gestandariseerde methode ongewijzigd uitgevoerd werd. De grote verschillen tussen

beide testen zijn het type radicaal, het moment van de radicaalgeneratie en de tijdsduur waarop de antioxidantmeting wordt uitgevoerd.

Het verschil in antioxidantcapaciteit verkregen bij de TEAC of ORAC test zou kunnen duiden op een verschil in vermogen van de antioxidanten in het staal om respectievelijk $ABTS^{\bullet-}$ of peroxyradicalen te vangen (Thaipong *et al.*, 2006). In tegenstelling tot de ORAC test, waarbij een waterstofatoom getransfereerd wordt tijdens reactie, is de TEAC test gebaseerd op elektrontransfer reacties (Huang *et al.*, 2005) en zijn de geïnduceerde radicalen ($ABTS^{\bullet-}$) lichaamsvreemd. De ORAC test is bijgevolg meer relevant om het antioxidantmechanisme in het menselijk lichaam na te bootsen (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006).

Bovendien verschillen deze testen ook in het **moment van radicaalgeneratie**. Bij de TEAC test, in tegenstelling tot de ORAC test, gebeurt de generatie van $ABTS^{\bullet-}$ radicalen vóór de toevoeging van antioxidanten, waarbij vermeden wordt dat componenten die de radicaalvorming kunnen beïnvloeden reeds aanwezig zijn op dat moment (van den Berg *et al.*, 1999).

Algemeen werden hogere waarden bij de ORAC test verkregen voor eenzelfde staal en waren de verschillen in verschijningsvorm tussen gebonden en vrij FA minder uitgesproken, in vergelijking met de TEAC test. Dit kan verklaard worden doordat de ORAC gedurende een langere **tijd** (60 minuten) de reactie van het antioxidant met het radicaal opvolgt. Hierdoor kunnen ook antioxidanten die een lag-fase in hun antioxidantwerking vertonen, gemeten worden (Huang *et al.*, 2005). De TEAC test daarentegen meet de capaciteit slechts op één moment, na zes minuten, waardoor voor minder snelle antioxidanten, bijvoorbeeld gebonden FA, een lagere antioxidantcapaciteit gedetecteerd wordt. Van Trolox is gekend dat het zeer snel reageert met radicalen (van den Berg *et al.*, 1999).

5.4 Conclusie

Optimalisatie van de TEAC test maakte het mogelijk om antioxidant sterkte te meten in buffercondities die meer relevant zijn voor de dikke darm. Bovendien werd een bereik vastgelegd waarbinnen de antioxidantcapaciteitsbepaling mogelijk was voor FA, XOS en AXOS.

Ten eerste werd met de test vastgesteld dat voornamelijk de **aanwezigheid** van FA een rol speelde op de antioxidantwerking van (A)XOS. Andere structurele kenmerken (DP, A/X-ratio) hadden, binnen het geteste bereik, geen significante invloed op de antioxidantcapaciteit van AXOS. AXOS hebben sterke antioxidanteigenschappen, zeker na aanrijking in FA. Bij XOS, die zeer lage FA concentraties bevatten, was de antioxidantcapaciteit zeer laag en leverden mogelijk andere structurele kenmerken, zoals acetylgroepen of uronzuren, tevens een bijdrage tot de antioxidantcapaciteit.

Ten tweede beïnvloedde de **verschijningsvorm** van FA de antioxidantcapaciteit van FA. Vrij FA had een antioxidantcapaciteit die 2,3 keer sterker was dan Trolox. Wanneer echter FA veresterd was aan arabinose, daalde de antioxidantcapaciteit van FA en dit effect was nog sterker wanneer FA verknoopt voorkwam. Het vrijzetten van gebonden FA resulteerden daarentegen in een opmerkelijke stijging van de antioxidantcapaciteit van AXOS.

Bij vergelijking van de twee gebruikte antioxidantcapaciteitstesten (TEAC en ORAC test) kan geconcludeerd worden dat dezelfde trends naar voor kwamen. Beide testen maakten gebruik van het meten van de inhibitie van geïnduceerde vrije radicalen. Omwille van de continue, langere antioxidantmeting bij de ORAC test, was de invloed van het vrij of gebonden voorkomen van FA op de antioxidantcapaciteit van AXOS minder uitgesproken.

Uit deze studie blijkt dat AXOS goede antioxidanteigenschappen vertonen en dat FA de bepalende factor is voor de antioxidantcapaciteit van AXOS. Verder *in vivo* onderzoek is nodig naar het werkelijke effect dat deze antioxidanten uitoefenen in het lichaam. In het volgend hoofdstuk wordt er reeds dieper ingegaan op onder andere de wijzigingen in FA (gehalte en verschijningsvorm) en antioxidantcapaciteit van AXOS gedurende de *in vitro* fermentatie van AXOS.

HOOFDSTUK 6 *IN VITRO* FERMENTATIE VAN XOS EN AXOS

6.1 Inleiding

Recent zijn (A)XOS geïntroduceerd als alternatief prebiotica (Grootaert *et al.*, 2007; Vardakou *et al.*, 2007). In dit proefschrift werd de mogelijke invloed van structurele kenmerken van (A)XOS op hun prebiotische eigenschappen bestudeerd. Hierbij werd de invloed van de DP op de prebiotische eigenschappen van XOS en de invloed van de aanwezigheid van FA (vrij of gebonden) op AXOS onderzocht tijdens een *in vitro* fermentatie-experiment met behulp van het effluent van de SHIME reactor. In een eerste deel worden de opzet van het experiment en de bijhorende analyses toegelicht. Vervolgens worden de resultaten besproken met een daaropvolgende discussie over de invloed van structurele parameters op de (A)XOS fermentatie.

6.2 Materialen

De gebruikte reagentia en chemicaliën waren van analytische graad en afkomstig van Sigma-Aldrich, tenzij anders vermeld. Voor de *in vitro* fermentatie werden vijf verschillende soorten (A)XOS stalen gebruikt. Het betreft twee XOS stalen, XOS-3-0,04- $<0,1$ en XOS-13-0,05- $<0,1$; en drie AXOS stalen, AXOS-10-0,38-7,2b (gebonden FA rijke AXOS); AXOS-9-0,39-6,9v (vrij FA rijke AXOS) en AXOS-9-0,36-0,9v (FA arme AXOS).

6.3 Methoden

6.3.1 *In vitro* fermentatie met behulp van het effluent van de SHIME reactor

Principe

In vitro fermentatie van de XOS en AXOS stalen werd uitgevoerd met behulp van het effluent van de SHIME reactor (Figuur 1.2, § 1.4) in samenwerking met Laboratorium van Microbiële Ecologie en Technologie (LabMET, UGent).

Procedure

(A)XOS [500 mg DS (A)XOS berekend op basis van het (A)XOS-gehalte van de stalen (§ 4.4.2)] werden opgelost in 50 ml fermentatievloeistof, afkomstig van het effluent van het dalend colon van de SHIME reactor, in vooraf gepasteuriseerde donkere flesjes. De flesjes werden afgesloten van de omgeving via een membraan en onder anaërobe condities geplaatst met behulp van “*Short operating procedure gas exchange apparatus*”, dat de flesjes afwisselend met N₂ (0,6 bar) flushte en vacuüm trok gedurende 5 minuten. Deze stalen werden vervolgens geïncubeerd bij 37 °C en continu

geschud (110 toeren/min). Na 6, 24 en 48 uur werd er staalname met naald uitgevoerd voor verdere analyse. Na staalname werden de stalen onmiddellijk ingevroren voor toekomstige analyse. De *in vitro* fermentatie werd in triplo uitgevoerd (Batch 1, 2 en 3) met dagvers effluent. Het effluent van het descending colon compartiment van de SHIME zonder toevoeging van (A)XOS werd geanalyseerd als blanco waarde. Voor verdere analyse werden de stalen steeds op ijs bewaard of gefiltersteriliseerd (0,22 µm) om verdere microbiële activiteit uit te sluiten. De in triplo uitgevoerde fermentatiestalen werden steeds in enkelvoud geanalyseerd tenzij anders vermeld in de procedure.

6.3.2 Bepaling van het gehalte aan totale monosachariden

De bepaling van het totale suikergehalte van de fermentatiesuspensie werd bepaald zoals reeds beschreven in § 4.3.5. Hierbij werd vertrokken met 800 µl fermentatiesuspensie te verdunnen tot 2,5 ml alvorens 2,5 ml 4,0 N TFA toe te voegen en de hydrolyse te starten. Na reductie en acetylatie werden de stalen geanalyseerd via GC. Voor het 0 uur fermentatietijdstip werd het totale suikergehalte in de fermentatievloeistof na toevoeging van de (A)XOS berekend met behulp van de afgewogen hoeveelheden en de suikersamenstelling van de (A)XOS (zie Tabel 4.3).

Het AXOS-gehalte en de A/X-ratio na 6, 24 en 48u fermentatie werden bepaald zonder correctie voor het vrije suikergehalte, zoals weergegeven in onderstaande formules:

$$AXOS (\%) = (totale X (\%) + totale A (\%)) \times 0,88$$

$$A/X - ratio = \frac{totale A (\%)}{totale X (\%)}$$

6.3.3 Bepaling van de XOS samenstelling op basis van hun polymerisatiegraad

Principe

Met behulp van hoge performantie anion-uitwisselingschromatografie met geïntegreerde gepulseerde amperometrische detectie (HPAEC-iPAD) is het mogelijk om XOS te scheiden en te kwantificeren op basis van hun DP. Deze procedure werd enkel toegepast op de XOS-3-0,04- < 0,1 aangezien slechts standaarden tot DP 6 beschikbaar zijn.

Procedure

In een eerste stap werden de XOS fermentatiestalen 100 keer verdund in gedeïoniseerd water. Vervolgens werd aan 400 µl van de verdunde oplossing 500 µl gedeïoniseerd water en 100 µl IS (20,0 mg L-rhamnose in 100 ml gedeïoniseerd water) toegevoegd en werden de stalen na

filtersteriliseren (0,22 µm) overgebracht in *vials* met schroefdop voor detectie met HPAEC-iPAD. Een ijkoplossing, bestaande uit L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, β-1,4-D-xylobiose, β-1,4-D-xylotriose, β-1,4-D-xylotetraose, β-1,4-D-xylopentaose en β-1,4-D-xylohexaose (5,0 µg/ml in gedeïoniseerd water), werd tevens geanalyseerd.

De stalen werden gescheiden met een CarboPac PA-100 kolom (250 x 4 mm) (Dionex, Sunnyvale, CA, VS) in een Dionex ICS-3000 chromatograaf, uitgerust met een autosampler en een gepulseerde amperometrische detector. Xylose en XOS werden gescheiden met behulp van een lineaire gradiënt van 100 mM NaOH en een 400 mM natriumacetaat in 100 mM NaOH-oplossing. De elutiëgradiënt is weergegeven in Tabel 6.1.

Tabel 6.1: Gebruikte elutiëgradiënt voor bepaling van de XOS samenstelling met behulp van HPAEC-iPAD.

Tijd (min)	100 mM NaOH (%)	400 mM natriumacetaat in 100 mM NaOH (%)
0	100	0
5	100	0
35	68	32
35,1	0	100
40	0	100

Dataverwerking

De concentraties van xylose en de verschillende XOS aanwezig in het staal werden bepaald met behulp van een RF bekomen via de externe ijkoplossing. De XOS concentratie kon vervolgens bekomen worden door de afzonderlijke XOS op te tellen.

$$XOS \text{ concentratie (mg/ml)} = \sum_{i=1}^6 [X_i]$$

Met deze methode werden enkel ongesubstitueerde XOS gemeten aangezien het niet mogelijk was om met deze methode arabinosegesubstitueerde XOS te kwantificeren. Vrij xylose wordt mee opgenomen in de formule aangezien dit vrij gezet werd gedurende de incubatie.

6.3.4 Bepaling van het totale en vrije ferulinezuurgehalte

Bij de bepaling van het totale en vrije FA-gehalte in de fermentatiestalen werd telkens 0,5 ml gefermenteerd staal verdund met 0,5 ml gedeïoniseerd water. Verdere analyse verliep zoals beschreven in § 4.3.6. Ook fermentatievloeistof zonder opgeloste XOS en AXOS werd geanalyseerd.

6.3.5 Bepaling van de pH

De pH van de fermentatiesuspensie werd op tijdstip 0 uur gemeten en op moment van de staalname verder opgevolgd gedurende de incubatie van de (A)XOS stalen.

6.3.6 Bepaling van het gehalte aan korte ketenvetzuren

Principe

Na vloeistof-vloeistof extractie werd het gehalte aan KKVZ (azijnzuur, propionzuur, boterzuur, isovalerinezuur en isoboterzuur) bepaald met behulp van GC. Deze procedure is gebaseerd op de methode van Van de Wiele (2004). De analyses werden uitgevoerd in LabMET (UGent).

Procedure

Fermentatiesuspensie (1,0 ml) werd eerst tweemaal verdund met gedeïoniseerd water en aangezuurd met 0,5 ml H_2SO_4 (50%). Alvorens extractie werden NaCl (ongeveer 0,4 g) en 2-methylhexaanzuur (IS; 0,4 ml van 0,75% (v/v)) toegevoegd. Vloeistof-vloeistof extractie werd uitgevoerd door toevoeging van 2,0 ml diethylether, vertikaal roteren (2 minuten) en centrifugatie (3 minuten, 1500 g, 20 °C). De bovenste laag, de etherlaag met KKVZ, werd afgepipetteerd en overgebracht in een GC *vial* voor verdere analyse. Fermentatievloeistof zonder opgeloste (A)XOS werd geanalyseerd als 0 uur fermentatietijdstip.

Samen met de onbekende stalen werden ook standaarden geanalyseerd. Hiervoor werd telkens aan 500 μ l van een ijkoplossing (Supelco volatile acid standaard mix, Supelco Analytic, Bellefonte, PA, V.S.), die gekende concentraties (ongeveer 10,0 mM) van azijnzuur, propionzuur, boterzuur, isovalerinezuur en isoboterzuur bevatte, 100 μ l IS en 100 μ l zoutoplossing (20 g NaCl/100 ml gedeïoniseerd water) toegevoegd. Deze standaarden ondergingen de vloeistof-vloeistofextractie en verdere analyse zoals beschreven voor de stalen.

Analyse werd uitgevoerd met een Di200 GC (Shimadzu, 's-Hertogenbosch, Nederland), uitgerust met een capillaire vetzuurvrije kolom (EC-1000 Econo-Cap kolom; Alltech, Laarne, België; 25 m x 0,53 mm; filmdikte 1,2 μ m), vlamionisatie detector en een Delsi Nermag 31 integrator (Thermo Separation Products, Wilrijk, België). Het injectievolume was 1 μ l en het temperatuurprofiel was ingesteld van 110 tot 160 °C met een temperatuurstijging van 6 °C/min. Stikstof werd gebruikt als draaggas, de elutiesnelheid was 20 ml/minuut en de kolomtemperatuur en temperatuur van de injector en de detector bedroegen respectievelijk 130 en 195 °C.

Dataverwerking

De KKVZ werden geïdentificeerd op basis van de retentietijden van de KKVZ in de ijkoplossingen. Via RF'en werden de gehalten van de verschillende vetzuren bepaald.

6.3.7 Bepaling van het ammoniakgehalte

Principe

De onderstaand beschreven procedure voor het kwantificeren van ammoniak is gebaseerd op de methode van Van de Wiele (2004). Door gebruik te maken van destillatie gevolgd door titrimetrische analyse werd het ammoniumgehalte in het staal bepaald. De analyses werden uitgevoerd in LabMET (UGent).

Procedure

Staal (1,0 ml) werd door toevoeging van 0,4 g MgO onder alkalische omstandigheden gebracht waarbij ammoniumionen omgezet worden tot ammoniak. Door verhitting in een destillatiebuis in de Vapodest 30 (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Duitsland) werd ammoniak overgedestilleerd naar een boorzuoroplossing (20,0 g/l) waar het opgevangen werd als $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$. Tenslotte werd deze oplossing teruggetitreerd met 0,02 N HCl, gebruik makend van 665 Dosimat (Metrohm) en 686 Titroprocessor (Metrohm). Fermentatievloeistof zonder opgeloste (A)XOS werd geanalyseerd als 0 uur fermentatietijdstip.

Dataverwerking

Het benodigde volume HCl-oplossing ($V_{\text{HCl (staal)}}$) bij de terugtitratie was een maat voor de hoeveelheid ammoniak. De bekomen waarde werd gecorrigeerd met een controle staal (gedeïoniseerd water, $V_{\text{HCl (controle)}}$). De ammoniakconcentratie werd bepaald via onderstaande formule waarbij 0,02 de titer van de HCl oplossing bedraagt.

$$\text{NH}_4^+ \text{ - concentratie (mM)} = \frac{(V_{\text{HCl (staal)}} - V_{\text{HCl (controle)}}) \times 0,02 \times 1000}{V_{\text{staal}}}$$

6.3.8 Bepaling van de enzymactiviteit

6.3.8.1 Voorbehandeling

Principe

Microbiële enzymen die zorgen voor de afbraak van XOS en AXOS kunnen zowel extra- als intracellulaire, membraan- of niet-membraangeassocieerd zijn (Madigan *et al.*, 2009). Om de activiteit van intracellulaire enzymen te kunnen bepalen, werden deze vrijgesteld door cellysis. Door combinatie van niet of wel te filtreren en/of soniceren kan er tevens meer informatie bekomen worden over waar de voornaamste enzymactiviteit zich bevindt.

Procedure

Aan de fermentatiestalen werd 25 µl protease inhibitor (50,0 mg in 5,0 ml gedeïoniseerd water) toegevoegd alvorens verdere behandelingen om de mogelijke aanwezigheid van protease-activiteit teniet te doen. **Staal A** werd bekomen door de stalen direct te filtersteriliseren, waarbij zowel intracellulaire als extracellulair membraangeassocieerde enzymen verwijderd werden en bijgevolg enkel extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymen aanwezig bleven. Een tweede staal (**staal B**) werd verkregen door de cellen te onderwerpen aan cellysis. Hierbij werden de stalen drie maal gesoniceerd gedurende 20 seconden met telkens een rustpauze van 30 seconde tussen elke behandeling. In dit staal waren zowel de intracellulaire als extracellulaire, membraangeassocieerde als niet-membraangeassocieerde enzymen nog aanwezig. Deze methode is echter niet geoptimaliseerd voor onze stalen, waardoor mogelijks niet alle cellen gelyseerd werden. Door staal B te filtersteriliseren werden membraangeassocieerde enzymen verwijderd (**staal C**). In dit staal waren zowel intracellulaire als extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymen aanwezig in de fermentatiesuspensie. De stalen werden ingevroren bewaard tot verdere analyse. Enzymactiviteit werd geanalyseerd op de stalen A, B en C.

Dataverwerking

De totale enzymactiviteit werd bepaald door de activiteit van staal B te meten. De activiteit van extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymen werd gekwantificeerd met behulp van staal A. Het gehalte aan intracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymenactiviteit werd berekend door de activiteit van staal A af te trekken van de activiteit van staal C. Tenslotte werd de membraangeassocieerde enzymactiviteit bepaald door de activiteit van staal C af te trekken van de activiteit van staal B.

6.3.8.2 Endoxylanase activiteit

Principe

De endoxylanase activiteit werd spectrofotometrisch bepaald met behulp van 'Xylazyme-AX' tabletten, zoals beschreven in Pollet *et al.* (2012) met enkele wijzigingen. Deze tabletten bevatten een sterk gecrosslinkt en wateroplosbaar AX gekleurd met azurine. Door endoxylanase activiteit worden waterextraheerbare AX componenten, met gebonden azurine, vrijgesteld. De hoeveelheid azurine in oplossing is een maat voor de endoxylanase activiteit en kan spectrofotometrisch bepaald worden bij een golflengte van 590 nm.

Procedure

Voor de bepaling van endoxylanase activiteit werd er op zoek gegaan naar optimale condities voor activiteitsmeting. Hiervoor werden verschillende volumes (50 μ l en 200 μ l), van de in § 6.3.8.1 voorbehandelde stalen, bij verschillende incubatietijden (2, 3, 4, 6, 8 en 17 uur) getest. De stalen werden met McIlvaine buffer (pH 6,5) aangelengd tot een totaal volume van 500 μ l. Na pre-incubatie bij 37 °C gedurende 10 minuten werd een Xylazyme-AX tablet toegevoegd. De reactie werd uitgevoerd gedurende de verschillende incubatietijden en vervolgens gestopt door 5,0 ml TRIS-oplossing (2,0% w/v) toe te voegen, krachtig te mengen en te filtreren. De blancowaarde werd bepaald door een Xylazyme-AX tablet toe te voegen aan 500 μ l buffer en dit staal te onderwerpen aan dezelfde procedure. Voor de stalen en blanco's, werd telkens een controle meegenomen in de test, waarbij het staal/buffer gedurende eenzelfde tijdspanne geïncubeerd werd zonder toevoeging van een Xylazyme-AX tablet. Ook hierbij werd na incubatie 5,0 ml TRIS-oplossing toegevoegd en gefiltreerd. Fermentatievloeistof zonder opgeloste (A)XOS werd geanalyseerd als 0 uur fermentatietijdstip. De enzymactiviteit werd colorimetrisch bepaald door de extinctie van de oplossing te meten bij 590 nm (Ultrospec III UV/vis spectrofotometer, Pharmacia Biotech). De enzymactiviteitsbepaling van de fermentatiestalen werd telkens in duplo uitgevoerd.

Dataverwerking

De gemeten extinctiewaarde van de stalen (E_{staal}) en buffer (E_{buffer}) werd gecorrigeerd met de controlewaarde (respectievelijk $E_{\text{controle staal}}$ en $E_{\text{controle buffer}}$). Voor de berekening van het aantal xylanase eenheden (U_x) werd de bekomen extinctiewaarde van het staal vervolgens bijkomend gecorrigeerd met de gecorrigeerde extinctiewaarde van de buffer geïncubeerd met Xylazyme-AX tablet. Eén U_x is de hoeveelheid enzym per ml nodig om na 60 minuten een extinctiewaarde van 1,0 bij 590 nm te verkrijgen onder de experimentele omstandigheden (37 °C, pH 6,5).

$$\text{Xylanase activiteit } (U_x) = \frac{(E_{\text{staal}} - E_{\text{controle staal}}) - (E_{\text{buffer}} - E_{\text{controle buffer}})}{V_{\text{staal}} \times \text{incubatietijd } (u)}$$

6.3.8.3 Arabinofuranosidase en xylosidase activiteit

Principe

De arabinofuranosidase en xylosidase activiteit in de stalen wordt bepaald door gebruik te maken van respectievelijk thermostabiel *p*-nitrofenyl- α -L-arabinofuranoside (*p*NP-Ara) en *p*-nitrofenyl- β -D-xylopyranoside (*p*NP-Xyl). Hierbij wordt het gehalte door hydrolyse vrijgestelde *p*-nitrofenol (*p*NP) spectrofotometrisch bepaald bij 415 nm. De gebruikte procedure is gebaseerd op Pollet *et al.* (2012), met enkele wijzigingen.

Procedure

De voorbehandelde stalen (§ 6.3.8.1) werden twee maal verdund met gedeïoniseerd water. Aan 50 μ l staal werd na exact 5 minuten pre-incubatie, 50 μ l van 50 μ M *p*NP-Ara of *p*NP-Xyl (in McIlvaine buffer, pH 6,5) toegevoegd. De incubatie werd uitgevoerd bij 37 °C gedurende exact 60 en 180 minuten voor de bepaling van respectievelijk de arabinofuranosidase en xylosidase activiteit. De reactie werd gestopt door 100 μ l TRIS-oplossing (2,0% w/v) toe te voegen. Verder werd ook een calibratiecurve met gekende concentraties *p*NP (0 – 0,12 μ M) opgesteld. Tevens werd een blanco-staal bereid door 50 μ l staal gedurende de onderzochte tijdspanne te incuberen en hieraan eerst 100 μ l TRIS-oplossing en nadien 50 μ l van het *p*NP-substraat, dat apart ook gedurende de onderzochte tijdspanne geïncubeerd werd bij 37 °C, toe te voegen. Fermentatievloeistof zonder opgeloste (A)XOS werd geanalyseerd als 0 uur fermentatietijdstip. De *p*NP-vrijzetting werd colorimetrisch bepaald door de extinctie van de oplossing te meten bij 415 nm (Microplate Reader Bio-Rad Model 680, Biorad Laboratories, Nazareth, België). De verschillende fermentatiestalen werden in duplo geanalyseerd.

Dataverwerking

De gemeten extinctiewaarde werd gecorrigeerd met de blancowaarde, waarna met behulp van de richtingscoëfficiënt van de calibratiecurve de gecorrigeerde extinctiewaarde werd omgerekend naar *p*NP-concentraties. De enzymactiviteit werd uitgedrukt in nanokatal (nmol/s) (nkat) *p*NP-equivalenten per ml die vrijgezet werden in de experimentele omstandigheden (37 °C, pH 6,5).

6.3.9 Bepaling van de antioxidantcapaciteit

Het antioxidant potentieel van de *in vitro* gefermenteerde stalen werd bepaald via de TEAC test zoals beschreven in § 5.3.1. Deze test werd enkel uitgevoerd op fermentatiestalen van gebonden AXOS-10-0,38-7,2b; AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v. Op voorhand werden de stalen gefiltersteriliseerd (0,22 µm). De verschillende fermentatiestalen werden bij verschillende concentraties in duplo geanalyseerd. De gemeten extinctiewaarde werd gecorrigeerd met de extinctiewaarde bekomen na toevoeging van 40 µl buffer aan 1960 µl van de ABTS^{•-} oplossing.

De antioxidantcapaciteit werd voor deze stalen uitgedrukt in µmol Trolox per ml fermentatiesuspensie.

$$\text{Antioxidantcapaciteit } (\mu\text{mol Trolox/ml fermentatiesuspensie}) = \frac{|\Delta Abs_{\text{staal}}|}{R_{\text{ico}} \times V_{\text{staal in cuvet}}}$$

6.3.10 Statistische analyse

De statistische verwerking werd uitgevoerd met behulp van SAS-software 9.2 (SAS institute Inc., Cary, NC, VS). Na het uitvoeren van een twee-staps ANOVA-test, werd een Tukey-test ($p < 0,05$) gebruikt om significante verschillen tussen groepsgemiddelden te achterhalen.

6.4 Resultaten

6.4.1 Inleiding

Om meer inzicht te verwerven in de prebiotische eigenschappen van (A)XOS werd het fermentatiegedrag van (A)XOS opgevolgd na 6, 24 en 48 uur. Tijdens deze fermentatie wordt niet alleen de koolhydraatstructuur gedegradieerd, maar zal ook FA veranderingen ondergaan (Saura-Calixto *et al.*, 2007). Bovendien zou (vrij of gebonden) FA de fermentatie van AXOS kunnen beïnvloeden, daar het een impact heeft op de hydrolytische afbraak van FA gebonden structuren (Andreasen *et al.*, 2001a) en inhiberend kan werken op enzymen (Boukari *et al.*, 2011). Ook de invloed van de DP op de fermentatie van XOS werd bestudeerd.

Hierbij werd niet enkel gekeken worden naar veranderingen in (A)XOS en FA samenstelling, maar ook naar de vorming van metabolieten ten gevolge van koolhydraatfermentatie (lineaire KKVZ) en proteïnefermentatie (vertakte KKVZ en ammoniak).

Ook de activiteit van hydrolytische enzymen nodig voor de afbraak van (A)XOS werd onderzocht. Structurele kenmerken zoals de DP, A/X-ratio en FA (vrij en gebonden) aanwezigheid kunnen de werking van deze enzymen en de fermenteerbaarheid van (A)XOS beïnvloeden (Kabel *et al.*, 2002b; Grootaert *et al.*, 2007).

Daarnaast werd de antioxidantcapaciteit van de AXOS bevattende fermentatiesuspensies onderzocht aangezien FA sterke antioxidanteigenschappen heeft (Graf, 1992) en fermentatie ervan kan beïnvloeden.

6.4.2 Afbraak van (A)XOS tijdens *in vitro* fermentatie

6.4.2.1 Afbraak van de koolhydraatstructuur van (A)XOS gedurende fermentatie

De XOS en AXOS fermentatie werd uitgedrukt als de afname van (A)XOS gedurende het fermentatie-experiment. De waarden werden relatief ugedrukt ten opzichte van de initiële concentratie (A)XOS bij aanvang van het experiment. Deze concentratie werd berekend op basis van het totale volume van de fermentatiesuspensie, de opgeloste hoeveelheid staal en het (A)XOS-gehalte (Tabel 4.3) ervan. Voor sommigen stalen week dit licht af van de (in enkelvoud) experimenteel bepaalde 0 uur fermentatie waarden, bekomen na heroplossen van staal in dezelfde concentratie zoals eerder besproken in de opzet van de proef, weliswaar in een kleiner volume (resultaten niet weergegeven).

Tabel 6.2 geeft het resterend **XOS-gehalte** relatief ten opzichte van de startconcentraties van XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1; respectievelijk 11,5 en 10,9 mg/ml, weer. Na 6 uur incubatie bleek al 13% van de XOS-3-0,04-<0,1 gefermenteerd, terwijl XOS-13-0,05-<0,1 slechts voor 3%

gefermenteerd waren. De koolhydraatfermentatie van XOS-3-0,04-<0,1 nam significant toe in functie van de fermentatietijd. Zowel na 24 uur als na 48 uur kan een significante daling in het XOS-gehalte vastgesteld worden, waarbij respectievelijk 77 ± 2 en 72 ± 1 % van de XOS-3-0,04-<0,1 ongefermenteerd in het medium achter bleven. XOS-13-0,05-<0,1 bleken minder snel gefermenteerd te worden en na 48 uur was slechts een afname tot 79 ± 4 % XOS te zien. Gedurende de 48 uren fermentatie was het verschil in afname tussen XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1 echter niet significant.

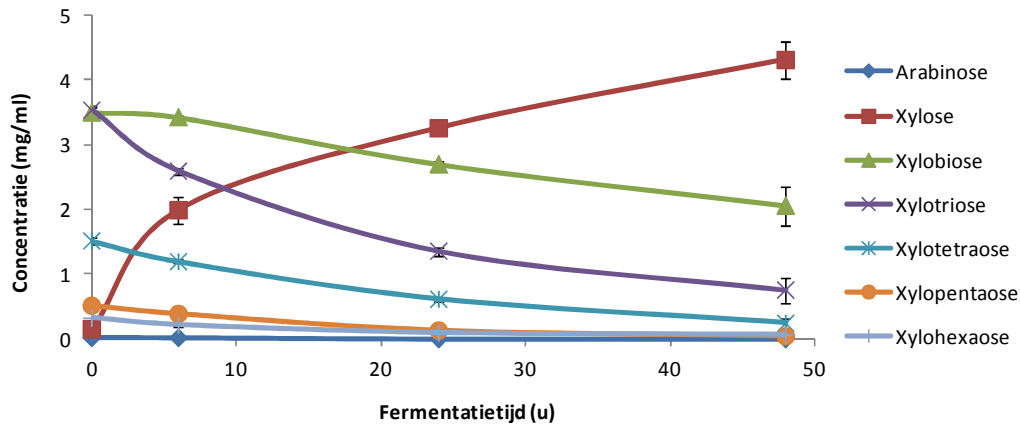
Tevens is het resterend gehalte aan **AXOS** in functie van de fermentatietijd weergegeven in Tabel 6.2. Opnieuw werd een significante daling in het gehalte aan AXOS waargenomen, als gevolg van fermentatie. Na 24 uur incubatie kon een significant verschil vastgesteld worden tussen de AXOS stalen onderling. Slechts 72 ± 3 % van de AXOS-9-0,36-0,9v bleef ongefermenteerd in het medium achter terwijl van de FA rijke AXOS 81 ± 2 % en 85 ± 4 %, respectievelijk voor AXOS-10-0,38-7,2b en AXOS-9-0,39-6,9v; nog niet gefermenteerd was. Dit verschil was nog meer uitgesproken wanneer de AXOS 48 uur gefermenteerd waren, waarbij het resterende AXOS-gehalte 77 ± 4 %, 80 ± 4 % en 66 ± 3 % bedroeg voor respectievelijk AXOS-10-0,38-7,2b; AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v. Dit laatste staal was bovendien meer gefermenteerd dan XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1 (respectievelijk 72 en 79%).

Tabel 6.2: Resterend gehalte aan (A)XOS (%), procentueel uitgedrukt ten opzichte van het theoretisch bepaald initieel gehalte aan XOS, na incubatie van 6, 24 en 48 uur. Waarden van verschillende (A)XOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde (A)XOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

	Resterend gehalte aan (A)XOS (% uitgedrukt ten opzicht van 0 uur)			
	0 uur	6 uur	24 uur	48 uur
XOS-3-0,04-<0,1	100 (± 3) ^{Aa}	87 (± 3) ^{Ab}	77 (± 2) ^{ABc}	72 (± 1) ^{ABc}
XOS-13-0,05-<0,1	100 (± 2) ^{Aa}	97 (± 6) ^{Aa}	83 (± 3) ^{Ab}	79 (± 4) ^{Ab}
AXOS-10-0,38-7,2b	100 (± 1) ^{Aa}	89 (± 3) ^{Ab}	81 (± 3) ^{Ac}	77 (± 4) ^{Ac}
AXOS-9-0,39-6,9v	100 (± 1) ^{Aa}	94 (± 6) ^{Aab}	85 (± 4) ^{Abc}	80 (± 5) ^{Ac}
AXOS-9-0,36-0,9v	100 (± 2) ^{Aa}	87 (± 2) ^{Ab}	72 (± 3) ^{Bc}	66 (± 3) ^{Bd}

XOS fermentatie werd ook nog nagegaan door deze stalen op basis van hun polymerisatiegraad te scheiden en de concentratie van de verschillende sachariden in functie van de fermentatietijd te bepalen (Figuur 6.1). Op tijdstip 0 werd een experimenteel bepaalde waarde, verkregen door eenzelfde concentratie XOS op te lossen zoals gebeurd was bij de opzet van de proef en mee te onderwerpen aan de analyse. Het gehalte arabinose in deze stalen was zeer laag (< 0,1) en bleef constant. Gedurende de 48 uren durende incubatie daalde de concentratie van de verschillende XOS door afbraak van deze koolhydraten en dit sneller voor XOS met een hogere DP.

De xyloseconcentratie steeg gedurende de incubatie tot $4,3 \pm 0,3$ mg/ml na 48 uur fermentatie. Opnieuw kon een fermentatiegraad berekend worden door bij elk tijdstip de som van de sachariden te nemen, en deze uit te zetten relatief ten opzicht van de XOS concentratie bij 0 uur incubatie (100%). Dit resulteerde in een resterend XOS-gehalte van 78 ± 8 % na 48 uur.



Figuur 6.1: De verandering in concentratie van arabinose, xylose en XOS met verschillende DP (mg/ml) opgevolgd na 0, 6, 24 en 48 uur in vitro fermentatie van XOS-3-0,04-<0,1.

Tijdens de fermentatie van zowel XOS-3-0,04-<0,1 als XOS-13-0,05-<0,1 bleek de **A/X-ratio** van de ongefermenteerde fractie redelijk constant ($0,05 \pm 0,01$) te blijven (Tabel 6.3). Bij AXOS-10-0,38-7,2b; AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v bedroeg de A/X-ratio bij aanvang van het experiment respectievelijk 0,36; 0,37 en 0,36. Deze ratio bleef ongeveer constant gedurende 48 uur fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2b (0,34). Bij AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v daalde de A/X-ratio van de ongefermenteerde fractie tot respectievelijk 0,28 en 0,27 na 48 uur incubatie.

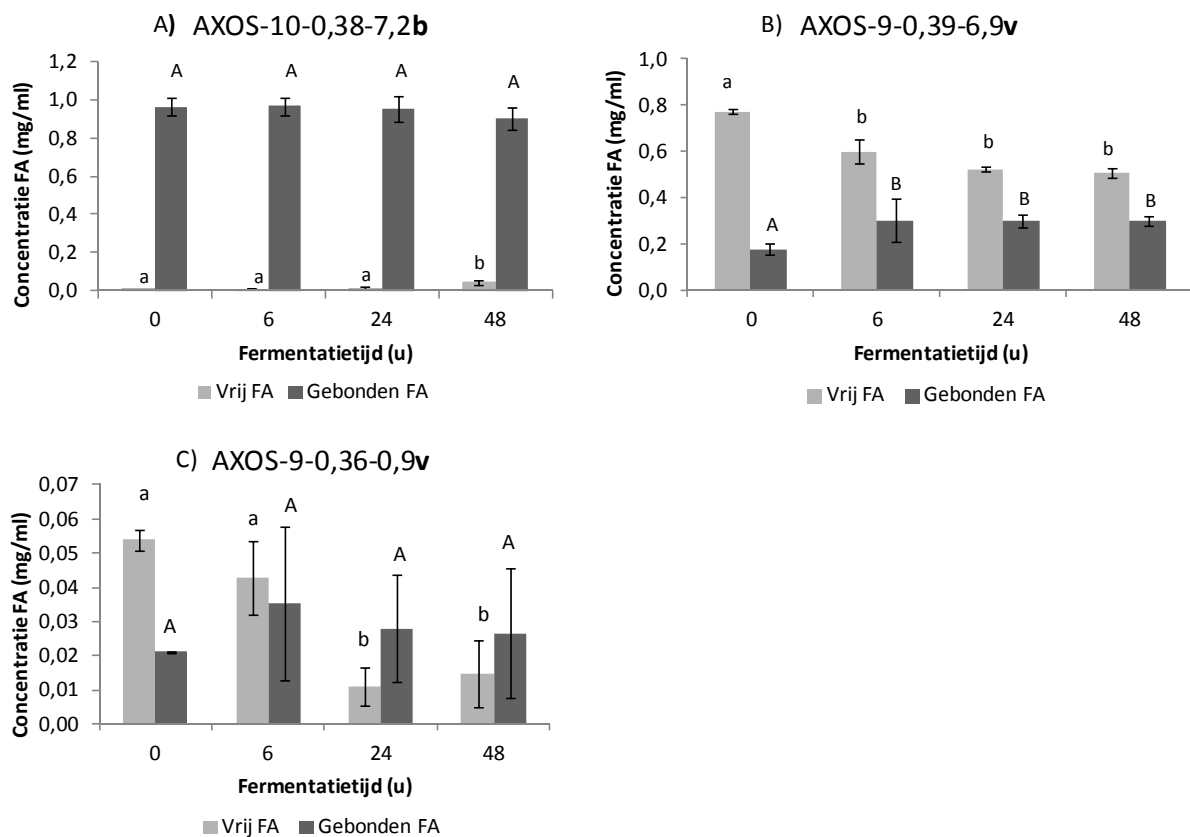
Tabel 6.3: A/X-ratio van ongefermenteerde fractie na in vitro fermentatie van XOS en AXOS gedurende 0, 6, 24 en 48 uur incubatie.

	A/X-ratio van ongefermenteerde fractie AXOS			
	0 uur	6 uur	24 uur	48 uur
XOS-3-0,04-<0,1	0,05 ($\pm 0,01$)	0,04 ($\pm 0,01$)	0,04 ($\pm 0,01$)	0,04 ($\pm 0,01$)
XOS-13-0,05-<0,1	0,05 ($\pm 0,01$)	0,05 ($\pm 0,01$)	0,04 ($\pm 0,01$)	0,05 ($\pm 0,01$)
AXOS-10-0,38-7,2b	0,36 ($\pm 0,01$)	0,36 ($\pm 0,01$)	0,34 ($\pm 0,01$)	0,34 ($\pm 0,01$)
AXOS-9-0,39-6,9v	0,37 ($\pm 0,01$)	0,36 ($\pm 0,01$)	0,30 ($\pm 0,01$)	0,28 ($\pm 0,01$)
AXOS-9-0,36-0,9v	0,36 ($\pm 0,01$)	0,32 ($\pm 0,01$)	0,28 ($\pm 0,01$)	0,27 ($\pm 0,01$)

6.4.2.2 Veranderingen in vrij en gebonden FA tijdens fermentatie van AXOS

In Figuur 6.2A is de concentratie vrij en gebonden FA in het AXOS-10-0,38-7,2b staal weergegeven in functie van de fermentatietijd. Bij aanvang van de fermentatie was $0,96 \pm 0,04$ mg/ml gebonden FA en minder dan 0,01 mg/ml vrij FA aanwezig in de fermentatievloeistof. Deze initiële waarde was opnieuw theoretisch berekend, net zoals voor de

andere stalen, op basis van de concentraties AXOS in de fermentatiesuspensie en het % FA van de AXOS (Tabel 4.3). Deze berekende waarden lagen iets lager dan de (in enkelvoud) experimenteel bepaalde waarden bij 0 uur fermentatie, verkregen door AXOS in eenzelfde concentratie op te lossen (resultaten niet weergegeven). Fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2^b resulteerde in een kleine, maar geen significante afname van het gehalte aan gebonden FA, namelijk $0,90 \pm 0,06$ mg/ml na 48 uur fermentatie. Het vrij FA-gehalte vertoonde gedurende de eerste 24 uur fermentatie ook geen significante verandering, maar na 48 uur fermentatie werd wel een lichte en significante stijging tot $0,04 \pm 0,01$ mg/ml vastgesteld.



Figuur 6.2: Concentratie vrij FA (licht grijze balk) en gebonden FA (donker grijze balk) (mg/ml) in **A)** AXOS-10-0,38-7,2^b, **B)** AXOS-9-0,39-6,9^v en **C)** AXOS-9-0,36-0,9^v tijdens in vitro fermentatie na 0, 6, 24 en 48 uur. Waarden van eenzelfde verschijningsvorm van FA verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde letter delen.

De **AXOS-9-0,39-6,9^v** hadden bij aanvang van de incubatie een hoog vrij FA-gehalte ($0,77 \pm 0,01$ mg/ml) en een laag gebonden FA-gehalte ($0,18 \pm 0,03$ mg/ml) (Figuur 6.2B). Het gebonden FA-gehalte lag significant lager bij aanvang ten opzichte van de andere meetpunten. Er werden geen significante veranderingen in gebonden FA concentratie (ongeveer 0,30 mg/ml) waargenomen tussen 6 en 48 uur fermentatie. Het vrij FA-gehalte daalde gedurende fermentatie al kon er geen significant verschil meer vastgesteld worden tussen de gehalten tussen 6 en 48 uur fermentatie. Hierdoor daalde ook het totaal FA-gehalte significant gedurende 48 uur incubatie.

Ook fermentatie van **AXOS-9-0,36-0,9v** (Figuur 6.2C) resulteerde niet in een significante verandering in gebonden FA, waarbij zowel bij aanvang als na 48 uur fermentatie ongeveer 0,02 mg/ml gebonden FA aanwezig was. FA was meer in vrije vorm aanwezig in dit staal, namelijk ongeveer 0,05 mg/ml en dit gehalte daalde significant tot $0,02 \pm 0,01$ mg/ml na 48 uur fermentatie.

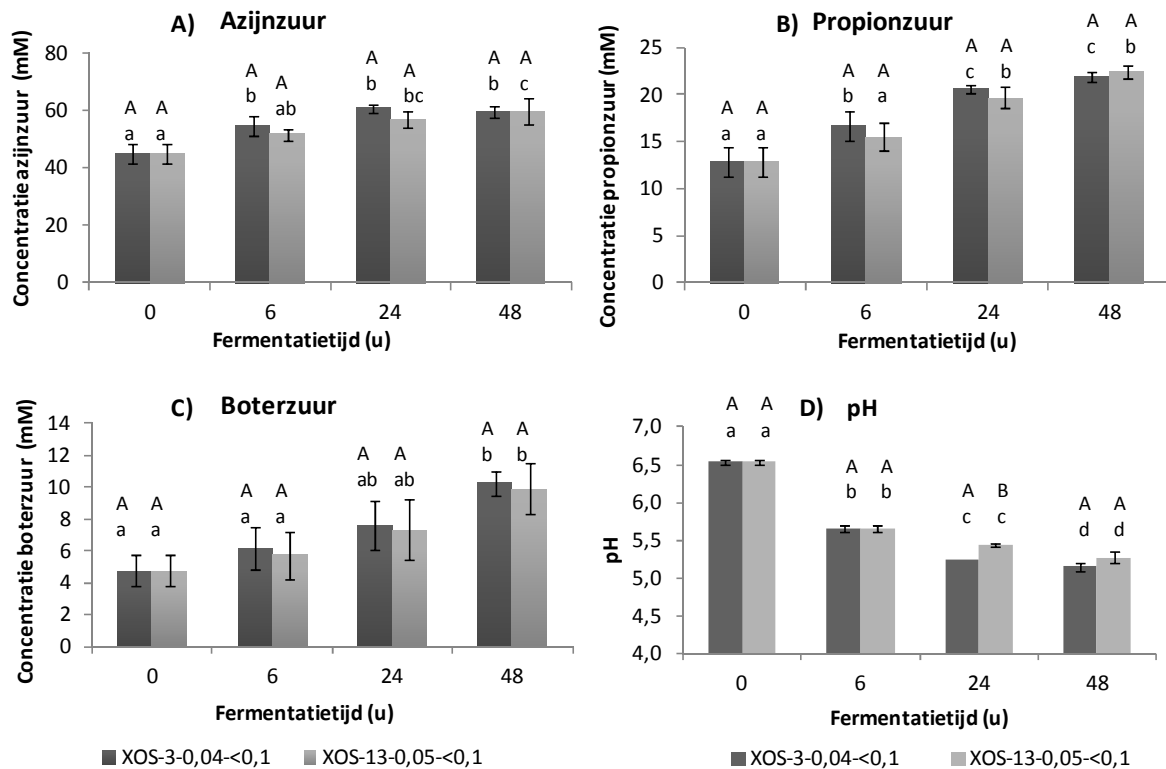
6.4.3 Geproduceerde metabolieten tijdens *in vitro* fermentatie van AXOS

6.4.3.1 Vorming van lineaire KKVZ en verandering in pH

Figuur 6.3 en Figuur 6.4 tonen respectievelijk de totale azijnzuur- (A), propionzuur-(B) en boterzuurconcentratie (C) tijdens *in vitro* fermentatie van XOS en AXOS. Bij aanvang van de fermentatie (0 uur waarde) waren reeds KKVZ aanwezig, namelijk respectievelijk 45 ± 3 mM azijnzuur, 13 ± 2 mM propionzuur en 5 ± 1 mM boterzuur, resulterend in een azijnzuur:propionzuur:boterzuur verhouding van 72:21:8.

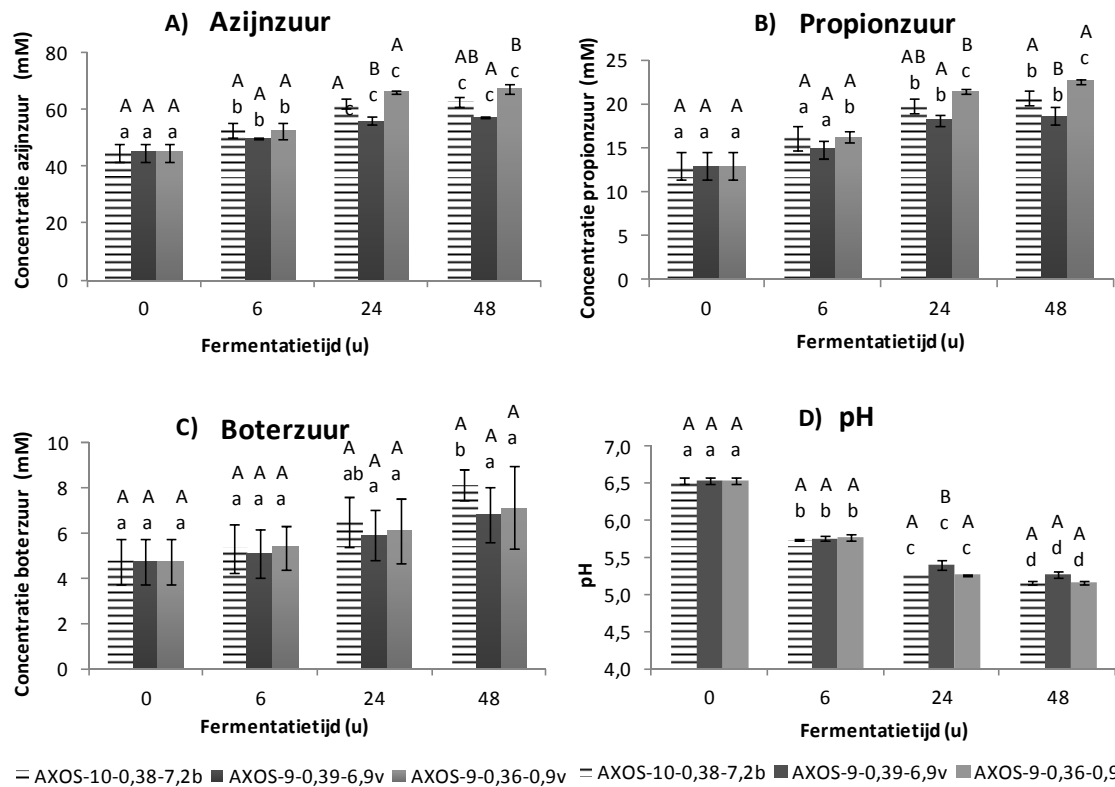
Gedurende de fermentatie van XOS-3-0,04-<0,1 werd een lichte, maar significante stijging in azijnzuurconcentratie vastgesteld na 6 uur fermentatie (55 ± 3 mM). Fermentatie van 48 uur resulteerde niet in een verdere significante verhoging van de concentratie **azijnzuur** (60 ± 2 mM). Ook bij XOS-13-0,05-<0,1 veroorzaakte fermentatie een geleidelijke stijging in azijnzuur tot een gelijkaardige eindconcentratie na 48 uur fermentatie (60 ± 4 mM). Het **propionzuurgehalte** kende relatief gezien een hogere stijging dan azijnzuur in de fermentatievloeistof en steeg tot 22 ± 1 mM voor zowel XOS-3-0,04-<0,1 als XOS-13-0,05-<0,1 na 48 uur fermentatie. De **boterzuurconcentratie** van de fermentatievloeistof verdubbelde na 48 uur fermentatie bij zowel XOS-3-0,04-<0,1 als XOS-13-0,05-<0,1 tot respectievelijk 10 ± 1 en 10 ± 2 mM. Fermentatie van XOS leidde tot een lichte verschuiving in het KKVZ profiel, daar het aandeel in propionzuur en boterzuur toenam ten koste van azijnzuur. Na 48 uur incubatie was een gelijke verhouding bij XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1 waar te nemen, namelijk 65:24:11 voor respectievelijk azijnzuur, propionzuur en boterzuur. Op basis van de KKVZ concentraties konden geen significante verschillen waargenomen worden tussen de fermentatie van beide XOS.

Opvolging van de **pH** tijdens de fermentatie is weergegeven in Figuur 6.3D. De pH van de fermentatievloeistof voor toevoeging van XOS bedroeg 6,5. Incubatie van XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1 verlaagde de pH geleidelijk gedurende de fermentatie tot een significant lagere waarde (respectievelijk $5,2 \pm 0,1$ en $5,3 \pm 0,1$ na 48 uur incubatie).



Figuur 6.3: Concentratie **A)** azijnzuur, **B)** propionzuur en **C)** boterzuur (mM) en **D)** de gemeten pH waarden tijdens in vitro fermentatie van XOS-3-0,04-<0,1 (donker grijze balk) en XOS-13-0,05-<0,1 (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur incubatie. Waarden van verschillende XOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde XOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

In Figuur 6.4 is de totale concentratie van azijnzuur (A), propionzuur (B) en boterzuur (C) aanwezig in de fermentatiesuspensie gedurende 48 uur incubatie van **AXOS** weergegeven. Zelfde initiële concentraties als hierboven vermeld, waren aanwezig voor de start van de fermentatie in een verhouding van 72:21:8. Fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2**b** resulteerde in een significante stijging van de azijnzuur-, propionzuur- en boterzuurproductie in de fermentatievloeistof tot een eindconcentratie van respectievelijk 62 ± 2 , 21 ± 1 en 8 ± 1 mM. Voor AXOS-9-0,39-6,9**v** werden minder hoge concentraties aangetroffen na 48 uur fermentatie in vergelijking met het eerste staal, namelijk 57 ± 1 , 19 ± 1 en 7 ± 1 mM voor respectievelijk azijnzuur, propionzuur en boterzuur en was de stijging in boterzuur niet significant. Fermentatie van AXOS-9-0,36-0,9**v** gedurende 48 uur leidde tot de hoogste concentratie azijnzuur en propionzuur (respectievelijk 67 ± 2 en 23 ± 1 mM). Bij boterzuur 7 ± 2 mM daarentegen was opnieuw geen significante stijging waar te nemen. De initiële verhouding in KKVZ veranderde minder uitgesproken tijdens fermentatie van AXOS, ten einde 68:23:9; 69:23:8 en 69:23:7 bij 48 uur incubatie van respectievelijk AXOS-10-0,38-7,2**b**; AXOS-9-0,39-6,9**v** en AXOS-9-0,36-0,9**v**. Het aandeel aan azijnzuur was ditmaal ook gedaald, gepaard met een lichte stijging in het gehalte aan propionzuur.



Figuur 6.4: Concentratie **A)** azijnzuur, **B)** propionzuur en **C)** boterzuur (mM) en **D)** de gemeten pH waarden tijdens in vitro fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2b (gearceerde balk), AXOS-9-0,39-6,9v (donker grijze balk) en AXOS-9-0,36-0,9v (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur incubatie. Waarden van verschillende AXOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde AXOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

Na 48 uur fermentatie daalde de pH van de fermentatievloeistof tot $5,16 \pm 0,03$; $5,25 \pm 0,05$ en $5,16 \pm 0,03$ voor respectievelijk AXOS-10-0,38-7,2b; AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v (Figuur 6.4D). Enkel na 24 uur incubatie werd er een significant pH-verschil vastgesteld. De pH-waarde van de fermentatiesuspensie met AXOS-10-0,38-7,2b en AXOS-9-0,36-0,9v verschilde niet significant van elkaar, maar wel van de pH van de fermentatiesuspensie met AXOS-9-0,39-6,9v.

6.4.3.2 Vorming van proteolytische componenten

Isovaleraat en isoboterzuur, twee **vertakte KKVZ**, werden gedurende de fermentatie geanalyseerd als maat voor de proteïnefermentatie die plaats vond in de fermentatievloeistof. Voor de start van de incubatie van (A)XOS bedroeg het gehalte aan vertakte KKVZ $2,8 \pm 0,4$ mM in de fermentatiesuspensie. Na 48 uur fermentatie van de (A)XOS was er geen significante stijging in concentratie van vertakte KKVZ te zien in functie van de fermentatietijd, noch waren er verschillen te merken tussen de vertakte KKVZ concentraties tijdens fermentatie van de verschillende (A)XOS stalen (resultaten niet weergegeven).

Bijkomend werd de productie van **ammoniak** tijdens de fermentatie van XOS en AXOS nagegaan in functie van de fermentatietijd. De concentratie ammoniak in de fermentatievloeistof op tijdstip 0 uur was 30 ± 1 mM. Fermentatie van beide **XOS** stalen leidde tot geen significante verandering in ammoniakconcentratie gedurende 48 uur incubatie (respectievelijk 28 ± 1 en 28 ± 1 mM voor XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1), waardoor ook de ammoniakconcentraties voor beide stalen niet significant verschilden. Na 6 uur fermentatie van de **AXOS** stalen verschilde de ammoniakconcentratie bij AXOS-10-0,38-7,2b significant van de ammoniakconcentraties bij AXOS-9-0,39-6,9v en de AXOS-9-0,36-0,9v. Fermentatie (6 uur) van AXOS-10-0,38-7,2b zorgde immers voor een lichte daling in de ammoniakconcentratie (28 ± 1 mM), terwijl de ammoniakconcentratie bij fermentatie van AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v een lichte stijging kende (respectievelijk tot 32 ± 1 en 32 ± 1 mM). Bij de resultaten van 24 en 48 uur fermentatie konden deze verschillen niet meer significant aangetoond worden. Voor eenzelfde AXOS staal werd geen significant verschil in ammoniakconcentratie vastgesteld gedurende de ganse fermentatieperiode (resultaten niet weergegeven).

6.4.4 Enzymactiviteit tijdens *in vitro* fermentatie van (A)XOS

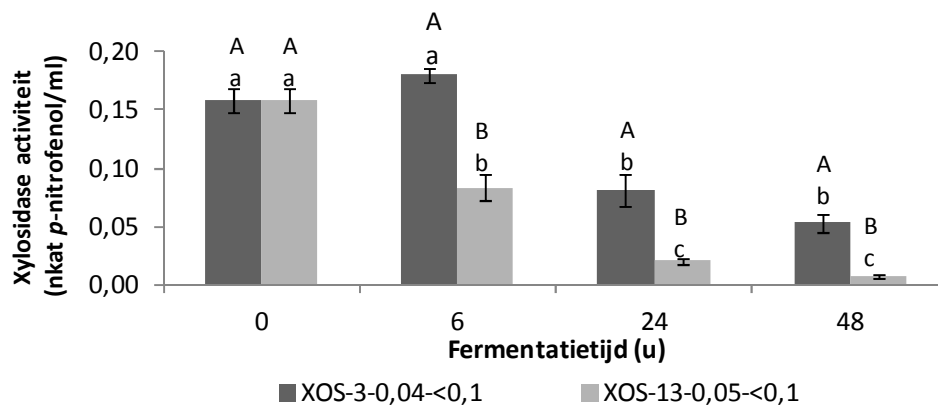
6.4.4.1 Endoxylanasen

Verschillende condities (variërende hoeveelheid staal en incubatietijd) werden getest ter optimalisatie van de meting van endoxylanase activiteit van de fermentatiestalen. Bij gebruik van lage hoeveelheid staal (50 μ l) werd geen activiteit vastgesteld bij de verschillende incubatietijden. Door gebruik te maken van 200 μ l staal kon wel enzymactiviteit gemeten worden voor de verschillende stalen. De endoxylanase activiteit was niet lineair in de tijd (resultaten niet weergegeven). Aangezien de endoxylanase activiteit zeer laag was in alle stalen en voor bijkomend onderzoek ernaar een grote hoeveelheid staal nodig zou zijn, werd deze niet verder onderzocht.

6.4.4.2 Xylosidasen

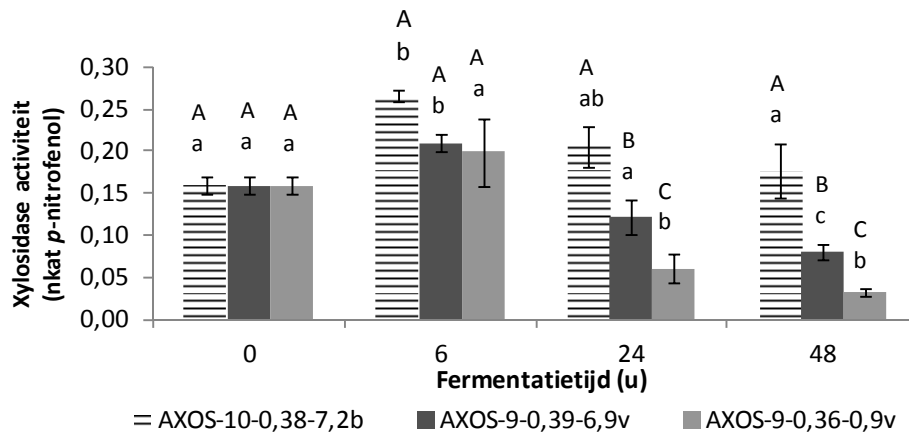
Xylosidasen zijn in staat om xylose-eenheden van het niet-reducerende uiteinde van de (A)XOS-keten te verwijderen. In Figuur 6.5 en 6.6 is de totale xylosidase activiteit weergegeven tijdens fermentatie van XOS en AXOS, bekomen met de niet-gefilterde gesoniceerde stalen (staal B, § 6.3.8.1). Hierbij werd zowel de activiteit van extra- en intracellulair gelegen als de membraan- en niet-membraangeassocieerde enzymen gemeten. De xylosidase activiteit van fermentatievloeistof bij aanvang van het experiment bedroeg $0,16 \pm 0,01$ nkat pNP/ml.

Incubatie van **XOS-3-0,04-<0,1** resulteerde in een lichte, maar niet significante stijging, van de xylosidase activiteit tot $0,18 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml, gedurende de eerste 6 uur van de fermentatie. Bij incubatie van **XOS-13-0,05-<0,1** daalde de xylosidase activiteit echter tot $0,08 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml gedurende deze periode. Na 24 en 48 uur incubatie, daalde de xylosidase activiteit bij beide stalen significant, waarbij de **XOS-13-0,05-<0,1** stalen steeds een lagere xylosidase activiteit vertoonden dan de **XOS-3-0,04-<0,1** stalen. Zo bleef er na 48 uur fermentatie slechts een xylosidase activiteit van $0,05 \pm 0,01$ en $0,008 \pm 0,001$ nkat *p*NP/ml over in de fermentatiesuspensie met respectievelijk **XOS-3-0,04-<0,1** en **XOS-13-0,05-<0,1**.



Figuur 6.5: Xylosidase activiteit (nkat *p*-nitrofenol/ml) tijdens in vitro fermentatie van **XOS-3-0,04-<0,1** (donker grijze balk) en **XOS-13-0,05-<0,1** (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur incubatie. Waarden van verschillende XOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde XOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

De totale xylosidase activiteit steeg bij incubatie van de drie **AXOS** stalen gedurende de eerste 6 uur ($0,27 \pm 0,01$; $0,21 \pm 0,01$ en $0,20 \pm 0,04$ nkat *p*NP/ml voor respectievelijk **AXOS-10-0,38-7,2b**; **AXOS-9-0,39-6,9v** en **AXOS-9-0,36-0,9v**). De activiteit in het **AXOS-10-0,38-7,2b** staal bleef gedurende 48 uur incubatie hoger of gelijk aan de initiële activiteit ($0,21 \pm 0,02$ en $0,18 \pm 0,03$ nkat *p*NP/ml na respectievelijk 24 en 48 uur incubatie) en significant hoger dan de activiteit in de fermentatiesuspensie met **AXOS-9-0,39-6,9v** en **AXOS-9-0,36-0,9v**. Bij de twee laatste **AXOS** stalen verminderde de xylosidase activiteit al na 24 uur fermentatie en de resterende xylosidase activiteit na 48 uur fermentatie bedroeg respectievelijk slechts $0,08 \pm 0,01$ en $0,032 \pm 0,004$ nkat *p*NP/ml. Fermentatiestalen met **AXOS-9-0,36-0,9v** vertoonden de laagste xylosidase activiteit.



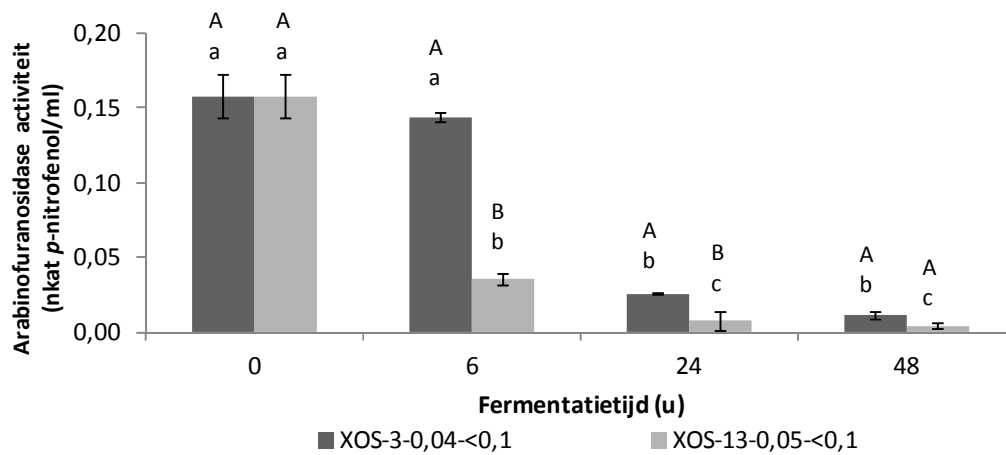
Figuur 6.6: Xylosidase activiteit (nkat *p*-nitrofenol/ml) tijdens in vitro fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2b (gearceerde balk), AXOS-9-0,39-6,9v (donker grijze balk) en AXOS-9-0,36-0,9v (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur. Waarden van verschillende AXOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde AXOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

6.4.4.3 Arabinofuranosidasen

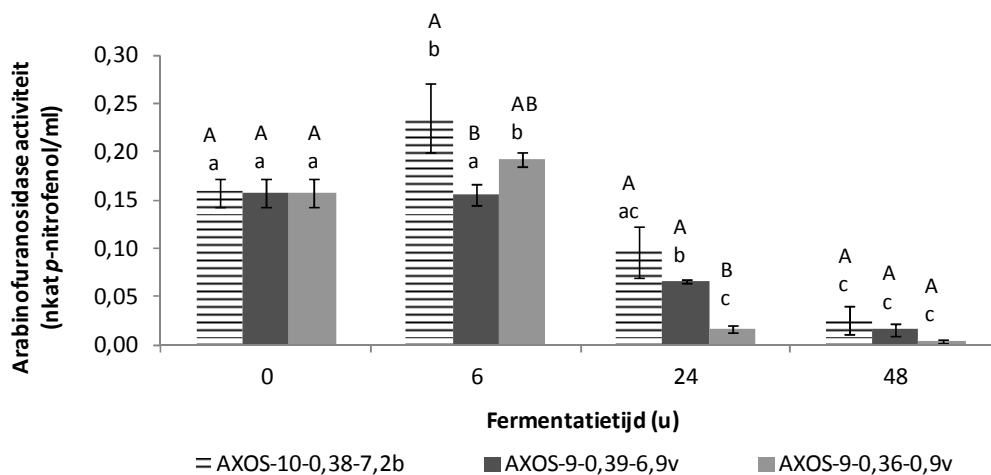
De totale arabinofuranosidase activiteit, bepaald met behulp van de niet-gefilterde gesoniceerde stalen (staal B, § 6.3.8.1), wordt weergegeven in Figuur 6.7 en 6.8. De arabinofuranosidase activiteit van de fermentatiesuspensie bedroeg $0,16 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml bij aanvang van de incubatie.

De arabinofuranosidase activiteit daalde tot $0,14 \pm 0,01$ en $0,04 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml na 6 uur incubatie met respectievelijk XOS-3-0,04- $<0,1$ en XOS-13-0,05- $<0,1$. De fermentatie van XOS-13-0,05- $<0,1$ resulteerde gedurende de hele incubatie voor een sterkere daling van arabinofuranosidase activiteit en na 48 uur kon er bijna geen activiteit meer gedetecteerd worden. Deze daling in activiteit was minder uitgesproken bij fermentatie van XOS-3-0,04- $<0,1$ maar resulteerde tevens in een lage restactiviteit ($0,012 \pm 0,003$ nkat *p*NP/ml).

Na 6 uur fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2b en AXOS-9-0,36-0,9v kon een significante stijging in de arabinofuranosidase activiteit vastgesteld worden, respectievelijk tot $0,24 \pm 0,04$ en $0,19 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml (Figuur 6.8). Bij incubatie van AXOS-9-0,39-6,9v kon geen verandering waargenomen worden na 6 uur fermentatie ($0,16 \pm 0,01$ nkat *p*NP/ml). Na 24 uur fermentatie echter daalde de enzymactiviteit in de fermentatiesuspensie voor alle AXOS, hoofdzakelijk bij fermentatie van AXOS-9-0,36-0,9v ($0,016 \pm 0,004$ nkat *p*NP/ml). De enzymactiviteit van de twee FA rijke AXOS fermentatiestalen bleef significant hoger ($0,097 \pm 0,026$ en $0,066 \pm 0,002$ nkat *p*NP/ml voor respectievelijk de incubatie van AXOS-10-0,38-7,2b en AXOS-9-0,39-6,9v). Na 48 uur fermentatie daalde de activiteit van arabinofuranosidase sterk en kon er geen significant verschil tussen de AXOS waar genomen worden.



Figuur 6.7: Arabinofuranosidase activiteit (nkat p-nitrofenol/ml) tijdens in vitro fermentatie van XOS-3-0,04-<0,1 (donker grijze balk) en XOS-13-0,05-<0,1 (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur incubatie. Waarden van verschillende (A)XOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde (A)XOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.



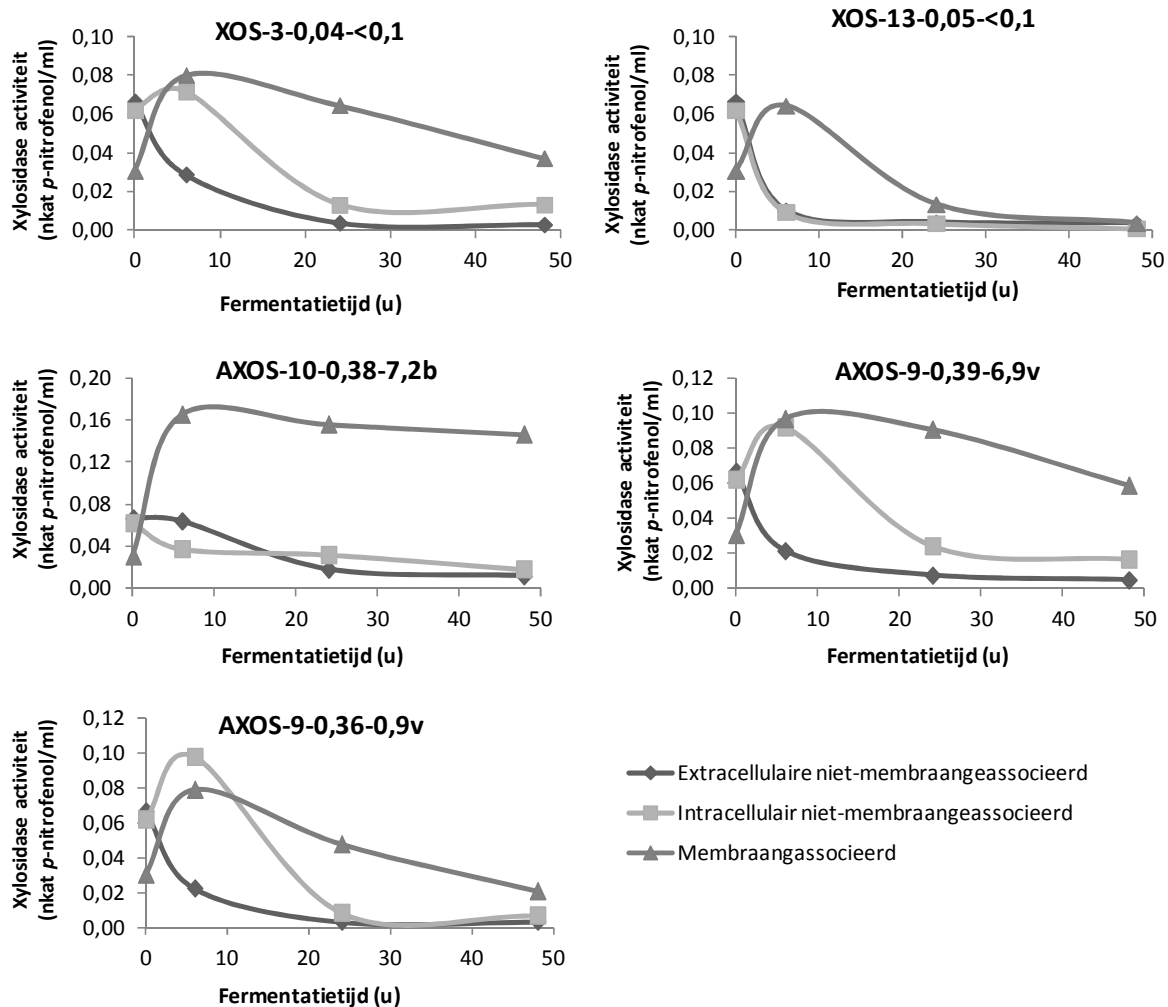
Figuur 6.8: Arabinofuranosidase activiteit (nkat p-nitrofenol/ml) tijdens in vitro fermentatie van AXOS-10-0,38-7,2b (gearceerde balk), AXOS-9-0,39-6,9v (donker grijze balk) en AXOS-9-0,36-0,9v (licht grijze balk) na 0, 6, 24 en 48 uur incubatie. Waarden van verschillende (A)XOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde (A)XOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

6.4.4.4 Locatie van enzymen

Microbiële enzymen kunnen zowel extra- als intracellulair gelegen zijn en membraan- of niet-membraangeassocieerd zijn (Madigan *et al.*, 2009).

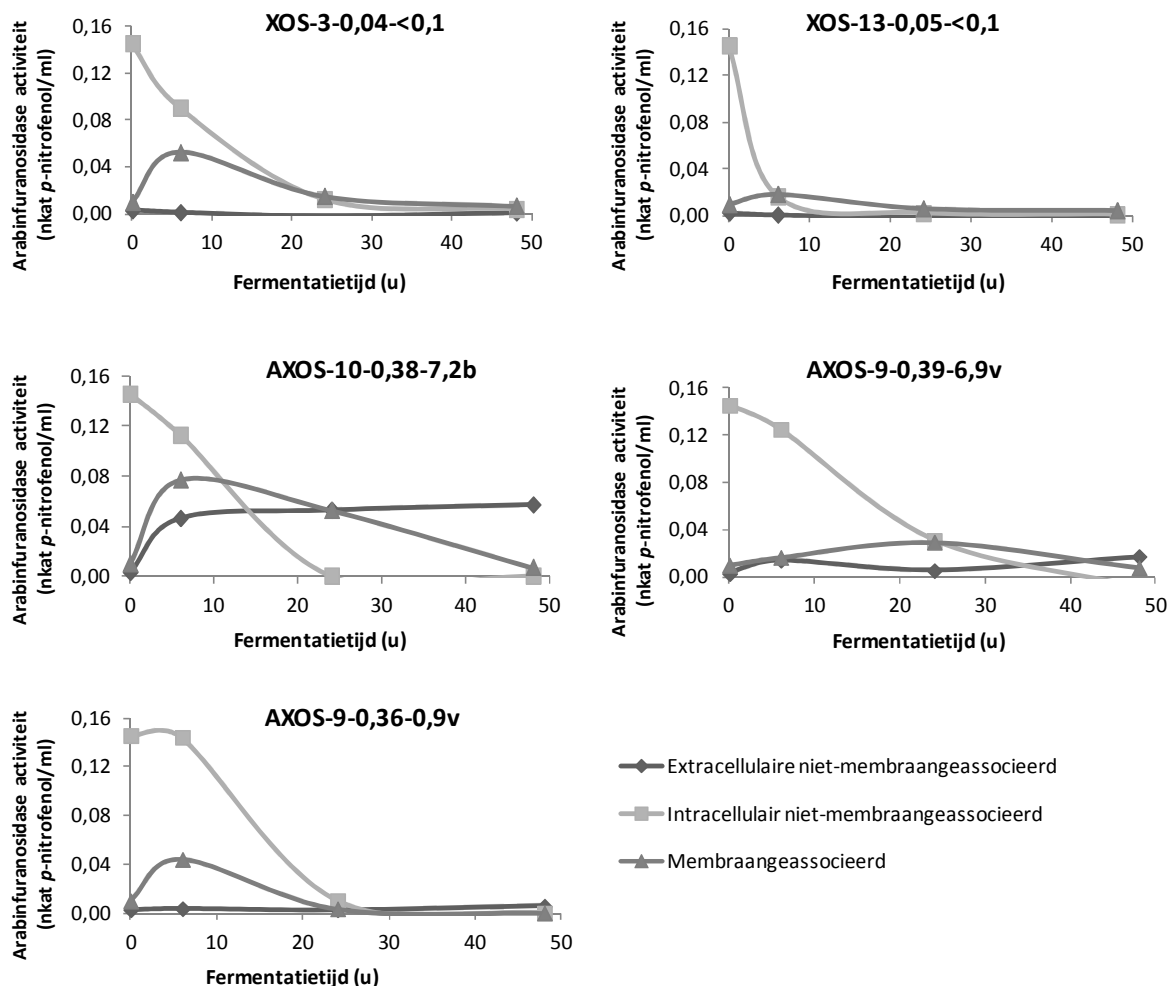
Initieel was de **xylosidase activiteit** voornamelijk extra- en intracellulair niet-membraangeassocieerd gelegen en was slechts een klein deel membraangeassocieerd (Figuur 6.9). Tijdens fermentatie van zowel XOS als AXOS steeg de activiteit van membraangeassocieerde enzymen sterk, gevolgd door een daling in activiteit waarbij het aandeel

van membraan-geassocieerde enzymen wel steeds groter bleef dan het aandeel van niet-membraangeassocieerde intra- en extracellulaire enzymen. De extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit daalde onmiddellijk (sterk) bij alle (A)XOS stalen. De intracellulaire niet-membraangeassocieerde xylosidase activiteit volgde een verschillend patroon afhankelijk van de gefermenteerde (A)XOS. De fermentatie van XOS-13-0,05-<0,1 en AXOS-10-0,38-7,2b resulteerde in een onmiddellijke daling van de intracellulaire niet-membraangeassocieerde xylosidase enzymactiviteit, gelijkend aan die van de extracellulaire niet-membraangeassocieerde activiteit. Daarentegen leidde 6 uur fermentatie van XOS-3-0,04-<0,1, AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v intracellulair tot een stijging van de xylosidase activiteit, gevolgd door een daling vanaf 24 uur fermentatie.



Figuur 6.9: De activiteit van extra- en intracellulaire niet-membraangeassocieerde en membraan-geassocieerde xylosidase enzymen in de fermentatievloestof tijdens fermentatie van (A)XOS na 6, 24 en 48 uur incubatie.

Bij aanvang van de fermentatie was meer dan 90% van de **arabinofuranosidase activiteit** van de fermentatievloeistof intracellulair gelegen (Figuur 6.10). Na incubatie van **XOS** daalde de enzymactiviteit, voornamelijk bij XOS-13-0,05-<0,1, sterk waardoor geen wijziging in de locatie van arabinofuranosidasen waargenomen kon worden, buiten een lichte stijging in membraangeassocieerde enzymactiviteit na 6 uur incubatie van XOS-3-0,04-<0,1. De activiteit van intracellulaire niet-membraangeassocieerde arabinofuranosidasen daalde maar bleef na 6 uur incubatie met **AXOS** nog relatief hoog en ook het aandeel van membraangeassocieerde enzymen begon te stijgen. De extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit bleef laag gedurende de fermentatie met AXOS, met uitzondering van de fermentatievloeistof van AXOS-10-0,38-7,2b waar een stijging in activiteit vastgesteld werd na 6 uur incubatie en deze activiteit was nog steeds gelijk na 48 uur incubatie. In dit staal was de activiteit van elders gelegen enzymen na 48 uur fermentatie laag, net zoals ze zien was bij de andere stalen.

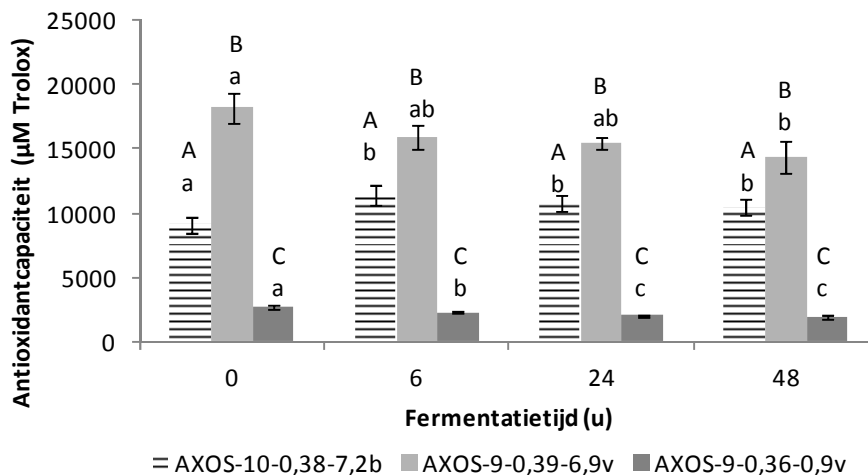


Figuur 6.10: De activiteit van extra- en intracellulaire niet-membraangeassocieerde en membraangeassocieerde arabinofuranosidase enzymen in de fermentatievloeistof tijdens fermentatie van (A)XOS na 6, 24 en 48 uur incubatie.

6.4.5 De antioxidantcapaciteit van AXOS tijdens *in vitro* fermentatie

In Figuur 6.11 wordt de antioxidantcapaciteit van de fermentatiestalen met AXOS weergegeven in functie van de fermentatietijd. Ook hier was het resultaat op tijdstip 0 een berekende waarde, op basis van de antioxidantcapaciteit van de AXOS bepaald in § 5.3.1.2. Deze waarden zijn tevens gecontroleerd door de AXOS in enkelvoud op te lossen in fermentatievloeistof in dezelfde concentratie als bij het *in vitro* fermentatie experiment. Voor AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v kwam de antioxidantcapaciteit tussen de theoretisch en experimenteel bepaalde waarde goed overeen (resultaten niet weergegeven). Voor AXOS-10-0,38-7,2b lag de theoretische waarde iets lager dan de experimentele waarde.

De fermentatiesuspensie met AXOS-9-0,39-6,9v had de hoogste antioxidantcapaciteit voor de start van de fermentatie ($18230 \pm 1157 \mu\text{M Trolox}$) en deze was hoger dan de antioxidantcapaciteit van AXOS-10-0,38-7,2b ($9116 \pm 598 \mu\text{M Trolox}$) en AXOS-9-0,36-0,9v ($2737 \pm 142 \mu\text{M Trolox}$). Ook gedurende de fermentatie van AXOS bleven deze bevindingen opgaan. De antioxidantcapaciteit van de fermentatievloeistof daalde tot een waarde van 14440 ± 1235 en $1908 \pm 175 \mu\text{M Trolox}$ gedurende 48 uur fermentatie van respectievelijk AXOS-9-0,39-6,9v en AXOS-9-0,36-0,9v. De fermentatiesuspensie met AXOS-10-0,38-7,2b had vanaf 6 uur incubatie een constante antioxidantcapaciteit ($11448 \pm 811 \mu\text{M Trolox}$) en wijzigde niet bij verdere incubatie.



Figuur 6.11: De antioxidantcapaciteit ($\mu\text{M Trolox}$) van AXOS-10-0,38-7,2b (gearceerde balk), AXOS-9-0,39-6,9v (donker grijze balk) en AXOS-9-0,36-0,9v (licht grijze balk) tijdens *in vitro* fermentatie na 0, 6, 24 en 48 uur. Waarden van verschillende AXOS stalen bij eenzelfde fermentatietijd verschillen significant ($p < 0,05$) van elkaar indien ze niet eenzelfde hoofdletter delen. Waarden van eenzelfde AXOS staal verschillen significant ($p < 0,05$) in functie van de fermentatietijd indien ze niet eenzelfde kleine letter delen.

6.5 Discussie

6.5.1 Algemene opmerkingen over de *in vitro* fermentatie

In vitro experimenten hebben niet steeds een zelfde opzet wat het moeilijker maakt om de resultaten van verschillende studies te vergelijken. Daarom wordt er in dit deel ingegaan op enkele algemene bevindingen over de resultaten en wordt hiervoor een verklaring gezocht in de experimentele opzet.

De fermentatiegraad van zowel XOS als AXOS was lager dan terug te vinden in andere studies. Een verklaring hiervan kan gezocht worden in het verschil in de experimentele condities, meer bepaald het gebruikte inoculum. Zo gebruikten Pollet *et al.* (2012) fermentatiesuspensie afkomstig van het dalend colon gedeelte van de SHIME en was ongeveer 50% van de AXOS (met DP 4), tegenover 20-34% in de huidige studie, na 48 uur gefermenteerd. Het door hen gebruikte inoculum was actiever dan het in deze thesis gebruikte inoculum, afkomstig uit de overloop van het dalend colon gedeelte van de SHIME. Het einde van de dikke darm vertoont immers een lagere sacharolytische activiteit (Cummings & Macfarlane, 1991). In een andere studie (Kabel *et al.*, 2002b) voegden de onderzoekers pepton en verschillende micronutriënten toe aan het fecale inoculum, om een betere fermentatie te bekomen. Hierdoor werden XOS (DP 2-11) bijna volledige gefermenteerd na 24 uur incubatie. Bovendien kunnen batchstudies enkel een indicatie geven van korte termijn effecten. Lange termijnonderzoeken (Sanchez *et al.*, 2009) zijn bijgevolg interessanter daar de onderzochten effecten langer de kans krijgen om zich te manifesteren.

De bij ons vastgestelde lagere sacharolytische activiteit vertaalt zich niet enkel in een lagere fermentatiegraad, maar werd ook opgemerkt door de lagere activiteit van xylandegraderende enzymen in de fermentatievloeistof in vergelijking met bevindingen van andere onderzoeken (Sanchez *et al.*, 2009; Pollet *et al.*, 2012). Hierbij kan enkel extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit vergeleken worden, daar deze studies geen cellysis uitvoeren. Echter opgemerkt in onze studie, is het aandeel membraangeassocieerde en intracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit groot, waardoor bepaling van enkel extracellulaire niet-membraangeassocieerde activiteit leidt tot onderschatting en een mogelijke foute interpretatie. Verder dient opgemerkt worden dat er, door mogelijks onvolledige cellysis, een overschatting van de membraangeassocieerde enzymactiviteit ten koste van intracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit optreedt. Daarbij zou glucose aanwezig in de stalen mogelijks een verlaging in enzymatische afbraak teweeg kunnen brengen aangezien het de productie van endoxylanasen, arabinofuranosidasen en xylosidasen onderdrukt (Kulkarni *et al.*, 1999). Dit effect werd ook gezien bij Pollet *et al.* (2012).

Vooraleer deze resultaten te extrapoleren naar wat zich afspeelt in de dikke darm van de mens, dienen nog enkele zaken opgemerkt te worden. Ten eerste wordt bij inname van vrij FA rijke AXOS door de mens, het aanwezige vrij FA reeds geabsorbeerd in de maag en bereikt dit het colon niet. Dit staal werd echter meegenomen om het effect van FA op de fermentatie van AXOS in het colon te bestuderen na hydrolyse door FAE, aangezien zowel gebonden FA als vrij FA een effect kan hebben op de fermentatie. Bovendien zullen glucoseoligomeren hoofdzakelijk afgebroken en geabsorbeerd worden in de dunne darm waardoor deze de fermentatie in het colon niet zullen beïnvloeden (Jones *et al.*, 1987). Ten tweede moet er opgemerkt worden dat *in vitro* experimenten in verschillende aspecten verschillen met *in vivo* proeven. Een verschil is dat bij *in vitro* proeven de geproduceerde metaboliëten tijdens fermentatie zullen accumuleren, terwijl *in vivo* KKVZ, ammoniak en FA metaboliëten gewoonlijk in het menselijk lichaam geabsorbeerd en getransporteerd worden van het darmlumen naar het bloed (Van Craeyveld *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2009).

6.5.2 Invloed van polymerisatiegraad op *in vitro* fermentatie van XOS

Voor het nagaan van de invloed van de DP op de *in vitro* fermentatie van XOS, werden lage en hoge DP XOS (met respectievelijk een DP van 3,2 en 12,8) geïncubeerd in fermentatiesuspensie afkomstig van het effluent van de SHIME reactor. Deze stalen hadden een gelijkaardige A/X-ratio ($\pm 0,05$) en XOS-gehalte ($\pm 80\%$), maar verschilden ook nog in de aanwezigheid van oligomeer glucose (respectievelijk 11 en 2 voor lage en hoge DP XOS).

De lage DP XOS werden voor 28% gefermenteerd, terwijl hoge DP XOS slechts voor 21% gefermenteerd werden. De fermentatiegraad verschilt echter niet significant en de DP blijkt bijgevolg binnen de door ons geteste DP - range geen grote invloed te hebben. Andere auteurs stelden echter vast dat (A)XOS met lage DP aanvankelijk makkelijker als substraat door de darmmicrobiota gebruikt worden dan AX(OS) met hoge DP (Moura *et al.*, 2007; Damen *et al.*, 2011). Een gelijkaardig fenomeen werd vastgesteld bij FOS en inuline fermentatie (Van De Wiele *et al.*, 2007). Grote suikerketens moeten namelijk eerst extracellulair gedegradeerd worden door endoxylanasen tot kortere oligomeren vooraleer deze door een actief transportsysteem doorheen het celmembraan getransporteerd kunnen worden en voor verdere intracellulaire hydrolyse en fermentatie beschikbaar zijn (Biely, 1985). Het vermogen om XOS met lage DP op te nemen voor hydrolyse werd eerder al vastgesteld bij *Bifidobacteria* (Crittenden *et al.*, 2002).

Uitgebreider onderzoek naar de DP verdeling van de lage DP XOS stalen gedurende de fermentatie toonde een snellere afname van XOS met een hogere DP (getest tot DP 6). XOS met een DP van 2 of 3 namen slechts trager af aangezien naast verdere afbraak van hen ook vorming optrad door degradatie van XOS met een hogere DP. De concentratie van vrij xylose nam sterk toe waaruit geconcludeerd kan worden dat afbraak van XOS ter vorming van xylose sneller plaats vond dan de

verdere fermentatie ervan. Het achterblijven van ongefermenteerde xylose in de fermentatievloeistof werd ook vastgesteld door Amaretti *et al.* (2013). Bifidobacterium bezitten een selectief mechanisme waardoor preferentieel XOS geconsumeerd worden over xylose (Crittenden *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2005b; Amaretti *et al.*, 2013). Daarentegen werd door Karppinen *et al.* (2000) wel onmiddellijke fermentatie van xylose waargenomen.

De lage sacharolytische activiteit aanwezig in de fermentatievloeistof was ook te merken aan de lage enzymatische activiteit van voornamelijk endoxylanase, xylosidase en arabinofuranosidase. De endoxylanase activiteit was zeer laag en werd enkel waargenomen bij gebruik van grotere hoeveelheden staal. De arabinofuranosidase en xylosidase activiteit van de fermentatievloeistof werd slechts weinig gestimuleerd door de toevoeging van XOS en daalde gedurende verdere incubatie. Indien glucose inhiberend zou werken op de productie van arabinofuranosidase en xylosidasen (Kulkarni *et al.*, 1999), zou een lagere activiteit verwacht worden bij lage DP XOS in vergelijking met hoge DP XOS aangezien dit eerste staal een hoger glucose gehalte bevat. Echter de enzymactiviteit blijft hoger bij fermentatie van XOS met lage DP in vergelijking met fermentatie van hoge DP XOS. Enzymen initieel aanwezig in de fermentatievloeistof van lage DP XOS blijken voldoende in staat om XOS af te breken. Daar opname van XOS door bepaalde micro-organismen slechts waargenomen wordt tot DP 4 (Moura *et al.*, 2007), speelt ook de locatie van de XOS degraderende enzymen een rol. Initieel zijn deze enzymen voornamelijk niet-membraangeassocieerde, waarbij xylosidasen zowel intra- en extracellulaire activiteit vertonen, en arabinofuranosidase activiteit voornamelijk intracellulair waargenomen wordt. Intracellulair gelegen arabinofuranosidasen en xylosidasen werd tevens gesuggereerd door vroeger onderzoek (Lagaert *et al.*, 2010, 2011; Amaretti *et al.*, 2013). Ondanks de continue afname in enzymactiviteit (met uitzondering van de xylosidase activiteit na 6 uur fermentatie van lage DP XOS), verhoogde na 6 uur incubatie de membraangeassocieerde xylosidase en arabinofuranosidase activiteit initieel en daalde deze bij verdere incubatie trager dan de intra- en extracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit. Bij fermentatie van hoge DP XOS werd vanaf 6 uur incubatie bijna uitsluitend nog membraangeassocieerde activiteit waargenomen. Englyst *et al.* (1987) en Rakotoarivo *et al.* (2012) concludeerden tevens dat xylandegraderende enzymen geproduceerd door micro-organismen voornamelijk celgeassocieerd zijn. Deze aanpak vormt een mogelijke strategie van micro-organismen om extracellulair XOS moleculen af te breken en de afbraakproducten meteen te kunnen transporteren over het membraan.

Fermentatie van XOS zorgde voor een stijging van 47% in concentratie van gezondheidsbevorderende KKVZ en de meest voorkomende KKVZ gevormd na fermentatie van lage en hoge DP XOS zijn azijnzuur en propionzuur. Melkzuurbacteriën (*Lactobacillus* en *Enterococcus species*), bifidobacteriën en *Bacteroides species*, blijken door de vorming van azijnzuur

(waargenomen in voorgaande studie (Grootaert *et al.*, 2007)), een belangrijke rol te spelen in de fermentatie van deze XOS (Hopkins *et al.*, 2003; Van Craeyveld *et al.*, 2008). Kabel *et al.* (2002b) detecteerden echter geen propionzuurproductie en wezen dit toe aan de afwezigheid van arabinosesubstitutie, maar dit is in tegenspraak met de huidige studie, waar tevens propionzuurproductie opgemerkt wordt na fermentatie van XOS. De KKVZ concentraties geproduceerd tijdens fermentatie van lage DP XOS verschilden significant van de beginconcentraties voor alle gemeten tijdstippen, terwijl bij hoge DP XOS dit verschil pas na 24 uur fermentatie zichtbaar was. Deze vertraagde productie kan het gevolg zijn van de initieel lagere fermentatiegraad van hoge DP XOS. Boterzuurconcentraties begonnen pas na 24 uur incubatie te stijgen. Deze verlate stijging is niet verrassend vermits boterzuur voornamelijk geproduceerd wordt door *crossfeeding* van primaire fermentatieproducten zoals melkzuur en azijnzuur (Cummings *et al.*, 1987; Kabel *et al.*, 2002b). Boterzuurconcentraties stegen gedurende fermentatie van XOS relatief sneller dan de andere KKVZ. Dit wijst erop dat XOS fermentatie stimulatie van boterzuurproducerende bacteriën, zoals *Roseburia* en andere *Clostridia* species (Chassard *et al.*, 2007) tot gevolg heeft. Deze stijging vertaalt zich ook in een verschuiving van het KKVZ profiel waar het procentueel aandeel van propionzuur en boterzuur toeneemt ten koste van azijnzuur. Dit is interessant aangezien boterzuur de geprefereerde energiebron is voor coloncellen en een potentiële bescherming biedt tegen darmkanker door inhibitie van de groei van carcinoomcellen (Wong *et al.*, 2006). De verhoogde KKVZ concentraties zorgden tevens voor een verlaging van de pH (< 5,5). Dit is gewenst aangezien, door verlaging van de pH, de groei van mogelijks pathogene en putrefactieve micro-organismen geïnhibeerd wordt (Cherrington *et al.*, 1991; Gibson & Roberfroid, 1995). De individuele KKVZ concentraties waren vergelijkbaar voor lage en hoge DP XOS stalen. Een invloed van de DP op de KKVZ vorming, zoals vastgesteld door Van Craeyveld *et al.* (2008) bij fermentatie van AXOS met DP ≤ 5 en DP = 12-60 in ratten, werd in onze studie niet vastgesteld.

Gedurende de fermentatie van lage en hoge DP XOS bleef het gehalte aan vertakte KKVZ en ammoniak, merkers voor de proteïnefermentatie, onveranderd. Een effectieve suppressie van proteïnefermentatie wordt beschouwd als goed voor de darmgezondheid aangezien sommige eindproducten van de proteïnefermentatie potentieel schadelijk zijn (Visek, 1978; Macfarlane *et al.*, 1986). Een daling van deze metabolieten kan echter niet gezien worden in deze opstelling, aangezien er geen absorptie zal plaatsvinden. Bovendien bevatten de XOS stalen amper proteïnen (respectievelijk < 0,01 en 0,08%) en was ook het medium mogelijks al proteïnearm op het einde van de SHIME reactor. Naast het feit dat sacharolytische fermentatie geprefereerd wordt door micro-organismen (Van Loo, 2004; Cloetens *et al.*, 2010; François *et al.*, 2012), kan substraatdepletie de oorzaak zijn van het feit dat er geen verdere proteïnefermentatie heeft plaatsgevonden.

6.5.3 Invloed van ferulinezuur op *in vitro* fermentatie van AXOS

FA is het meest voorkomende fenolzuur in de zemel van tarwe waar het voornamelijk als esterbinding aan arabinose van AX voorkomt (Smith & Hartley, 1983). Om meer inzicht te verkrijgen in de invloed van FA op het prebiotische potentieel van AXOS, werden AXOS aangemaakt die een gelijkaardige suikerstructuur hadden, maar verschilden in de mate waarin FA gebonden of vrij voorkomt in de preparaten. FA substitutie zou immers fysisch de toegankelijkheid van hydrolytische enzymen kunnen verhinderen (Andreasen *et al.*, 2001a). Bovendien is geweten dat fenolische componenten kunnen interageren met afbraakenzymen ter vorming van een inactief enzym-inhibitorcomplex en zo de enzymatische afbraak inhiberen (Boukari *et al.*, 2011).

De verschillende AXOS stalen werden net zoals bij XOS slechts deels gefermenteerd, echter de graad van fermentatie was verschillend. Vanaf 24 uur van de fermentatie kon een significant verschillend degradatiepatroon geobserveerd worden. AXOS rijk aan (gebonden of vrij) FA werden minder snel gefermenteerd dan het AXOS staal arm aan FA. De A/X-ratio van de niet-gefermenteerde fractie was voor alle AXOS preparaten initieel ongeveer dezelfde en gedurende 48 uur fermentatie bleef de ratio van de gebonden FA rijke AXOS ook constant, wat wijst op een even snelle fermentatie van arabinose dan van xylose. Bij de andere AXOS stalen werd, in tegenstelling tot in andere onderzoeken (Glitsø *et al.*, 1999; Karppinen *et al.*, 2000; Amrein *et al.*, 2003; Damen *et al.*, 2011; Pollet *et al.*, 2012), echter een daling in A/X-ratio van de ongefermenteerde fractie vastgesteld gedurende de fermentatie. Ook Hopkins *et al.* (2003) zagen een daling in A/X-ratio tijdens fermentatie. Maar hier waren de AX FA-verknoopt en werd de verklaring gezocht in de verlaagde toegang van xylanolytische enzymen tot hun doelwit omwille van de verhoogde viscositeit van het medium. De daling in A/X-ratio die in deze studie waargenomen werd, wijst op een snellere fermentatie van arabinose dan van xylose. Deze snellere fermentatie werd ook vastgesteld bij Crittenden *et al.* (2002) na fermentatie van AX door *Bifidobacterium* species. Daarentegen zou de esterbinding van FA aan arabinose bij het gebonden FA rijke AXOS staal echter de arabinose hydrolyse en de daaropvolgende fermentatie kunnen bemoeilijken. De snellere arabinose fermentatie kan ook mede de oorzaak vormen voor de snellere fermentatie van FA arme AXOS in vergelijking met de XOS stalen.

Tijdens fermentatie van de AXOS werd enkel een geringe vrijzetting van FA vastgesteld bij het gebonden FA rijke AXOS staal. Een deel hiervan bleef aanwezig als vrij FA, maar een lichte daling in totaal FA kan er op wijzen dat vrij FA ook deels verder gemetaboliseerd werd. Aangezien FA slechts beperkt vrijgezet werd, kon het gebonden FA de arabinosefermentatie blijven bemoeilijken. Echter onderzoek op geferuloylerde AXOS geproduceerd door xylanasen toonde aan dat de FAE activiteit gestimuleerd wordt door veresterd FA (Vardakou *et al.*, 2007). Bij de twee andere AXOS stalen werd

er geen FAE activiteit waargenomen, daar het gebonden FA-gehalte niet wijzigde gedurende de incubatie. De berekende initiële waarde gebonden FA in het vrij FA rijke AXOS staal is mogelijks een onderschatting, daar FA esterificatie gedurende de incubatie onwaarschijnlijk is. Naast het feit dat bij het andere AXOS staal ook slechts een geringe FAE activiteit werd waargenomen, kon productinhibitie optreden door de reeds hogere gehalten aan vrij FA in de fermentatievloeistof bij het vrij FA rijke AXOS staal. Detectie van significant lagere hoeveelheden vrij FA gedurende 48 uur incubatie van voornamelijk FA arme en vrij FA rijke AXOS, wijzen op verdere FA metabolisatie door de micro-organismen in de fermentatievloeistof. Bij metabolisatie van FA worden voornamelijk 3,4-dihydroxyfenylpropionzuur, 3-hydroxyfenylpropionzuur en 3-fenylpropionzuur gevormd (Aura, 2008; Russell *et al.*, 2008; Anson *et al.*, 2009b). Vrij FA, maar ook de gevormde metabolieten, kunnen een inhiberende werking hebben op de darmmicrobiota (Lee *et al.*, 2006) en hierdoor leiden tot de lagere fermentatiegraad van de vrij FA rijke AXOS.

De enzymactiviteit van arabinofuranosidase en xylosidase volgden gelijke trends zoals vastgesteld bij Pollet *et al.* (2012). Na 6 uur fermentatie van ongeveer structureel gelijkende AXOS (DP =4, A/X = 0,22) was een lichte stijging in activiteit waar te nemen, die vervolgens na 24 en 48 uur fermentatie daalde tot waarden onder de activiteit bij 0 uur. De activiteit van arabinofuranosidase en xylosidase was het hoogst na incubatie van gebonden FA rijke AXOS, dit resulteerde echter niet in de hoogste fermentatiegraad. De enzymtesten zijn immers gebaseerd op de hydrolyse van synthetische substraten (*p*Np-Ara en *p*NP-Xyl) in plaats van de hydrolyse van natuurlijke, complexere substraten zoals AXOS. Met fysische hindering van andere arabinose-eenheden of veresterd FA wordt bijgevolg geen rekening gehouden in deze test. De hogere enzymactiviteit in vergelijking met die in de andere stalen, wijst er mogelijks op dat de gebonden FA rijke AXOS de enzymproductie beter stimuleerden, maar kan tevens te wijten zijn aan inhibitie van de enzymwerking door vrij FA aanwezig in de andere stalen. Vrij FA blijft immers aanwezig tijdens de enzymtesten waardoor het mogelijks de enzymactiviteit inhibeert, zoals vastgesteld voor de inhibitie van α -amylase, trypsine en lysozymen door Rohn *et al.* (2002). Dit kan echter niet verklaren dat de enzymactiviteit lager is voor het FA arme AXOS staal dan voor het vrij FA rijke AXOS staal.

De activiteit van membraangeassocieerde arabinofuranosidase en xylosidase nam ook tijdens fermentatie van AXOS sterk toe en daalde bij verdere incubatie trager dan de extra- en intracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit. Tijdens de fermentatie van vrij FA rijke en FA arme AXOS bleef de intracellulaire niet-membraangeassocieerde enzymactiviteit opgemerkt, in tegenstelling tot een sterke daling bij fermentatie van gebonden FA rijke AXOS. Opname van FA rijke AXOS door *Bifidobacteria* voor intracellulaire hydrolyse was wel aangetoond door Yuan *et al.* (2005b). In deze studie was opname door micro-organismen minder waarschijnlijk aangezien de extracellulaire niet-membraangeassocieerde arabinofuranosidasen de hoogste activiteit vertoonden

na 48 uur incubatie met gebonden FA rijke AXOS. In de studie van Yuan *et al.* (2005b) waren de AXOS echter kleiner (DP 1-5) en het gehalte FA was niet gespecificeerd. Crittenden *et al.* (2002) concludeerden bovendien ook dat hydrolyse van de arabinosylgroep van complexe moleculen, zoals AX in deze studie, extracellulair plaatsvond waarna vervolgens arabinose geïmporteerd werd in de microbiële cel.

De afbraak van AXOS gaat gepaard met een significante daling in pH (van 6,5 tot \pm 5,2 na 48 uur fermentatie) die verklaard kan worden door de vorming van KKVZ, voornamelijk azijnzuur. De fermentatie van gebonden FA rijke en de fermentatie van FA arme AXOS kenden een meer uitgesproken stijging in KKVZ concentraties ten opzichte van het vrij FA rijke AXOS staal wat aanleiding gaf tot een significant lagere pH in het medium van deze eerste twee AXOS stalen. Het verlagen van de pH is een effectieve manier om de groei van pathogenen tegen te houden (Gibson & Roberfroid, 1995). Fermentatie van AXOS zorgde voor minder uitgesproken verandering in verhouding van KKVZ in vergelijking met XOS fermentatie. Het aandeel aan azijnzuur was ditmaal ook gedaald, gepaard met een lichte stijging in het aandeel van propionzuur. Dezelfde verschuiving werd opgemerkt bij fermentatie van de drie AXOS. De hoogste KKVZ concentratie stijging werd terug gevonden in de fermentatievloeistof na 48 uur incubatie (55%) van FA arme AXOS, het staal dat de meest uitgesproken fermentatie had ondergaan.

Ook gedurende de fermentatie van AXOS trad er geen proteïnefermentatie op, daar het gehalte aan vertakte KKVZ en ammoniak onveranderd bleef en kon er bijgevolg geen invloed van de FA aanwezigheid geconstateerd worden. Ook bij Sanchez *et al.* (2009) waren de resultaten van ammoniakanalyse weinig verhelderend.

Aan FA worden antioxidanteigenschappen toegeschreven daar het molecule door zijn door resonantie gestabiliseerde structuur dienst doen als een radicaalvangende molecule (Graf, 1992). De antioxidantcapaciteit van de fermentatiesuspensies met opgeloste AXOS was zoals verwacht op basis van de antioxidantcapaciteit van de AXOS bepaald in Hoofdstuk 5, namelijk dat de hoeveelheid en de mate van vrijstelling van FA een voorname rol speelt in het antioxidant potentieel van AXOS. Voor de meeste stalen kwam de theoretische 0 uur waarde overeen met de experimenteel bepaalde waarde, behalve bij het gebonden FA rijke AXOS was deze berekende waarde veel lager, waardoor mogelijks de initiële antioxidantcapaciteit in de fermentatievloeistof onderschat werd. Gedurende fermentatie van AXOS kan FA echter ook transformatie ondergaan, zoals vrijzetting en metabolisatie (Kroon *et al.*, 1997). Vrijzetting van FA heeft een invloed op de antioxidantcapaciteit (Hoofdstuk 5). Bij het gebonden FA rijke AXOS staal werd slechts een geringe FA vrijstelling (en eventuele verdere metabolisatie) waargenomen, waardoor de antioxidantcapaciteit gedurende de 48 uur fermentatie constant bleef. Gedurende 48 uur incubatie daalde enkel de antioxidantcapaciteit van vrij FA rijke en FA arme AXOS significant, wat gelinkt kan worden aan de lichte daling in het totaal FA-gehalte tijdens

in vitro fermentatie. De afname van het totaal FA-gehalte was te wijten aan de afname van vrij FA ten gevolge van metabolisatie door microbiota. Deze metabolieten hebben echter een lagere antioxidantcapaciteit dan FA (Gomez-Ruiz *et al.*, 2007).

De lagere fermenteerbaarheid van gebonden FA rijke AXOS zou een verhoogde weerstand gedurende de doorgang in het colon kunnen impliceren. Hierdoor zou hun fermentatie deels in het meer distale gedeelte van het colon kunnen plaatsvinden, waar ze de proteïnefermentatie zouden kunnen onderdrukken. Een gereduceerde proteïnefermentatie in het colon is gewenst, aangezien de degradatie van aminozuren door bacteriën resulteert in de productie van potentieel toxische metabolieten zoals ammonia, fenolen en thiolen (Sanchez *et al.*, 2009). Verder onderzoek naar de invloed van hogere gehalten FA en de mogelijke vorming van metabolieten ervan, zal moeten gevoerd worden in complexere *in vitro* systemen of *in vivo*.

6.6 Conclusie

XOS werden gefermenteerd en met de huidige experimentele opzet werd slechts een beperkte invloed van de DP, binnen de geteste range, op het prebiotische potentieel van XOS vastgesteld. Hierbij werden lage DP XOS initieel sneller gefermenteerd dan XOS met een hoge DP. De fermentatie van XOS gaf verder aanleiding tot de vorming van gunstig gezondheidsbevorderende KKVZ, waarbij boterzuur in verhouding meer gevormd werd.

De AXOS preparaten, sterk variërend in FA, werden allen deels gefermenteerd. Arabinose werd sneller gefermenteerd dan xylose, behalve wanneer het veresterd FA droeg. De snellere arabinose hydrolyse leidde tevens tot een snellere afbraak van FA arme AXOS dan de XOS stalen. Ook vrij FA had een invloed op de fermentatie, al was dit niet eenduidig op te maken uit de enzymactiviteit van de AXOS hydrolyserende enzymen (xylosidase, arabinofuranosidase, xylanase). Mogelijks heeft FA een invloed op de verdere fermentatie. Met de huidige opzet werd geen of slechts een weinig FAE activiteit opgemerkt. Vrij FA afname werd wel waargenomen en deze FA fermentatie had verder een daling in antioxidantcapaciteit van de AXOS stalen met vrij FA tot gevolg. AXOS vertoonden tevens een sterke antioxidantcapaciteit in de fermentatiesuspensie. AXOS combineren dus zowel prebiotische als antioxidanteigenschappen.

Zowel bij de incubatie van XOS als AXOS stalen, werd proteïnefermentatie niet waargenomen. Dit kan het gevolg zijn van onderdrukking ervan door de geprefereerde koolhydraatfermentatie of depletie van proteïnen in de fermentatiesuspensie.

ALGEMENE BESPREKING EN BESLUIT

Arabinoxylnoligosacchariden (AXOS) en xylo-oligosacchariden (XOS) genoten al veel interesse omwille van hun prebiotische eigenschappen (Grootaert *et al.*, 2007; Broekaert *et al.*, 2011). In dit werk werd de antioxidantcapaciteit van structureel verschillende AXOS nagegaan, aangezien AXOS ook ferulinezuur (FA), een krachtig antioxidant, gebonden hebben in hun structuur. De impact van FA en zijn verschijningsvorm op de antioxidantcapaciteit van AXOS was echter nog niet onderzocht. Daarnaast werd ook de invloed van FA op de prebiotische en antioxidanteigenschappen van AXOS gedurende *in vitro* fermentatie onderzocht. Verder werd de invloed van de polymerisatiegraad (DP) op het prebiotisch potentieel van XOS bestudeerd.

Aanmaak en structurele karakterisering van (A)XOS

Om de hierboven beschreven onderzoeksdoelstellingen te kunnen beantwoorden, dienden we over een set van relevante XOS en AXOS te beschikken. Hiervoor werden eerst twee sets AXOS stalen aangemaakt die binnen één set een **gelijke suikerstructuur** hadden en enkel verschilden in het **voorkomen van FA** (arm/rijk, vrij/gebonden/verknoopt). De aanmaak van deze AXOS was succesvol en de samenstelling van deze stalen en twee XOS stalen werd bepaald. De twee gebruikte XOS stalen (XOS-3-0,04-<0,1 en XOS-13-0,05-<0,1) hadden enkel een verschillende DP, waardoor het effect van dit structureel kenmerk op het prebiotische potentieel onderzocht kon worden. Vertrekkende van AXOS-5-0,22-1,7**b** werd succesvol een set AXOS aangemaakt die eenzelfde suikerstructuur hadden, maar FA arm waren (AXOS-4-0,19-0,2**v**) of waarbij FA verknoopt voorkwam (AXOS-5-0,23-1,7**c**). Verder werden, vertrekkende van ditzelfde basisstaal (AXOS-5-0,22-1,7**b**), AXOS stalen aangemaakt die sterk aangerijkt waren in FA (AXOS-10-0,38-7,2**b**). Deze stalen hadden tevens een grotere DP en A/X-ratio. Vertrekkende van dit AXOS staal werden bijkomend stalen met gelijke DP en A/X-ratio aangemaakt. Een eerste staal AXOS-9-0,39-6,9**v** was even rijk aan FA, maar FA kwam voornamelijk voor in vrije vorm na afsplitsing met behulp van FA esterasen (FAE). Door vervolgens FA te verwijderen met behulp van Amberlite XAD-4 werden FA armere AXOS bekomen (AXOS-9-0,36-0,9**v**). De AXOS stalen bevatten bovendien gelijkaardige glucose- en proteïneconcentraties, waardoor ze niet de oorzaak kunnen zijn van verschillen gedurende de *in vitro* fermentatie van AXOS.

Antioxidantcapaciteit van (A)XOS

De antioxidantcapaciteit van XOS en AXOS was concentratie-afhankelijk. Daarom werd de TEAC test eerst **geoptimaliseerd** ten einde een juist meetbereik op te stellen voor antioxidantcapaciteitsbepaling van FA, XOS en AXOS. Hierbij werd tevens overgeschakeld op een buffer die meer relevant was voor het menselijk colon (pH 6,5). Zowel met de TEAC als de ORAC test

werd bevonden dat de antioxidantcapaciteit van AXOS voornamelijk bepaald wordt door het aanwezige **FA** en zijn **verschijningsvorm**. Hierdoor hadden AXOS, zeker deze rijk aan FA, een veel hogere antioxidantcapaciteit dan XOS, arm aan FA. Bij XOS speelden mogelijks andere structurele kenmerken, zoals de acetyleringsgraad of het uronzuurgehalte, een rol in de antioxidantcapaciteit. De verschijningsvorm van FA had tevens een belangrijke impact op de antioxidantcapaciteit. Vrij FA *as such* had een antioxidantcapaciteit die meer dan twee keer sterker was dan Trolox, een wateroplosbaar vitamine E analoog. Door verestering van FA aan arabinose verloor FA een deel van zijn antioxidantcapaciteit, maar bleef het sterke antioxidanteigenschappen vertonen. Door verknoping van FA daalde de antioxidantcapaciteit nog verder. Daarentegen door FA vrij te zetten in de AXOS preparaten nam de antioxidantcapaciteit van FA sterk toe. Bij de totale antioxidantcapaciteitsbepaling, met behulp van de ORAC test, waren de verschillen in antioxidantcapaciteit van FA in vrije of gebonden vorm echter minder uitgesproken.

In vitro fermentatie van (A)XOS

Tenslotte werd het prebiotische potentieel van (A)XOS nagegaan door de fermentatie in de dikke darm na te bootsen met behulp van het effluent van de SHIME reactor (Molly *et al.*, 1994). Zowel XOS als AXOS werden deels gefermenteerd, weliswaar in verschillende mate en aan verschillende snelheden. Fermentatie van de stalen resulteerde tevens in een toename aan gezondheidsbevorderende korte ketenvetzuren (KKVZ): azijnzuur, propionzuur en boterzuur. Proteïnefermentatie ging gedurende 48 uur fermentatie niet op, daar de concentraties aan vertakte KKVZ en ammoniak constant bleven. Dit is mogelijk het gevolg van een onderdrukkende werking van de geprefereerde koolhydraatfermentatie, maar kan eveneens te wijten zijn aan de lage hoeveelheid proteïnen in de fermentatievloeistof. De enzymactiviteit in de stalen werd niet of slechts weinig gestimuleerd bij aanvang van het experiment en nam af bij verdere incubatie. De aanwezige enzymen waren echter wel in staat (A)XOS gedeeltelijk af te breken gedurende 48 uur fermentatie.

Incubatie van **XOS** resulteerde in afbraak van XOS moleculen, maar de verdere fermentatie van xylose ging trager op. De enzymen vertoonden een hogere activiteit tijdens de incubatie van XOS met een lage DP in vergelijking met de activiteit bij incubatie van XOS met een hogere DP. Dit resulteerde tevens in een iets hogere fermentatiegraad van dit eerste staal. Fermentatie van XOS leidde bovendien tot een verschuiving in het KKVZ profiel: het aandeel in propionzuur en boterzuur nam toe ten koste van het aandeel van azijnzuur. Hieruit blijkt dat deze oligosachariden wellicht de groei/activiteit van boterzuurproducerende bacteriën zoals *Roseburia* en andere *Clostridium* species stimuleren (Chassard *et al.*, 2007). Onder de gebruikte fermentatiecondities waren de verschillen in fermentatie van de twee XOS stalen echter beperkt, waaruit besloten kan worden dat binnen dit DP bereik, de invloed van de DP op de fermentatie van XOS beperkt is.

FA rijke (vrij of gebonden) **AXOS** stalen werden trager gefermenteerd dan het FA arme AXOS staal. Arabinose fermentatie trad sneller op dan xylose fermentatie, met uitzondering van het gebonden FA rijke staal. Dit leidde tevens tot een snellere fermentatie van FA arme AXOS dan XOS. Dit is in tegenstelling tot eerdere studies die concludeerden dat een hogere A/X-ratio de fermentatie bemoeilijkt waardoor gedurende de fermentatie de A/X-ratio van de ongefermenteerde fractie toeneemt. In deze studie was de FAE activiteit beperkt gedurende de *in vitro* fermentatie, waardoor FA gebonden bleef. Daardoor bleef ook bij langere incubatietijden de A/X-ratio constant voor gebonden FA rijke AXOS, daar FA de arabinose hydrolyse bemoeilijkte. FAE activiteit werd niet vastgesteld in de andere AXOS stalen, mogelijks door productinhibitie van het reeds aanwezige vrije FA. Er werd echter wel een daling in totale FA vastgesteld door verlaging in vrij FA, dat verder gemetaboliseerd werd. KKVZ werden tevens het snelst gevormd bij het FA arme AXOS staal, maar de verhouding azijnzuur/propionzuur/boterzuur werd voor alle AXOS stalen amper of niet beïnvloed. Er kon geen relatie gevonden worden tussen xylosidase en arabinofuranosidase activiteit en de fermentatiesnelheid. Zo was de enzymactiviteit gedurende de fermentatie van gebonden FA rijke AXOS het hoogst, terwijl deze stalen een lagere fermentatiegraad hadden dan de FA arme AXOS. Met de aanwezigheid van gebonden FA, dat de arabinose hydrolyse beïnvloedt, wordt echter geen rekening gehouden bij activiteitsmeting met synthetische substraten. In de andere twee AXOS stalen was vrij FA aanwezig dat inhiberend kan inwerken ter hoogte van deze xylanolytische afbraakenzymen. In het staal met de hoogste concentratie vrije FA hadden deze enzymen echter een hogere activiteit dan in het FA arme AXOS staal. Mogelijks beïnvloeden ze de verdere fermentatie van de vrijgezette suikers. Daarenboven werd bij enzymtesten vastgesteld dat enkel het meten van de extracellulaire niet-membraangeassocieerde activiteit tot onderschatting en foute interpretatie kan leiden aangezien het aandeel van intracellulaire en membraangeassocieerde enzymen groot was. Terwijl algemeen de activiteit van de enzymen afnam, werd gedurende de eerste 6 uur incubatie steeds een toename in membraangeassocieerde activiteit opgemerkt.

Tenslotte daalde gedurende de fermentatie de antioxidantcapaciteit van de AXOS in de fermentatievloeistof indien vrij FA verder gemetaboliseerd werd.

Relevantie van de resultaten

De verworven inzichten in de invloed van FA op de prebiotische en antioxidanteigenschappen van AXOS dragen bij tot kennis van de invloed van structurele karakteristieken op de functionaliteit van AXOS. Tevens werd aangetoond dat naast de lage DP XOS ook XOS met een iets hogere DP goed fermenteerbaar zijn. Aangezien AXOS zowel prebiotische als antioxidanteigenschappen hebben, vormen ze interessante componenten om in de sector van functionele voeding te implementeren. Verder zijn componenten met antioxidanteigenschappen ook

interessant voor de voedingsindustrie doordat ze levensmiddelen beschermen tegen oxidatief bederf en zo de bewaringstijd ervan kunnen verlengen (Gallardo *et al.*, 2006). De goede oplosbaarheid van geferuloyleerde AXOS laat implementatie in een breder gamma aan levensmiddelen toe. Hierbij dient opgemerkt te worden dat het levensmiddel niet basisch mag zijn, aangezien hydrolyse van FA kan optreden en FA fluogeel kleurt onder deze condities, wat eerder als ongewenst zal beschouwd worden. Gelukkig hebben vele levensmiddelen eerder een zuur karakter. Verder kunnen AXOS *in situ* aangemaakt worden in tarwegebaseerde producten, zoals onderzocht is voor brood (Dornez *et al.*, 2011; Damen *et al.*, 2012).

Daarnaast zal AXOS gebonden FA ook elders terecht komen in het lichaam dan vrij FA, wat implicaties heeft voor zijn therapeutische werkzaamheid. Vrij FA wordt voornamelijk reeds geabsorbeerd in de maag terwijl veresterd FA en diFA daarentegen grotendeels intact het colon bereiken, waar ze deels vrij gezet worden. Aangezien deze FA veresterde AXOS gedurende een lange tijd intact blijven in het gastro-intestinaal stelsel, kunnen ze interessant zijn bij het voorkomen van de vorming van kankerveroorzakende nitroso-componenten in de maag (Kuenzig *et al.*, 1984; Bingham *et al.*, 1996) en door reactie van gevormde amines en nitriet gekatalyseerd door micro-organismen in het colon (Calmels *et al.*, 1985). Verder ligt oxidatieve stress mee aan de basis van de ontwikkeling van colonkanker (Chang *et al.*, 2008) en zou (vrijgezet) FA en zijn microbiële metaboliëten therapeutisch kunnen optreden (Gao *et al.*, 2006).

Toekomstperspectieven

Uitgebreider onderzoek is nodig naar het effect van FA aanrijking van AXOS op de fermentatie in het colon. Hiervoor zou men via *in vivo* proeven of met behulp van de volledige SHIME reactor kunnen onderzoeken in welke mate FA de fermentatie verhindert of zorgt voor een grotere spreiding van de fermentatie over respectievelijk heel het colon of de verschillende SHIME-compartimenten. Hierbij is het ook interessant de dynamiek van FA vrijzetting en metabolisatie verder te onderzoeken. Aangezien FA de fermentatie beïnvloedt zou dit consequenties kunnen hebben op de vorming van KKVZ, het verhinderen van ongewenst proteïnefermentatie en de bacteriële populatie in het colon. Tijdens *in vivo* proeven zou via bloedstaalname onderzocht kunnen worden hoe snel en in welke mate bepaalde componenten (KKVZ, FA en gerelateerde metaboliëten) in de bloedbaan terechtkomen en of de opname van FA en FA metaboliëten leidt tot een toenemende antioxidantcapaciteit van het plasma. Ook urine zou onderzocht kunnen worden op uitscheiding van *p*-cresol, FA en verwante metaboliëten.

Vooraleer AXOS (met gebonden FA) een toepassing kunnen vinden in levensmiddelen moet tevens onderzocht worden welk effect ze hebben op zowel het productieproces als de finale eigenschappen van het product.

LITERATUURLIJST

- AACC (2003). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota. American Association of Cereal Chemists. 1200 p.
- Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.-A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigné, C. & Rémésy, C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition* 132 (7): 1962-1968.
- Akpınar, O., Erdoğan, K. & Bostancı, S. (2009). Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing* 87 (2): 145-151.
- Amaretti, A., Bernardi, T., Leonardi, A., Raimondi, S., Zanoni, S. & Rossi, M. (2013). Fermentation of xylo-oligosaccharides by *Bifidobacterium adolescentis* DSMZ 18350: kinetics, metabolism, and β-glucosidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (7): 3109-3117.
- Amrein, T. M., Gränicher, P., Arrigoni, E. & Amado, R. (2003). *In vitro* digestibility and colonic fermentability of aleurone isolated from wheat bran. *LWT - Food Science and Technology* 36 (4): 451-460.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. & Garcia-Conesa, M.-T. (2001a). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11): 5679-5684.
- Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. & Garcia-Conesa, M.-T. (2001b). Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 31 (3): 304-314.
- Anson, N. M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A.-M., Mattila, I., Lehtinen, P., Bast, A., Poutanen, K. & Haenen, G. R. M. M. (2009a). Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (14): 6148-6155.
- Anson, N. M., Van den berg, R., Havenaar, R., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. (2008). Ferulic acid from aleurone determines the antioxidant potency of wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (14): 5589-5594.
- Anson, N. M., van den Berg, R., Havenaar, R., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. (2009b). Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility. *Journal of Cereal Science* 49 (2): 296-300.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilhe, F., Lapiere, C., Bouchet, B., Abecassis, J. & Rouau, X. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (7): 2026-2033.
- Arts, M., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H.-P. & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (5): 1184-1187.
- Aura, A.-M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews* 7 (3): 407-429.

- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F. & Zuccotti, G. V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological Research* 63 (5): 366-376.
- Bakken, J. S. (2009). Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 15 (6): 285-289.
- Barron, C., Surget, A. & Rouau, X. (2007). Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* 45 (1): 88-96.
- Benamrouche, S., Crônier, D., Debeire, P. & Chabbert, B. (2002). A chemical and histological study on the effect of (1-4)-bèta-endo-xylanase treatment on wheat bran. *Journal of Cereal Science* 36 (2): 253-260.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3 (11): 286-290.
- Bingham, S., Pignatelli, B., Pollock, J., Ellul, A., Malaveille, C., Gross, G., Runswick, S., Cummings, J. & O'Neill, I. (1996). Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis* 17 (3): 515-523.
- Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C. & Chabbert, B. (2011). Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (34): 130-138.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72 (1): 248-254.
- Brillouet, J. M., Joseleau, J. P., Utile, J. P. & Lelievre, D. (1982). Isolation, purification and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (3): 488-495.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W. & Delcour, J. A. (2011). Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (2): 178-194.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C. & Steinhart, H. (2003). Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology* 217 (2): 128-133.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C. & Steinhart, H. (2005). Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* 46 (35): 5845-5850.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D. & Steinhart, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (7): 653-660.
- Calmels, S., Ohshima, H., Vincent, P., Gounot, A.-M. & Bartsch, H. (1985). Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 6 (6): 911-915.

- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3 (1): 1-30.
- Chang, D., Wang, F., Zhao, Y.-S. & Pan, H.-Z. (2008). Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences* 21 (4): 286-289.
- Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del'homme, C. & Bernalier-Donadille, A. (2007). Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS Microbiology Ecology* 61 (1): 121-131.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R. & Chopra, I. (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Microbiology* 70 (2): 161-165.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148 (6): 1258-1270.
- Cloetens, L., Broekaert, W. F., Delaedt, Y., Ollevier, F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Rutgeerts, P. & Verbeke, K. (2010). Tolerance of arabinoxylan-oligosaccharides and their prebiotic activity in healthy subjects: a randomised, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition* 103: 703-713.
- Cloetens, L., De Preter, V., Swennen, K., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Rutgeerts, P. & Verbeke, K. (2008). Dose-response effect of arabinoxylooligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers. *Journal of the American College of Nutrition* 27 (4): 512-518.
- Codex Alimentarius Commission (2008). Report of the 30th session of the Codex Committee on nutrition and foods for special dietary uses. ALINORM 09/32/26, November 2008. Beschikbaar op <http://www.codexalimentarius.net/download/report/727/al32_03e.pdf> [datum van opzoeking 02/11/2012].
- Conly, J. M., Stein, K., Worobetz, L. & Rutledge-Harding, S. (1994). The contribution of vitamin K₂ (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *The American journal of gastroenterology* 89 (6): 915-923.
- Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science* 35 (3): 225-243.
- Courtin, C. M., Swennen, K., Verjans, P. & Delcour, J. A. (2009). Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Food Chemistry* 112 (4): 831-837.
- Courtin, C. M., Van den Broeck, H. & Delcour, J. A. (2000). Determination of reducing end sugar residues in oligo- and polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 866 (1): 97-104.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerström, R., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. & Poutanen, K. (2002). *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (8): 781-789.

- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodriguez, J. M. & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 161 (5): 372-382.
- Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Microbiology* 70 (6): 443-459.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28 (10): 1221-1227.
- Damen, B., Pollet, A., Dornez, E., Broekaert, W. F., Haesendonck, I. V., Trogh, I., Arnaut, F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2012). Xylanase-mediated *in situ* production of arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic potential in whole meal breads and breads enriched with arabinoxylan rich materials. *Food Chemistry* 131 (1): 111-118.
- Damen, B., Verspreet, J., Pollet, A., Broekaert, W. F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2011). Prebiotic effects and intestinal fermentation of cereal arabinoxylans and arabinoxylan oligosaccharides in rats depend strongly on their structural properties and joint presence. *Molecular nutrition & food research* 55: 1862-1874.
- De Boever, P., Deplancke, B. & Verstraete, W. (2000). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *The Journal of Nutrition* 130 (10): 2599-2606.
- Delcour, J. A. & Hosene, R. C. (2010). Principles of cereal science and technology. American Association of Cereal Chemists Inc, Minnesota. 270p.
- Dobberstein, D. & Bunzel, M. (2010). Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrotimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (16): 8927-8935.
- Dornez, E., Verjans, P., Broekaert, W. F., Cappuyns, A. M., Van Impe, J. F., Arnaut, F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2011). *In situ* production of prebiotic AXOS by hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima* in high-quality bread. *Cereal Chemistry* 88 (2): 124-129.
- EFSA (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to wheat bran fibre and increase in faecal bulk (ID 3066), reduction in intestinal transit time (ID 828, 839, 3067, 4699) and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight (ID 829) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8 (10).
- EFSA (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to arabinoxylan produced from wheat endosperm and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 830) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 *EFSA Journal* 9 (6).
- Englyst, H. N. & Cummings, J. H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 42 (5): 778-87.
- Englyst, H. N., Hay, S. & Macfarlane, G. T. (1987). Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 45 (3): 163-171.

- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pædiatrica* 92: 48-55.
- FAOSTAT database: archives 2010. Beschikbaar op <<http://faostat.fao.org/>> [datum van opzoeking 27/10/12].
- Fenton, T. W., Mueller, M. M. & Clandinin, D. R. (1978). Isomerization of some cinnamic acid derivatives. *Journal of Chromatography* 152: 517-522.
- Fincher, G. B. & Stone, B. A. (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in cereal science and technology*. Y. Pomeranz. St. Paul, American Association of Cereal Chemists Inc. 364p.
- Fioramonti, J., Theodorou, V. & Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17 (5): 711-724.
- Fooks, L. J., Fuller, R. & Gibson, G. R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9 (1): 53-61.
- Fooks, L. J. & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88 (SupplementS1): s39-s49.
- François, I. E. J. A., Lescroart, O., Veraverbeke, W. S., Marzorati, M., Possemiers, S., Evenepoel, P., Hamer, H., Houben, E., Windey, K., Welling, G. W., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Verbeke, K. & Broekaert, W. F. (2012). Effects of a wheat bran extract containing arabinoxylan oligosaccharides on gastrointestinal health parameters in healthy adult human volunteers: a double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition FirstView* 108 (12): 1-14.
- Frankel, W. L., Zhang, W., Singh, A., Klurfeld, D. M., Don, S., Sakata, T., Modlin, I. & Rombeau, J. L. (1994). Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106 (2): 375-380.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell-walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37: 165-186.
- Fry, S. C., Willis, S. C. & Paterson, A. E. J. (2000). Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* 211 (5): 679-692.
- Gallardo, C., Jiménez, L. & Garcia-Conesa, M. T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry* 99 (3): 455-463.
- Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N. P. & Heber, D. (2006). Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *The Journal of Nutrition* 136 (1): 52-57.
- Garcia-Conesa, M. T., Plumb, G. W., Kroon, P. A., Wallace, G. & Williamson, G. (1997). Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox Report* 3 (4): 239-244.

- Garcia-Conesa, M. T., Wilson, I. D., Plump & Ralph, J. (1999). Antioxidant properties of 4, 4'-dihydroxy-3, 3'-dimethoxy-beta, beta'-bicinnamic acid (8-8-diferulic acid, non-cyclic form). *Journal of science of food and agriculture* 79 (3): 379-384.
- Garrote, G., Domínguez, H. & Parajó, J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering* 52 (3): 211-218.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. & Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108 (4): 975-982.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*: 1401-1412.
- Glitsø, L. V., Gruppen, H., Schols, H. A., Højsgaard, S., Sandström, B. & Bach Knudsen, K. E. (1999). Degradation of rye arabinoxylans in the large intestine of pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (7): 961-969.
- Gomez-Ruiz, J. A., Leake, D. S. & Ames, J. M. (2007). *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (17): 6962-6969.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D. & Ralph, J. (1998). Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (2): 193-200.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 13 (4): 435-448.
- Grasten, S., Liukkonen, K.-H., Chrevatidis, A., El-Nezami, H., Poutanen, K. & Mykkanen, H. (2003). Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and on bowel function in healthy humans. *Nutrition Research* 23 (11): 1503-1514.
- Gronlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E. & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 28 (1): 19-25.
- Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology* 18 (2): 64-71.
- Grootaert, C., Van den Abbeele, P., Marzorati, M., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. (2009). Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 69 (2): 231-242.
- Guarner, F. & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361 (9356): 512-519.
- Hatfield, R. D., Ralph, J. & Grabber, J. H. (1999). Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (3): 403-407.
- Hill, M. J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention* 6 (2): S43-S45.

- Hoffmann, R. A., Leeflang, B. R., de Barse, M. M. J., Kamerling, J. P. & Vliegthart, J. F. G. (1991). Characterisation by ^1H -n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides, derived from arabinoxylans of white endosperm of wheat, that contain the elements $-4)[\alpha\text{-L-Araf-(1-3)]-\beta\text{-D-Xylp-(1- or -4) } [\alpha\text{-L-Araf-(1-2)]}[\alpha\text{-L-Araf-(1-3)]-\beta\text{-D-Xylp-(1-}$. Carbohydrate Research 221 (1): 63-81.
- Holloway, W. D., Tasman-Jones, C. & Bell, E. (1980). The hemicellulose component of dietary fiber. The American Journal of Clinical Nutrition 33 (2): 260-263.
- Hopkins, M. J., Englyst, H. N., Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G. T. & McBain, A. J. (2003). Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. Applied and Environmental Microbiology 69 (11): 6354-6360.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (6): 1841-1856.
- Iiyama, K., Lam, T. & Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. Plant physiology 104 (2): 315-320.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. & Stone, B. A. (1990). Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. Phytochemistry 29 (3): 733-737.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. Plant Science 127 (2): 111-127.
- Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. Carbohydrate Polymers 28 (1): 33-48.
- Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C. G. (2006). Arabinoxylans: technologically and nutritionally functional plant polysaccharides. Functional food carbohydrates. C. G. Biliaderis and M. S. Izydorczyk. CRC Press. 249-290.
- Izydorczyk, M. S. & Dexter, J. E. (2008). Barley β -glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products - a review. Food Research International 41 (9): 850-868.
- Jones, B. J. M., Higgins, B. & Silk, D. (1987). Glucose absorption from maltotriose and glucose oligomers in the human jejunum. Clin Sci 72 (4): 409-14.
- Kabel, M. A., Carvalheiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J. C., Gírio, F. M., Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (2002a). Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. Carbohydrate Polymers 50 (1): 47-56.
- Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (2002b). *In vitro* fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (21): 6205-6210.
- Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A.-M., Forssell, P. & Poutanen, K. (2000). *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture 80 (10): 1469-1476.
- Katan, M. B. (2012). Why the European Food Safety Authority was right to reject health claims for probiotics. Beneficial Microbes 3 (2): 85-89.

- Katapodis, P., Vardakou, M., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B. J. & Christakopoulos, P. (2003). Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan. *European Journal of Nutrition* 42 (1): 55-60.
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A. & Garcia-Conesa, M.-T. (2003). Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (20): 6050-6055.
- Koo, M. W. L. & Cho, C. H. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology* 500 (1): 177-185.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A. & Williamson, G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 661-667.
- Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E., Holowaschenko, H., Newmark, H., Mergens, W. & Conney, A. (1984). Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* 5 (3): 309-313.
- Kulkarni, N., Shendye, A. & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23 (4): 411-456.
- Lagaert, S., Pollet, A., Delcour, J. A., Lavigne, R., Courtin, C. M. & Volckaert, G. (2010). Substrate specificity of three recombinant alpha-l-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. *Biochemical and biophysical research communications* 402 (4): 644-650.
- Lagaert, S., Pollet, A., Delcour, J. A., Lavigne, R., Courtin, C. M. & Volckaert, G. (2011). Characterization of two beta-xylosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their contribution to the hydrolysis of prebiotic xylooligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (6): 1179-1185.
- Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S. & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology* 157 (9): 876-884.
- Lempereur, I., Rouau, X. & Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science* 25 (2): 103-110.
- Lequart, C., Nuzillard, J.-M., Kurek, B. & Debeire, P. (1999). Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 319 (14): 102-111.
- Li, L., Shewry, P. R. & Ward, J. L. (2008). Phenolic acids in wheat varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (21): 9732-9739.
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Liyana-Pathirana, C. M. & Shahidi, F. (2006). Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4): 1256-1264.

- Long, S. S. & Swenson, R. M. (1977). Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *The Journal of Pediatrics* 91 (2): 298-301.
- Lopez, H. W., Levrat, M.-A., Guy, C., Messenger, A., Demigné, C. & Rémésy, C. (1999). Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10 (9): 500-509.
- Lu, Z. X., Walker, K. Z., Muir, J. G. & O'Dea, K. (2004). Arabinoxylan fibre improves metabolic control in people with Type II diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (4): 621-628.
- Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. & Allison, C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology* 132 (6): 1647-1656.
- Maes, C. & Delcour, J. A. (2002). Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science* 35 (3): 315-326.
- Maes, C., Vangeneugden, B. & Delcour, J. A. (2004). Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science* 39 (2): 181-186.
- Manning, T. S. & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 18 (2): 287-298.
- Mares, D. & Stone, B. A. (1973). Studies on wheat endosperm I. Chemical composition and ultrastructure of the cell walls. *Australian Journal of Biological Sciences* 26 (4): 793-812.
- Merkel, R., Hradkova, I., Filip, V. & Smidrkal, J. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech Journal of Food Science* 28 (4): 275-279.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. & Huis in't Veld, J. H. J. (1995). A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *Alternatives to Laboratory Animals* 23: 197-209.
- Mitsuoka, T. (1996). Intestinal flora and human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 5 (1): 2-9.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., De Smet, I. & Verstraete, W. (1994). Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease* 7 (4): 191-200.
- Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C. & Esteves, M. P. (2007). *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology* 40 (6): 963-972.
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136 (1): 65-80.
- Nicholson, J. K., Holmes, E. & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Micro* 3 (5): 431-438.
- Nordling, M. M., Glinghammar, B., Karlsson, P. C., Kok, T. M. C. M. d. & Rafter, J. J. (2003). Effects on cell proliferation, activator protein-1 and genotoxicity by fecal water from patients with colorectal adenomas. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 38 (5): 549-555.

- O'Hara, A. M. & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7 (7): 688-693.
- Ogawa, K., Takeuchi, M. & Nakamura, N. (2005). Immunological effects of partially hydrolyzed arabinoxylan from corn husk in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69 (1): 19-25.
- Ohta, T., Semboku, N., Kuchii, A., Egashira, Y. & Sanada, H. (1997). Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in the LDL oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (5): 1644-1648.
- Ohta, T., Yamasaki, S., Egashira, Y. & Sanada, H. (1994). Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (3): 653-656.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10): 4619-4626.
- Ou, S., Jackson, G. M., Jiao, X., Chen, J., Wu, J. & Huang, X. (2007). Protection against oxidative stress in diabetic rats by wheat bran feruloyl oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 55 (8): 3191-3195.
- Parker, M. L., Ng, A. & Waldron, K. W. (2005). The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (15): 2539-2547.
- Perlin, A. S. (1951). Structure of the soluble pentosans of wheat flours. *Cereal Chemistry Journal* 28 282-393.
- Pollet, A., Van Craeyveld, V., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J., A. & Courtin, C., M. (2012). *In vitro* fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low molecular mass arabinoxylans with different structural properties from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 946-954.
- Rakotoarivonina, H., Hermant, B., Monthe, N. & Rémond, C. (2012). The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. *Microbial Cell Factories* 2012 11 (159): 1-12.
- Rao, R. & Muralikrishna, G. (2006). Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: changes upon malting and their consequence on antioxidant activity. *Phytochemistry* 67: 91-99.
- Rohn, S., Rawel, H. M. & Kroll, J. (2002). Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (12): 3566-3571.
- Rose, D. J. & Inglett, G. E. (2010). Two-stage hydrothermal processing of wheat (*Triticum aestivum*) bran for the production of feruloylated arabinoxyloligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (10): 6427-6432.
- Russell, W. R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Duncan, S. H., Drew, J. E. & Duthie, G. G. (2008). Anti-inflammatory implications of the microbial transformation of dietary phenolic compounds. *Nutrition and Cancer* 60 (5): 636-642.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A. & Gänzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111 (5): 1176-1184.

- Sanchez, J. I., Marzorati, M., Grootaert, C., Baran, M., Van Craeyveld, V., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Delcour, J. A., Verstraete, W. & Van de Wiele, T. (2009). Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Microbial Biotechnology* 2 (1): 101-113.
- Sandberg, A. S., Andersson, H., Hallgren, B., Hasselblad, K., Isaksson, B. & Hultbn, L. (1981). Experimental model for in vivo determination of dietary fibre and its effect on the absorption of nutrients in the small intestine. *British Journal of Nutrition* 45 (02): 283-294.
- Saulnier, L., Sado, P., Branlard, G., Charmet, G. & Guillon, F. (2007). Wheat arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science* 46 (3): 261-281.
- Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (1): 43-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J. & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 101 (2): 492-501.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.-Y., Guittet, E. & Rolando, C. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24 (6): 1359-1362.
- Shibuya, N. & Iwasaki, T. (1985). Structural features of rice bran hemicellulose. *Phytochemistry* 24 (2): 285-289.
- Sies, H. (1994). Strategies of antioxidant defense. *EJB Reviews* 1993. Springer Berlin Heidelberg. 1993: 101-107.
- Smith, M. M. & Hartley, R. D. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research* 118: 65-80.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R. & Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40 (2): 92-100.
- Subba Rao, M. & Muralikrishna, G. (2002). Evaluation of the Antioxidant Properties of Free and Bound Phenolic Acids from Native and Malted Finger Millet (Ragi, *Eleusine coracana* Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (4): 889-892.
- Swennen, K., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2006a). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (6): 459-471.
- Swennen, K., Courtin, C. M., Lindemans, G. C. J. E. & Delcour, J. A. (2006b). Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxyloligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (11): 1722-1731.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (6-7): 669-675.
- Thompson-Chagoyán, O. C., Maldonado, J. & Gil, A. (2005). Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical nutrition* 24 (3): 339-352.

- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R. & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine* 1 (6): 6-14.
- Van Craeyveld, V., Holopainen, U., Selinheimo, E., Poutanen, K., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2009). Extensive dry ball milling of wheat and rye bran leads to in situ production of arabinoxylan oligosaccharides through nanoscale fragmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (18): 8467-8473.
- Van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Delaedt, Y., Onagbesan, O., Decuypere, E., Buyse, J., De Ketelaere, B., Broekaert, W. F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2008). Structurally different wheat-derived arabinoxyloligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *The Journal of Nutrition* 138 (12): 2348-2355.
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. & Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 51 (1): 143-153.
- Van De Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. & Verstraete, W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology* 102 (2): 452-460.
- van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H. & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry* 66 (4): 511-517.
- Van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1644-1652.
- Van Loo, J. (2004). The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. *Nutrition Research Reviews* 17: 89-98.
- Vardakou, M., Nueno Palop, C., Gasson, M., Narbad, A. & Christakopoulos, P. (2007). In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (5): 584-589.
- Veenashri, B. R. & Muralikrishna, G. (2011). *In vitro* anti-oxidant activity of xyloligosaccharides derived from cereal and millet brans - comparative study. *Food Chemistry* 126 (3): 1475-1481.
- Venturi, M., Hambly, R. J., Glinghammar, B., Rafter, J. J. & Rowland, I. R. (1997). Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 18 (12): 2353-2359.
- Visek, W. J. (1978). Diet and cell growth modulation by ammonia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 31 (10): S216-S220.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology* 9 (89): 328-335.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Song, H. & Tian, Y. (2008). Inhibitory effect of wheat bran feruloyl oligosaccharides on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry* 109 (1): 129-136.

- Williamson, G., Plumb, G. W. & Garcia-Conesa, M. T. (1999). Glycosylation, esterification, and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. *Plant Polyphenols 2*. Springer. 483-494.
- Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A. & Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40 (3): 235-243.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D. & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334 (6052): 105-108.
- Yoshioka, H., Iseki, K. & Fujita, K. (1983). Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72 (3): 317-321.
- Yuan, X., Wang, J. & Yao, H. (2005a). Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry* 90 (4): 759-764.
- Yuan, X., Wang, J. & Yao, H. (2005b). Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *Bifidobacterium bifidum*. *Anaerobe* 11 (4): 225-229.
- Zhao, Z. & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chemistry* 109 (4): 691-702.

VULGARISERENDE SAMENVATTING

Een goede darmflora kan bijdragen tot de gezondheid van de mens. De laatste jaren is er veel onderzoek gevoerd naar manieren om deze darmflora te sturen. Lactobacillen en bifidobacteriën worden als gunstig voor de gastheer worden beschouwd. Toename van deze bacteriën of het verhogen van hun activiteit in de dikke darm kan gerealiseerd worden door opname van voedingscomponenten, prebiotica genoemd, die selectief de groei/activiteit van deze bacteriën stimuleren. Prebiotica zijn niet verteerbaar door de mens maar worden pas in de dikke darm gefermenteerd door de gunstige bacteriën. Recent werd aangetoond dat arabinoxylan-oligosachariden (AXOS) die door enzymatische hydrolyse van arabinoxylan aangemaakt kunnen worden uit tarwezemel, een nevenproduct van de industriële tarwevermaling, zulke prebiotische eigenschappen vertonen. Deze AXOS kunnen variëren in ketenlengte en in substitutie met arabinose - indien ze slechts weinig arabinose in hun structuur hebben worden ze ook wel xylo-oligosachariden (XOS) genoemd -, maar ook in de mate waarin ferulinezuur (FA), een gekend antioxidant, aanwezig is in zijn structuur. De invloed van sommige structurele parameters was reeds onderzocht. Echter de impact van FA op de prebiotische eigenschappen en de mogelijke antioxidanteigenschappen van AXOS was nog niet onderzocht. Tevens was de invloed van de ketenlengte op de fermentatie van XOS nog niet bestudeerd.

Beiden werden in deze studie onderzocht door gebruik te maken van zes AXOS, met een gelijkaardige suikerstructuur maar variërend in voorkomen van FA (arm/rijk, vrij/gebonden/aan elkaar verknoopt) en twee XOS stalen met verschillende ketenlengte.

Meting van de antioxidantcapaciteit van deze AXOS toonde aan dat FA de belangrijkste factor was die de antioxidanteigenschappen van AXOS bepaalde, waarbij ook de vorm waar in het voorkwam een grote invloed had. FA gebonden aan arabinose had nog steeds goede antioxidanteigenschappen, maar deze was wel beduidend minder dan bij vrij FA.

De prebiotische eigenschappen van (A)XOS werden bestudeerd met behulp van *in vitro* fermentatie. Binnen het geteste bereik in ketenlengte werd er geen verschil vastgesteld tussen de fermentatie van kleine en grote XOS. AXOS arm aan FA werden het snelst gefermenteerd en hierdoor werden er sneller gunstige korte keten vetzuren gevormd. Zowel vrij als gebonden FA vertraagden de fermentatie van AXOS. Tenslotte daalde gedurende de fermentatie de antioxidantcapaciteit van de AXOS in de fermentatievloeistof wanneer vrij FA gemetaboliseerd werd.

AXOS kunnen in toegepast worden in een brede waaier aan levensmiddelen. Hierbij worden graangebaseerde toepassing (brood, pasta, biscuits, ...) geprefereerd aangezien de productie van AXOS kan plaatsvinden tijdens de verwerking van graan tot het eindproduct.