



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö



LUNDS
UNIVERSITET

Examensarbete 15hp

Tre sötningsmedels påverkan på tarmfloran



Författare: Annika Lindström
Extern handledare: Frida Fåk
Intern handledare: Anna Blücher
Examinator: Kjell Edman
Termin: VT17
Ämne: Biomedicinsk vetenskap
Nivå: Grundnivå
Kurskod: 2BK01E
Löpnummer: 2017:H3

Annika Lindström, Examensarbete,
Linnéuniversitetet Kalmar

Frågeställning

Hur påverkas tarmflorasammansättningen av tre olika sötningsmedel och kan det medföra konsekvenser för individens hälsa?

Annika Lindström

Examensarbete 15hp. Filosofie kandidatexamen med huvudområde biomedicinsk vetenskap. Hälsovetenskapliga programmet inriktning biovetenskap, 180hp, Linnéuniversitetet, Kalmar.

Huvudhandledare: Anna Blücher,

Institutionen för kemi och biomedicin, Linnéuniversitetet i Kalmar.

Extern handledare: Frida Fåk,

Centrum för preventiv livsmedelsforskning, Lunds universitet.

Examinator: Kjell Edman,

Institutionen för kemi och biomedicin, Linnéuniversitetet i Kalmar.

Sammanfattning

Idag pekar allt mer forskning på tarmfloras betydelse för individens hälsa. En förändrad tarmflora, dysbios, har kunnat kopplas till flertal olika sjukdomstillstånd, så som tjocktarmscancer, autoimmuna sjukdomar och allergier. Tarmfloran påverkas av det vi äter och det är därför av vikt att studera hur kosten påverkar tarmfloran. En vanlig livsmedelstillsats som ökar är icke-energigivande sötningsmedel, som ger livsmedel en söt smak utan att bidra med någon större mängd kalorier. I detta examensarbete studeras tre sötningsmedels (A, B och C) effekter på tarmfloran hos 13 friska individer. Resultaten visar att de tre valda sötningsmedlen påverkar tarmfloras sammansättning. Störst effekt gav sötningsmedel B medan sötningsmedel A gav minst effekt. Bland annat sågs signifikanta förändringar inom fylat Proteobacteria, ordningen *Lactobacillales* och släkterna (genus) *Ruminococcus* och *Akkermansia*. Vilka hälsoeffekter som skulle kunna tänkas uppstå av dessa förändringar är svåra att förutspå. Dock kunde en del av förändringarna som sågs kopplas till negativa hälsotillstånd så som inflammatoriska tarmsjukdomar och fetma. Förändringarna som sågs i denna studie tyder på att sötningsmedlen A, B och C, främst B, skulle kunna påverka individens hälsa. Det behövs ytterligare forskning i ämnet för att bekräfta resultatet.

Abstract

Recent research shows that the gut microbiota is important for human health. An altered gut microbiota, dysbiosis, has been associated with several different diseases, such as colorectal cancer, autoimmune disease and allergies. The gut microbiota is influenced by what we eat, and it is therefore important to study how our diet affects the gut microbiota. A common food additive that are used more and more is low-calorie-sweeteners, which gives food a sweet taste without contributing any large amount of calories. In this study three sweeteners (A, B and C) were investigated to see if and how they affect the gut microbiota of 13 healthy individuals. The three chosen sweeteners did affect the composition of the gut microbiota. Sweetener B had the greatest effect while sweetener A had the least effect. Significant changes were observed, for example, in the Proteobacteria phylum, *Lactobacillales* order, and *Ruminococcus* and *Akkermansia* genus. What health effects that might be expected from these changes is hard to predict. However, some of the changes are linked to negative health conditions, such as inflammatory bowel diseases and obesity. The changes observed in this study indicate that sweeteners A, B and C, especially B, could affect human health. Further research on the subject is needed to confirm the results.

Nyckelord

Microbiota, sweeteners, stool sample.

Tack

Stort tack till mina handledare, Frida Fåk och Anna Blücher för värdefulla tips, vägledning och granskning av tidigare versioner. Tack till Olena Prykhodko för din tålmodighet och ovärderliga hjälp i labbet. Dessutom vill jag tacka min familj och vänner som stöttat mig under arbetets gång.

Innehållsförteckning

1 Introduktion och bakgrund	- 1 -
1.1 Frågeställning, och syfte	- 1 -
1.2 Bakgrund	- 1 -
1.2.1 Icke energigivande sötningsmedel	- 1 -
1.2.2 Ökad konsumtion och användning	- 1 -
1.2.3 Sackaros – Det energigivande sockret	- 1 -
1.2.4 Sackarin – E954	- 1 -
1.2.5 Steviolglykosider - E960	- 2 -
1.2.6 Aspartam – E951	- 2 -
1.2.7 Sukralos – E995	- 2 -
1.2.8 Taxonomi	- 3 -
1.2.9 Human tarmflorasammansättning	- 3 -
1.2.10 Analys av human tarmflora	- 3 -
1.2.11 Next generation sequencing	- 3 -
1.2.12 16S ribosomalt RNA	- 3 -
1.2.13 Tarmflorasammansättningens effekter på hälsan	- 3 -
1.2.14 Icke energigivande sötningsmedels effekt på tarmflorasammansättning	- 4 -
1.2.15 Sötningsmedel, upphov till glukosintolerans	- 4 -
1.2.16 Tarmfloran och utveckling av glukosintolerans	- 4 -
2. Metod	- 7 -
2.1 Medicins sötningsmedelsstudie – studiens upplägg	- 7 -
2.2 Detta arbetes upplägg	- 7 -
2.3 Laboration	- 7 -
2.3.1 DNA-Extrahering	- 7 -
2.3.2 Mätning av DNA-koncentration	- 8 -
2.3.3 DNA-utspädning	- 8 -
2.3.4 Biblioteksförberedning: Amplicon PCR, Gelelektrofores och Index PCR	- 8 -
2.3.5 Amplicon PCR	- 8 -
2.3.6 PCR 1 Clean up	- 8 -
2.3.7 Gelelektrofores	- 9 -
2.3.7.1 Gelelektrofores, stickprov	- 9 -
2.3.8 Index PCR	- 9 -
2.3.9 PCR 2 Clean up	- 10 -
2.3.10 DNA-koncentration mätning och DNA-utspädning	- 10 -
2.3.11 Förberedning av gemensamt biblioteksprov	- 10 -
2.3.12 MiSeq förberedning	- 10 -
2.4 Bioinformatik, QIIME	- 11 -

2.5 Statistisk Analys _____	- 11 -
2.6 Litteratursökning _____	- 11 -
3. Resultat _____	- 12 -
3.1 DNA-koncentration omgång 1 efter DNA-extrahering _____	- 12 -
3.2 Gelelektrofores _____	- 12 -
3.2.1 Gelelektrofores, stickprov _____	- 13 -
3.3 DNA-koncentrationsmätning _____	- 13 -
3.4 Förberedning av gemensamt biblioteksprov _____	- 13 -
3.5 Analys av provresultat _____	- 13 -
3.5.1 Total bakteriesammansättning, Fyla _____	- 13 -
3.5.2 Analys på fylum-nivå _____	- 14 -
3.5.3 Analys på ordnings-nivå _____	- 15 -
3.5.4 Analys på familje-nivå _____	- 16 -
3.5.5 Analys på släktes-nivå (genus) _____	- 17 -
4. Diskussion _____	- 18 -
4.1 Examensarbetet, ett stickprov _____	- 18 -
4.2 Jämförelse med Nature-artikeln _____	- 18 -
4.3 Kopplingar till hälsa _____	- 18 -
4.3.1 Proteobacteria _____	- 18 -
4.3.2 Verrucomicrobia _____	- 19 -
4.3.3 Lactobacillales _____	- 19 -
4.3.4 Turibacterales och RF39 _____	- 19 -
4.3.5 Ruminococcaceae och Ruminococcus _____	- 19 -
4.3.6 [Barnesiellaceae] _____	- 20 -
4.4 Cyanobacteria, YS2, RF39, Alcaligenaceae. _____	- 20 -
4.5 Intag av sötningsmedel i grupp 0. _____	- 20 -
4.6 Sötningsmedel grupp B starkast effekt _____	- 20 -
5. Slutsats _____	- 21 -
7. Referenser _____	- 22 -

1 Introduktion och bakgrund

1.1 Frågeställning, och syfte

Detta examensarbete syftar till att analysera tarmfloran från tretton individer som deltagit i en sötningsmedelstudie utförd av Centrum för preventiv livsmedelsforskning på Lunds universitet. Tanken med arbetet är att se om tre olika sötningsmedel (A, B och C) påverkar sammansättningen av tarmfloran.

Examensarbetet har utförts vid Centrum för preventiv livsmedelsforskning, Lunds universitet. Lokalen där laborationerna utförts ligger på Medicon Village, 223 81 Lund.

1.2 Bakgrund

1.2.1 Icke energigivande sötningsmedel

Icke energigivande sötningsmedel, ”Low-calorie sweeteners” (LCS) är en grupp av sötningsmedel som innehåller få eller inga kalorier. De har trots sitt låga kaloriinnehåll motsvarande söta smak som den energigivande sockerarten sackaros, vanligt strösocker. Idag är LCS vanligt förekommande i många produkter som läsk, smaksatt vatten, mejeriprodukter, tandkrämer och läkemedel, där de drar ner kaloriinnehållet utan att produkten tappar sin söta smak (1).

Det finns ett flertal olika sötningsmedel som är godkända i EU och som bidrar med ingen eller lite energi. Hit hör bland annat sackarin, cyklamat, acesulfamkalium, sukralos, steviolglykosider, taumat, neohesperidindihydrochalcon, neotam och advantam (2).

1.2.2 Ökad konsumtion och användning

Konsumtionen av LCS har ökat runt om i världen de senaste åren, och trenden ser ut att hålla i sig. Orsaken till den ökade användningen av LCS anses vara en ökad oro kring nutrition och hälsa vid vanligt sockerintag, samt den låga kostnaden för tillverkning. Konsumtionsökningen av LCS har skett hos både barn och vuxna (1). I EU får sötningsmedel endast användas i livsmedel utan tillsatt socker och i lightprodukter som exempelvis lightläsk (2).

1.2.3 Sackaros – Det energigivande sockret

Strösocker eller bordsocker, som vi oftast förknippar med termen ”socker”, består till nästan 100 % av sackaros och är ett energigivande sötningsmedel. Sackaros består av glukos och fruktos och saknar vitaminer, mineraler och kostfiber (3). Sackaros bryts i kroppen ned till glukos och fruktos och bidrar bland annat till att ge kroppen energi i form av ATP. Dessutom höjer det blodsockret, och kan ge hyperglykemi hos personer som lider av defekt insulinfrisättning eller insulinproduktion. Sackaros bidrar med en, för många uppskattad, söt smak, som gör det svårt att dra ner på användningen i söta produkter. För högt intag av sackaros är kopplat till diabetes och fetma, som i sin tur är länkade till hjärtsjukdomar och åderförkalkning. Sackaros negativa hälsoeffekter anses vara en av orsakerna till att alternativa sötningsmedel började utvecklas (4).

1.2.4 Sackarin – E954

Upptäckten av sackarin gjordes av en slump under sent 1800-tal. Till en början användes det endast till personer med diabetes och först under andra världskriget nådde sackarin den allmänna befolkningen (1). Sackarin är 200–700 gånger sötare än sackaros, och innehåller inga kalorier. På 1970 talet kopplades sackarin till utvecklingen

av cancer i urinblåsan hos råttor, vilket gav upphov till försiktighetsvarningar för konsumtion av sackarin. Dessa varningar drogs senare tillbaka då studier inte kunde se denna koppling mellan sackarin och människor (5). Idag används sackarin bland annat för att sänka energiinnehållet i livsmedel (6). U.S Food and Drug Administration (FDA) har satt det dagliga accepterade intaget (ADI) av sackarin till 5 mg per kg kroppsvikt (7). European Food Safety Authority (EFSA) anser att ADI bör ligga på 0–5mg per kg kroppsvikt (8). E-numret för Sackarin är E954 (9).

Ungefär 85 % av det intagna sackarinet absorberas och utsöndras sedan oförändrat via urinen. Resterande 15 % följer med avföringen ut (9).

1.2.5 Steviolglykosider - E960

Steviolglykosider är mycket intensiva sötningsmedel som utvinns ur blad av växten *Stevia rebaudiana*. Steviolglykosider anses säkra av EFSA (10). De steviolglykosider som det finns mest av i *Stevia rebaudiana* är steviosid och rebaudiosid A.

Steviolglykosider varierar i sötma, och är mellan 250–300 gånger sötare än sackaros (11). Steviolglykosider har E-numret E 960 (12).

För steviolglykosider har EFSA fastställt ett ADI på 4 mg per kg kroppsvikt (10), vilket är samma som FDAs rekommendation (5). Ett flertal studier har gjorts på steviosid för att kontrollera dess säkerhet, och inga allvarliga toxiska effekter har setts hos däggdjur (13).

Steviolglykosider bryts ej ned av kroppens enzymer, men har visat sig kunna brytas ned *in vitro* av bakterier från tarmen till steviol. Steviol är i sin tur resistent mot bakteriell nedbrytning. Steviol kan, när det bildats i tarmen, tas upp i kroppen, och transporteras då till levern och elimineras sedan via urinen (9).

1.2.6 Aspartam – E951

Sötningsmedlet aspartam (E 951) togs fram 1965 och är uppbyggt av två aminosyror, fenylalanin och asparbinsyra. Sötningsgraden är 100–200 gånger sötare än sackaros, vilket gör att det endast behöver användas i mycket små doser. Aspartam innehåller visserligen en del energi (17 kJ/g) men då mängden i livsmedel är låg, bidrar det knappast med någon energi alls (14). Av denna anledning räknas aspartam till gruppen av LCS (1). ADI i EU för Aspartam ligger på 40 mg per kg kroppsvikt (14).

Livsmedelsverket beskriver aspartam som ett säkert sötningsmedel. Endast personer med sjukdomen PKU bör undvika aspartam. Dessa individer har nämligen svårt att bryta ner aminosyran fenylalanin, vilket hos små barn kan ge utvecklingskador (14).

1.2.7 Sukralos – E995

Sukralos (E995) är ett stabilt sötningsmedel och används därför i många olika livsmedelsprodukter. Sukralos är modifierat sackaros och har en sötningsgrad som är hela 600 gånger sötare än sackaros själv, men utan någon energigivande effekt. Livsmedelsverket skriver att sukralos inte verkar ha några hälsoskadliga effekter (15). ADI för sukralos är av FDA satt till 5 mg per kg kroppsvikt (5) medan ADI i EU är satt till 15 mg (16).

1.2.8 Taxonomi

Taxonomi är vetenskapen om klassificering av organismer och dagens klassificeringssystem utvecklades av Carl von Linné. Alla arter har fått två namn, där det första beskriver vilket genus arten tillhör och den andra vilken art det är. Taxonet ovanför genusnivå kallas för familj. Familjenivån ligger i sin tur under taxonet ordning, som ligger under klassnivå, som ligger under nivå fylum (17).

1.2.9 Human tarmflorasammansättning

Den humana tarmfloran innefattar biljoner mikroorganismer (18), av över 30 olika fyla (19) och totalt ca 1000 arter (20). Till några av de vanligaste fyla hör Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria (18), Lentisphaerae, Tenericutes (21) och Euryarchaeota (22). Framförallt är det Firmicutes och Bacteroidetes som dominerar bakterieuppsättningen i tarmen (18).

1.2.10 Analys av human tarmflora

De flesta humanstudier bygger på att avföringsprover lämnas och analyseras genom 16S rRNA-analys för att ta reda på bakteriesammansättningen. Det bör dock uppmärksammas att sådana avföringsprover kan ge en felaktig representation av de bakterier som finns närvarande i andra delar av tarmen (23).

1.2.11 Next generation sequencing

För att analysera bakteriesammansättningen används DNA-sekvensering, som innebär att kvävebasernas ordningsföljd i bakteriernas DNA avläses. De senaste åren har det skett en enorm utveckling av denna analysmetod. Förr användes Sangers sekvensering, även kallad för ”first-generation sequencing”. Idag används istället en ny sekvenseringsmetod, next generation sequencing (NGS), som erbjuder analys av mycket stora mängder data. Innan DNA-sekvenseringen kan ske behövs ett stort antal kopior av de delar av DNAt som skall studeras, exempelvis en gen, vilket görs med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR) (24).

1.2.12 16S ribosomalt RNA

Vanligtvis är det genen för 16S ribosomalt RNA (16S rRNA) som analyseras vid analys av bakterier. Denna gen är ca 1500 baspar lång och innefattar nio stycken variabla regioner som finns utspridda mellan olika konstanta regioner. Genom att analysera en eller flera av de variabla delarna på 16S rRNA kan bakteriearten identifieras (25).

1.2.13 Tarmflorasammansättningens effekter på hälsan

Allt mer forskning visar på hur viktig tarmfloran är för vår hälsa. Tarmfloran kan påverka vårt immunförsvar, bland annat inflammationssystemet (26), där det finns kopplingar mellan olika bakterier och pro-inflammatoriska cytokiner (27). Störningar i tarmflorasammansättning, dysbios, har kopplats till flertal olika sjukdomstillstånd så som autoimmuna och allergiska tillstånd, bakterieinfektioner och tjocktarmscancer (18). Även metabola sjukdomar som fetma och insulinresistens, och kardiovaskulära sjukdomar har kopplats till dysbios (6). Numera pekar forskningen på att tarmfloran även kan påverka det centrala nervsystemet, genom en så kallad ”microbiota-gut-brain axis”. Detta lägger grunden för spännande forskning kring om det finns associationer mellan tarmfloran och mentala sjukdomar (28).

Det finns idag vetenskapliga studier som visar på att tarmflorasammansättningen har en del i utvecklingen av fetma och insulinresistens. Fetma har exempelvis kopplats till en

minskning av Bacteroidetes och en ökning av Firmicutes. Fetman är i sig är en riskfaktor för utveckling av glukosintolerans, diabetes mellitus typ 2 och det metabola syndromet. Diabetes mellitus typ 2 har kopplats till bland annat kardiovaskulära sjukdomar och lägre livskvalitet (6).

Vissa bakteriestammar har konstaterats ha positiva effekter på sin värds hälsa. Dessa bakterier kallas med ett gemensamt namn för probiotika (11). Många av bakterierna i tarmfloran har dessutom viktiga metabola funktioner, som exempelvis bildandet av olika vitaminer och kortkedjiga fettsyror med hälsofrämjande effekter (18).

Med kunskap om tarmfloras effekter på hälsan blir det allt viktigare att studera effekterna som olika typer av livsmedelskomponenter har på tarmflorasammansättningen (6).

1.2.14 Icke energigivande sötningsmedels effekt på tarmflorasammansättning

Det vi äter påverkar sammansättningen av vår bakterieflora i tarmen, och det vore därför inte orimligt att sötningsmedel skulle kunna ha en sådan effekt. Studier har visat att bland annat sackarin, aspartam och sukralos kan ge upphov till dysbioser (6). Ända sedan år 1980 har nämligen flera kopplingar visats mellan LCS och förändringar i tarmflorakompositionen (23). År 1980 såg en forskargrupp hur möss som exponerats för 7,5 % sackarin i sitt foder efter tio dagar utvecklade förändringar i tarmflorasammansättningen (29). Än idag är det dock relativt få studier gjorda som tittar på hur LCS påverkar den humana tarmfloran (23).

I en amerikansk kohortstudie, publicerad 2016, undersöktes lågkalorisötningsmedels effekter på kroppsvikt hos människor. Forskarnas slutsats var att lågkalorisötningsmedel (aspartam, sackarin, acesulfamkalium och sukralos) hade koppling till ökad kroppsvikt, större midjemått och högre förekomst av bukfetma, där en möjlig orsak misstänktes vara sötningsmedlens effekter på tarmfloran (30).

1.2.15 Sötningsmedel, upphov till glukosintolerans

En av anledningarna till att sötningsmedelsstudien på Lunds universitet utfördes var den mycket uppmärksammade studien ”Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota” publicerad i Nature 2014 (7). Forskargruppen bakom artikeln visade att artificiella icke energigivande sötningsmedel, non-caloric artificial sweeteners (NAS), driver på utvecklingen av glukosintolerans genom förändringar i sammansättningen av bakteriefloran i tarmen. De flesta NAS passerar nämligen mag-tarm-kanalen utan att tas upp av kroppen, och blir istället nedbrutna av bakterier i tarmen. I studien testades sackarin, sukralos och aspartams påverkan på glukoshomeostasen hos möss genom att sötningsmedel tillsattes i mössens dricksvatten. Utöver sötningsmedels-grupperna gjordes tre kontrollgrupper som antingen fick dricka osötat vatten eller vatten sötat med antingen glukos eller sackaros. Efter 11 veckor syntes en stor skillnad mellan NAS-konsumerande möss och de tre kontrollgrupperna. De NAS-konsumerande mössen hade utvecklat en markant glukosintolerans. Av de tre artificiella icke energigivande sötningsmedlen hade sackarin den mest uttalade effekten (7).

1.2.16 Tarmfloran och utveckling av glukosintolerans

Forskarna i den Nature-publicerade studien misstänkte att tarmfloran var en möjlig faktor för resultatet och valde därför att låta möss som konsumerade NAS behandlas

med bredspektrums antibiotika. Under antibiotikabehandlingen fortsatte mössen att inta sitt NAS-innehållande dricksvatten. Efter 4 veckors antibiotikabehandling avtog skillnaderna i glukosintoleransen mellan NAS-konsumerande möss och kontrollgrupp. Dessa resultat tyder på att glukosintoleransutvecklingen till följd av NAS-konsumtion verkar vara kopplad till förändringar i tarmflorasammansättningen (7).

Samma forskargrupp transplanterade avföring från normal-utfodrade möss, som antingen intagit kommersiellt sackarin eller glukos (kontrollgrupp), till normal-utfodrade bakteriefria möss. De mottagande mössen som fått sackarin-gruppens tarmflora visade efter 6 dagar en nedsatt glukostolerans jämfört med kontrollgrupp. Även hos high fat diet (HFD) - utfodrade möss, som genomgått samma experiment, uppstod en nedsatt glukostolerans i sackaringruppen jämfört med kontroll. Resultaten indikerade att sackarin påverkar tarmfloran som i sin tur spelar roll för utveckling av glukosintolerans (7).

För att se om liknande resultat sågs hos människor undersöktes sambandet mellan långvarigt NAS-användande (baserat på validerat kostfrågeformulär) och ett flertal kliniska parametrar som samlats in från en nutritionsstudie med 381 icke-diabetiker (44 % män och 56 % kvinnor i åldrarna 30 till 56 år). En signifikant korrelation sågs bland annat mellan NAS-konsumtion och ökad vikt, ökad midje-höft-kvot, högre blodglukosvärde vid fasta och försämrad glukostolerans. Av deltagarna valdes 172 individer randomiserat ut för analys av tarmflorasammansättning med hjälp av 16S rRNA analys. Här sågs en signifikant positiv korrelation mellan NAS-konsumtion och förekomsten av familjen Enterobacteriaceae, klassen Deltaproteobacteria och fylat Actinobacteria (7).

För att kunna se eventuella samband mellan sackarin-konsumtion, tarmflorasammansättning och blodglukosintolerans hos människor följde forskargruppen ytterligare sju friska volontärer (fem män och två kvinnor i åldern 28–36 år) i en vecka, som inte konsumerade NAS eller livsmedel innehållande NAS. Deltagarna fick under dag 2–7 konsumera FDA:s rekommenderade ADI för kommersiellt sackarin (5 mg per kg kroppsvikt), fördelat på tre doser om dagen. Av deltagarna utvecklade fyra av sju ett signifikant försämrat glykemiskt svar redan efter 5–7 dagar efter sackarin-förbrukning, jämfört med deras glykemiska svar dagarna 1–4. Hos de tre deltagarna som inte fick något försämrat glykemiskt svar, låg glukostoleransen på en och samma nivå. Dessa utvecklade varken förbättrad eller försämrad glukostolerans (7).

Med hjälp av 16S rRNA analys, kunde de sju deltagarnas tarmflorasammansättning studeras. Mellan de individer som påverkades av sackarin-konsumtionen och de som inte påverkades sågs en skillnad i tarmflorasammansättningen både före och efter sackarin-konsumtionen. De individer som utvecklade ett sämre glykemiskt svar fick under veckan en större förändring i sin bakteriesammansättning än de individer som inte påverkades av sackarin-konsumtionen. För att se om förändringarna i tarmfloran spelade roll vid utvecklingen av glukosintolerans, transplanterades avföring från dag 1 och 7 från två sackarin-responderande och två sackarin-icke responderande personer till normal-utfodrade bakteriefria möss. Mössen som fått avföring från dag 7 av sackarin-responderande utvecklade signifikant glukosintolerans jämfört med responsen mössen fick från avföring från dag 1 av samma individer. De möss som fick avföring från dag 7 från de två icke-responderande sackarin-konsumenterna visade ingen utveckling av

glukosintolerans. Mössen som fick tarmflora från sackarin-responderande människor utvecklade en liknande dysbios som de humana respondenterna. Forskargruppen drog därför slutsatsen att NAS-konsumtion ökar risken för glukosintoleransutveckling hos både möss och människor, till följd av sackarin-inducerade förändringar i tarmflorasammansättningen. Deras resultat tyder även på att det förekommer individuella svar på sackarin-konsumtion (7). Forskarnas slutsats om att NAS som grupp skulle ge dessa effekter bör dock noteras eftersom effekterna främst sågs av sötningsmedlet sackarin. Andra NAS bör således studeras innan de inkluderas i denna typ av slutsats.

I en annan studie utförd på män med metabolt syndrom studerades tarmfloras roll för insulinkänslighet. Deltagarna fick lämna in blodprover för insulinkänslighet i början av studien. Sedan fick de genomgå en avföringstransplantation där de antingen fick sin egna avföring tillbakatransplanterad, eller fick ny avföring från friska individer. Efter 6 veckor mättes männens insulinkänslighet igen. De män som fått avföringstransplantation från friska individer utvecklade en kraftig förbättring i insulinkänslighet, jämfört med de som fått sin egna avföring tillbakatransplanterad. Detta visar på tarmfloras roll för utvecklingen av insulinkänslighet (6).

2. Metod

2.1 Medicons sötningsmedelsstudie – studiens upplägg

I en dubbel-blind cross-over studie utförd av Lunds universitet hösten 2015, på Centrum för preventiv livsmedelsforskning, ville Docent Anne Nilsson undersöka hur olika sötningsmedel påverkar tarmfloran, riskvariabler för typ 2-diabetes respektive hjärt-kärlsjukdom.

I studien deltog 39 friska individer i åldrarna 40–70 år, där deltagarnas BMI var 19–28 kg/m². Dessutom sattes en lägsta viktgräns på 55 kg. Inga individer med för höga blodsockervärden, metabola störningar (ex. diabetes), mag-tarm-problem (inklusive glutenintolerans och laktosintolerans) eller andra sjukdomar som kunde påverka studieresultatet fick delta. Inte heller rökare eller snusare fick delta. Varken under studien eller under en fyra veckors period före studien fick antibiotika eller probiotika användas. Krav på deltagarnas kostvanor var en icke-vegetarisk kost, som följer de nordiska näringsrekommendationerna. Under studiens gång fick deltagarna instruktion om att inte förändra sina kost eller motionsvanor.

Totalt undersöktes tre typer av sötningsmedel, här kallade: Sötningsmedel A, sötningsmedel B och sötningsmedel C. Deltagarna fick lämna avföringsprover innan studiestart (baseline, grupp 0) och därefter lämnades nya avföringsprover efter varje 2-veckors testperiod (14 dagar) där de fått dricka en ny typ av sötningsmedel. Perioderna kallades för grupp A, B och C för de tre olika sötningsmedlen. Minst 2–3 veckor skulle gå mellan varje testperiod med sötningsmedel. Under testperioderna intogs sötningsmedel i form av måltidsdryck. Sammanlagda mängden dryck var 1 liter per dag, fördelar på 5 förpackningar á 200 ml. Sötningsmängden i de olika sötningsdryckerna motsvarade två burkar Coca-cola á 330 ml om dagen. Mängden sötningsmedel som användes låg väl under ADI.

Deltagarna lämnade ett avföringsprov efter varje testperiod. Efter varje testperiod togs även blodprov på riskvariabler för typ 2-diabetes och hjärt-kärlsjukdomar, så som glukos och insulin-bestämning före och efter intag av en standardiserad frukost (bestående av vatten och bröd). Dessutom togs ett venöst blodprov á 50 ml morgonen efter varje sötningsmedels testperiod, för analys av riskvariabler. Här analyserades bland annat inflammationsmarkörer (CRP och IL-6), aptitreglerande hormon, kolesterol och fria fettsyror.

Studien är godkänd av etiknämnden.

2.2 Detta arbetes upplägg

Från sötningsmedelstudien valdes slumpmässigt avföringsprover från 13 individer, varav 7 män och 6 kvinnor, ut för analys. Försökspersonernas åldrar låg mellan 44 och 70 år. Totalt analyserades 52 avföringsprover, 4 avföringsprover från varje individ, från grupperna 0, A, B, C. De färskt avföringsproverna förvarades i frys (- 40 °C) fram tills användning/analys. I detta arbete studeras de taxonomiska nivåerna fyla, ordning, familj, och släkte (genus).

2.3 Laboration

2.3.1 DNA-Extrahering

Från de frusna avföringsproverna extraherades DNA. Till hjälp användes QIAamp DNA Stool Mini Kit 50 från QIAGEN enligt medföljande instruktionsbok (31), men med

vissa modifikationer. Utöver innehållet i DNA Stool Mini Kit 50 användes även små glaspärlor från VWR (32) i provrören för att lättare finfördela avföringspartiklarna och bakteriernas cellväggar. Dessutom skedde första upphettningen av proven på 95 °C istället för 70 °C, för att få en högre DNA-koncentration i de färdiga proven. Utöver DNA-extraheringen från avföringsproverna utfördes två negativa kontroller för att upptäcka eventuell kontaminering.

2.3.2 Mätning av DNA-koncentration

Alla extraherade provs DNA-koncentration mättes med hjälp av Qubit® Fluorometer 2.0 från Invitrogen™ enligt medföljande instruktionsbok (33). Till koncentrationsmätningen användes Qubit® dsDNA HS Assay Kit (34), och Qubit® Assay Tubes (35). De färdiga proverna förvarades sedan tillsammans i en frys, vid -23 °C.

2.3.3 DNA-utspädning

Alla prover spädades ut med EB-buffert (36) till en DNA-koncentration med ett riktvärde på 5 ng/µl. Prover mellan 1,7–7,53 ng/µl tilläts då detta intervall i tidigare analyser av avföringsprover visat sig fungera. De utspädda provernas koncentration mättes och kontrollerades med Qubit® Fluorometer 2.0 från Invitrogen™. Från de utspädda proverna användes 2,5 µl av varje prov för Amplicon PCR.

2.3.4 Biblioteksförberedning: Amplicon PCR, Gelelektrofores och Index PCR

De utspädda proverna förbereddes (biblioteksförberedning) sedan för DNA-sekvensering av 16S rRNA region V4 med hjälp av ett antal delmoment, se nedan. Alla steg under biblioteksförberedning förutom gelelektroforesen och MiSeq-förberedningen utfördes enligt Illuminas Library Preparation Workflow (25).

2.3.5 Amplicon PCR

Amplicon PCR utfördes enligt instruktionerna i Illuminas Library Preparation Workflow (25) för att få ut ett stort antal kopior av region V4 i 16S rRNA genen. 2,5 µl av varje prov överfördes till en 96 well-PCR-platta (37). Sedan tillsattes 5 µl av Amplicon 16S V4 PCR Forward Primer (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA), 5 µl Amplicon 16S V4 PCR Reverse Primer (TAATCTWTGGGVHCAATCAGG) som specialbeställts från Sigma-Aldrich (38) och 12,5 µl av KAPA HiFi HotStart Ready Mix (39) till varje 2,5 µl prov. Proverna kördes sedan i PCR (40) enligt följande cykler:

- * 95 °C i 3 min.
- * 25 cykler av:
 - 95 °C i 30 sekunder.
 - 55 °C i 30 sekunder.
 - 72 °C i 30 sekunder.
- * 72 °C i 5 min.
- * Förvaring av proverna vid 4 °C fram tills PCR 1 Clean up.

2.3.6 PCR 1 Clean up

PCR 1 Clean up utfördes efter Amplicon PCR för att få ut ren produkt av PCR-produkten. Instruktionerna från Illuminas Library Preparation Workflow (25) följdes. Magnetiska Agencourt® AMPure® XP pärlor (41) användes i detta steg för att binda upp 16S V4 rRNA mot ett magnetställ. Övrigt DNA avlägsnades från provet enligt protokollet. Den uppboundna PCR-produkten lösgjordes sedan till provrören.

Sist flyttades 40 µl av proverna innehållande 16S V4 rRNA till nya provrör och förvarades i frys (-25 °C) fram tills Index PCR. Utöver detta togs dessutom 4 µl av 16S V4 rRNA proverna till separata provrör, för användning i gelelektrofores. Dessa förvarades i frys (-25 °C) fram tills gelelektrofores.

2.3.7 Gelelektrofores

Gelelektroforesen utfördes utöver Illuminas Library Preparation Workflow och gjordes för att kontrollera om tillräcklig mängd av 16S V4 rRNA fanns närvarande i proverna och för att se om kontamination skett. För gelelektroforesen användes elektroforessystemet KuroGEL (42) med VWRs elektroforesströmförsörjning (43).

1. Proverna för gelelektroforesen togs fram ur frysen för att tinas.
2. 200 ml agarosgel förberedes genom att 200 ml av 1X Tri-acetat-EDTA (TAE) buffert (utspädd 50X TAE buffert (44)) + 2,0 g pulver Agaros I (45) fick smälta i mikrovågsugn, för att sen röras om. Sedan tillsattes 20 µl av SYBR® Safe DNA Gel Stain (46) för att möjliggöra visualisering av DNA i senare steg.
3. Gelplattan förbereddes med kammar, och tejpades för att kunna hålla den flytande gelen på plats i plattan. Elektroforesen förberedes genom att 1X TAE buffert hälldes i elektroforesen, så att bufferten nådde upp till max-gränsen.
4. Gelplattan fylldes med 25 ml gel och förvarades i kylan i 20 minuter.
5. När gelen stelnat drogs tejp av och kammarna ut ur gelen. Gelplattan placerades sedan i elektroforesen, så att hålen som bildats i gelen av kammarna fylldes med 1X TAE bufferten från elektroforesen.
6. Proverna förbereddes genom att 1 µl Blue Juice Gel Loading Buffer (47) (utspädd till 1X) tillsattes till vardera 4 µl prov som sparats från PCR 1 Clean up. Dessutom förberedes två stycken 50 bp DNA ladder från Invitrogen™ (48) (utspädd till 20X) på samma sätt för varje gelplatta som kördes.
7. Gelplattan plockades upp från elektroforesen. Ett prov åt gången placerades i gelplattan. Även en DNA ladder placerades ut på varje kam-rad som storleksmarkör.
8. Gelplattan med proverna placerades åter igen i elektroforesen som kopplades till strömförsörjning, inställd på 90 V, 0,07 A i 30 minuter.
9. När elektroforesen gått klart plockades gelplattan med proverna ut och placerades i Azure biosystem c150 (49) för fotografering. Bilderna sparades.

2.3.7.1 Gelelektrofores, stickprov

Efter Amplicon PCR och PCR 1 Clean up var rekommendationen att proverna skulle förvaras i frysen (-18 °C) i högst 1 vecka. På grund av tekniska problem låg proverna i frysen 2 veckor. För att kontrollera om proverna fortfarande gick att använda, gjordes gelelektrofores på 8 slumpmässigt utvalda prover, varav ett var negativt. Samma metod och produkter användes som beskriver ovan (se rubrik 2.3.7 Gelelektrofores).

2.3.8 Index PCR

Proverna från PCR 1 Clean up tinades och användes för Index PCR enligt instruktionerna från Illuminas Library Preparation Workflow (25) för att få Index primers att fästa till DNAt i respektive provrör. Här användes KAPA HiFi HotStart Ready Mix (39), Nextera® XT Index Kit primers (50), och Truseq Index Plate Fixture (51). Sedan flyttades 5 µl från varje prov från PCR 1 Clean up till en ny 96-well platta (37). Index-primers placerades i provrören enligt protokollet och kördes sedan i PCR (40) enligt följande:

- * 95 °C i 3 min.
- * 8 cykler av:
 - 95 °C i 30 sekunder.
 - 55 °C i 30 sekunder.
 - 72 °C i 30 sekunder.
- * 72 °C i 5 min.
- * Förvaring av proverna på 4 °C fram tills PCR 2 Clean up.

2.3.9 PCR 2 Clean up

Proverna från Index PCR hanterades enligt instruktionerna från Illuminas Library Preparation Workflow (25). Likt PCR 1 Clean up användes i detta steg Magnetiska Agencourt® AMPure® XP pärlor (41) och ett magnetställ för att binda upp 16S V4 rRNA. Resterande produkter från Index PCR avlägsnades.

2.3.10 DNA-koncentration mätning och DNA-utspädning

Alla provers koncentration mättes efter PCR 2 Clean up med hjälp av Qubit® Fluorometer 2.0 från Invitrogen™ enligt medföljande instruktionsbok (33). Till koncentrationsmätningen användes Qubit® dsDNA HS Assay Kit (34), och Qubit® Assay Tubes (35). Sedan spädades de ut till ett riktmått på 1,2 ng/μl med EB-buffert (36). Koncentrationen kontrollmättes sedan igen enligt ovan.

2.3.11 Förberedning av gemensamt biblioteksprov

Från prover med koncentrationen 1,00–1,6 ng/μl efter spädning använde 5 μl i detta steg. Från prover med högre koncentration än 1,6 ng/μl efter spädning användes endast 4 μl och från prover med koncentration lägre än 1,0 ng/μl men över 0,95 ng/μl användes 6 μl.

4–6 μl av varje prov flyttades över till ett gemensamt biblioteksprovrör.

Koncentrationen i det nya gemensamma provrör mättes sedan med hjälp av Qubit® Fluorometer 2.0 från Invitrogen™ enligt medföljande instruktionsbok (33). Till koncentrationsmätningen användes Qubit® dsDNA HS Assay Kit (34), och Qubit® Assay Tubes (35).

2.3.12 MiSeq förberedning

I detta steg utfördes de sista förberedelserna innan det slutgiltiga provet placerades i Illumina MiSeq (52) för DNA-sekvensering. Först denaturerades DNA:t genom att 5 μl NaOH (53) och 5 μl från biblioteksprovet blandades och inkuberades i rumstemperatur i 5 minuter. Sedan tillsattes 990 μl HT1 buffert från Miseq® v2 Reagent Kit (500 cycles) (54). Biblioteksprovet spädades sedan till en koncentration på 8 pM genom att 240 μl av det denaturerade provet blandades med 360 μl HT1 buffert.

Dessutom förberedes en PhiX kontroll till maskinen genom att 5 μl PhiX Control v3 (55) blandades med 5 μl NaOH (53) och inkuberades 5 minuter i rumstemperatur innan 990 μl HT1 buffert tillsattes. 375 μl av PhiX kontrollen blandades med 225 μl HT1 buffert för att få en koncentration på 12,5 pM.

Till slut blandades 560 μl av biblioteksprovet (8 pM) och 40 μl PhiX kontroll (12,5 pM) för att sedan upphettas till 96 °C i 2 minuter. Det slutgiltiga provet förvarades sedan på is i 5 minuter innan det placerades i MiSeq enligt instruktionerna för Miseq® v2 Reagent Kit (500 cycles) (56).

2.4 Bioinformatik, QIIME

För att behandla data från Illumina DNA-sekvensering användes programvaran QIIME som använder sig av obehandlad dna-sekvenserings data för att skapa material att analysera (57). Med hjälp av QIIME kopplades DNA-sekvenserna från proverna ihop med rätt försöksperson och sötningsmedelsgrupp.

2.5 Statistisk analys

Data från QIIME analyserades i Microsoft Excel. Statistisk signifikans testades med hjälp av parat T.TEST. Signifikansvärdet sattes till ($P \leq 0,05$). Trendvärde sattes till P-värde mellan 0,06–0,08.

2.6 Litteratursökning

Linnéuniversitetets databas OneSearch användes för litteratursökning på bakterietaxa relevanta för arbetet. Sökord som användes: *Microbiota, Health, Disease, Colorectal Cancer, Stool microbiome*, mm.

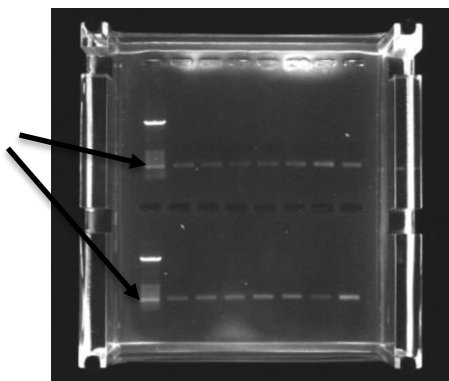
3. Resultat

3.1 DNA-koncentration omgång 1 efter DNA-extrahering

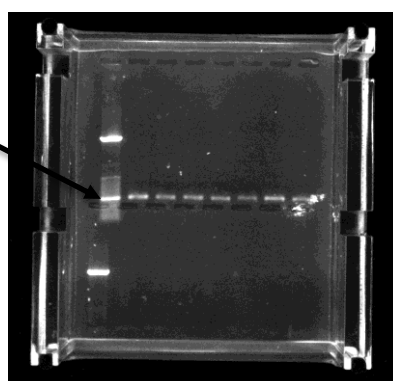
Efter extrahering av DNA från avföringsproverna låg koncentrationen på proverna mellan 1,7 ng/μl och 51 ng/μl. Efter utspädningen inför Amplicon PCR låg DNA-koncentrationen i proverna mellan 1,7 ng/μl och 7,53 ng/μl. På prover med en koncentration på eller lägre än 3,06 ng/μl gjordes det dubbla provexemplar som båda kördes genom hela projektet. Detta gällde för 4 stycken prover, nr. 6, 8, 9, och 14.

3.2 Gelelektrofores

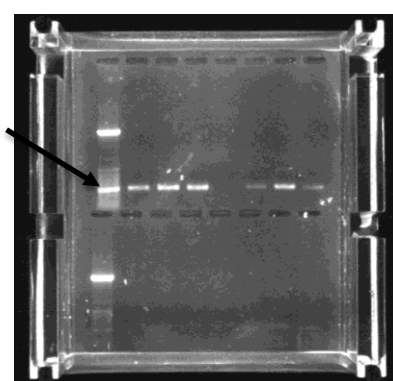
Efter Amplicon PCR och PCR 1 Clean Up genomgick alla prover gelelektrofores (Fig. 1–5) Totalt kördes 52 prover för projektet. Av dessa gick 7 stycken ej att avläsa från elektroforesen (Fig. 3; gelplatta 3 där nedre raden utgick). Negativa kontroller visade ingen form av kontamination (Fig. 3 och 5; se luckorna i gelplatta 3 och 5).



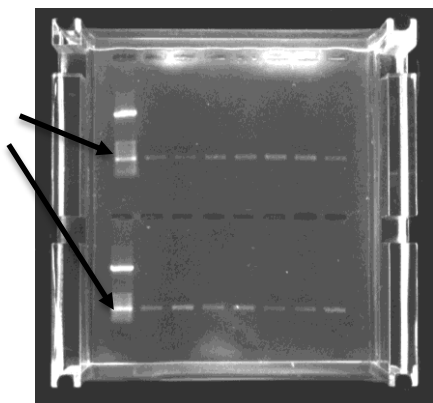
Figur 1. Gelplatta 1, 14 st projektprover. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).



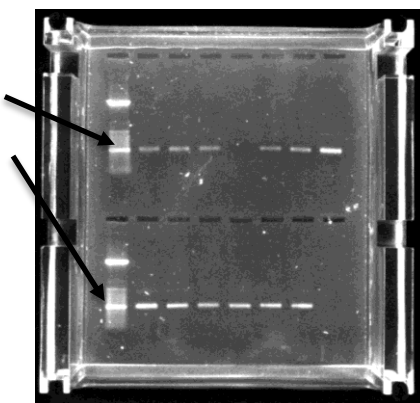
Figur 2. Gelplatta 2, 7 st projektprover. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).



Figur 3. Gelplatta 3, 14 st projektprover, varav 1 st negativ kontroll. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).



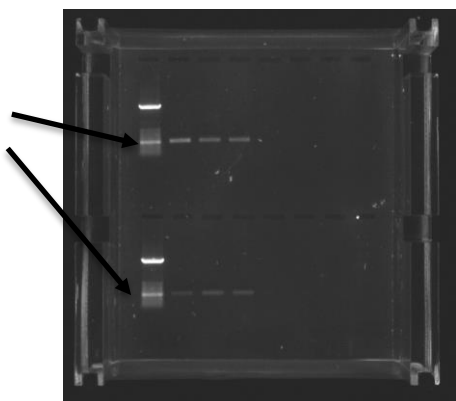
Figur 4. Gelplatta 4, 14 st projektprover. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).



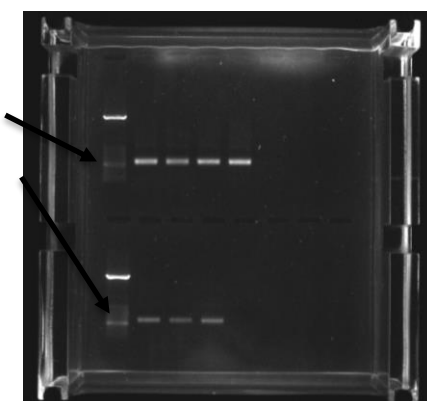
Figur 5. Gelplatta 5, 10 st projektprover, varav 1 st negativ kontroll. Ytterligare 3 st prover för annat projekt syns på bilden. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).

3.2.1 Gelelektrofores, stickprov

De 6 + 8 slumpvis utvalda stickproverna (Fig. 6 och 7) visade att det fanns tillräcklig och användbar PCR-produkt. Den negativa kontrollen var fri från kontamination (Fig. 7; se gelplatta 7 längst ner).



Figur 6. Gelplatta 6, 6 st projektprov. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region V4).



Figur 7. Gelplatta 7, 8 st projektprov varav 1st negativ kontroll. Svarta pilar pekar på markering för 300 bp (region

3.3 DNA-koncentrationsmätning

Efter Index PCR och PCR 2 Clean up utgick prov nr. 36 från fortsatt användning i projektet på grund av för låg koncentration av DNA (555 ng/ml). Resterande prover hade en DNA-koncentrationen mellan 4,87 ng/μl och 35,1 ng/μl. Efter spädning låg koncentrationen på proverna mellan 0,983 ng/μl och 1,76 ng/μl.

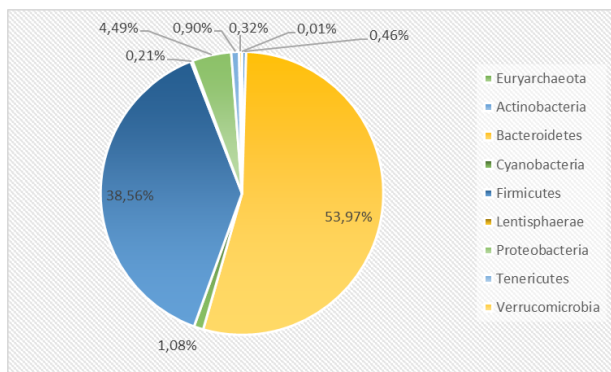
3.4 Förberedning av gemensamt biblioteksprov

Två stycken prover, nr. 2 och 12, hade en koncentration lägre än 1,0 ng/μl. Från dessa användes 6 μl från vardera prov till det gemensamma biblioteksprovet. Endast ett prov, nr. 54, hade en koncentration över 1,6 ng/μl. Från detta prov användes 4 μl till det gemensamma biblioteksprovet. Resterande prover hade en koncentration mellan 1,00–1,6 ng/μl. Från dessa användes 5 μl från vardera prov till det gemensamma biblioteksprovet.

3.5 Analys av provresultat

3.5.1 Total bakteriesammansättning, Fyla

Den genomsnittliga bakteriesammansättningen för alla individer och alla grupper visade på störst dominans av fyla Bacteroidetes och Firmicutes (Fig. 8 och tabell 1).



Figur 8. Genomsnittliga bakteriesammansättningen, fyla, för alla individer, alla grupper.

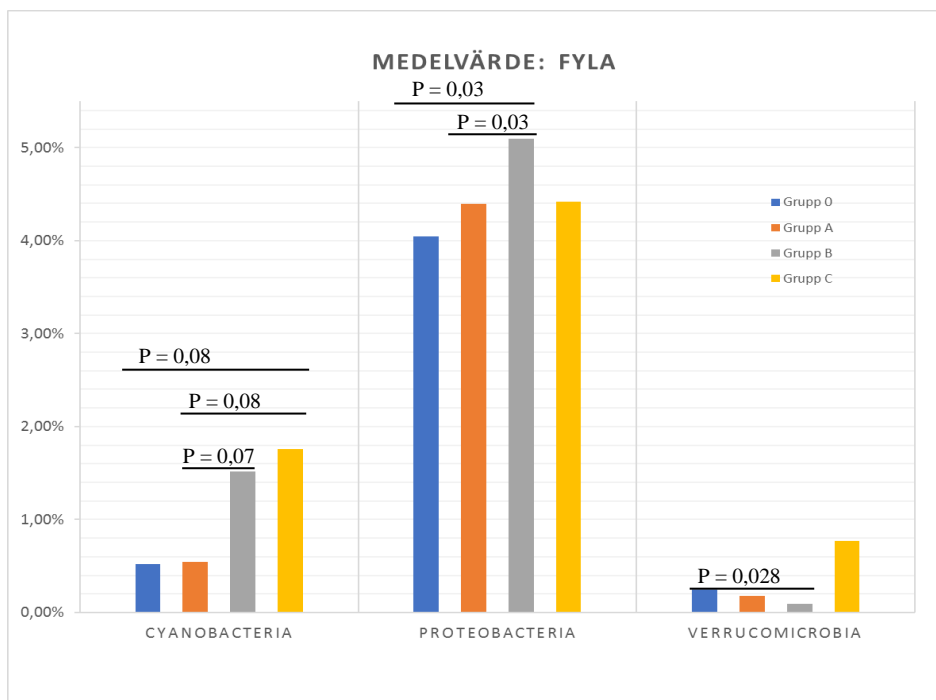
Tabell 1. Genomsnittliga bakteriesammansättningen, fyla för alla individer, alla grupper.

Euryarchaeota:	0,01 %
Actinobacteria:	0,46 %
Bacteroidetes:	53,96 %
Cyanobacteria:	1,08 %
Firmicutes:	38,58 %
Lentisphaerae:	0,21 %
Proteobacteria:	4,48 %
Tenericutes:	0,90 %
Verrucomicrobia:	0,33 %

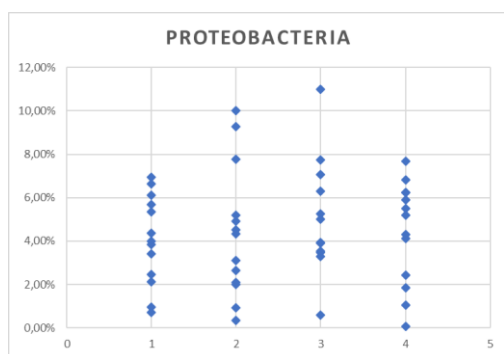
3.5.2 Analys på fylum-nivå

Mellan grupp 0 och grupp B sågs en signifikant ökning ($P = 0,03$) av Proteobacteria och en signifikant minskning ($P = 0,028$) av Verrucomicrobia (Fig. 9). Mellan grupp A och B sågs en signifikant ökning ($P = 0,03$) av Proteobacteria (Fig. 9).

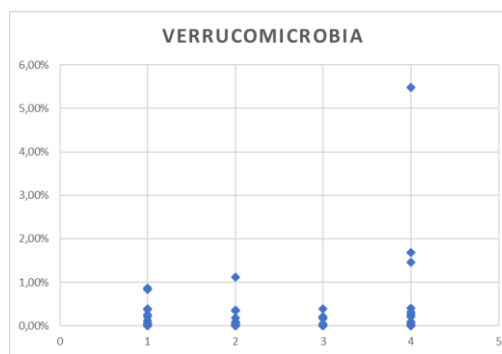
Trendmässigt sågs det en skillnad hos fylat Cyanobacteria, mellan grupperna 0–C ($P = 0,08$), A–B ($P = 0,07$), och A–C ($P = 0,08$) (Fig. 9)



Figur 9. Medelvärde för fylat Cyanobacteria, Proteobacteria och Verrucomicrobia med markerade P-värden.



Figur 10. Fördelning av individuella svar i fylat Proteobacteria. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

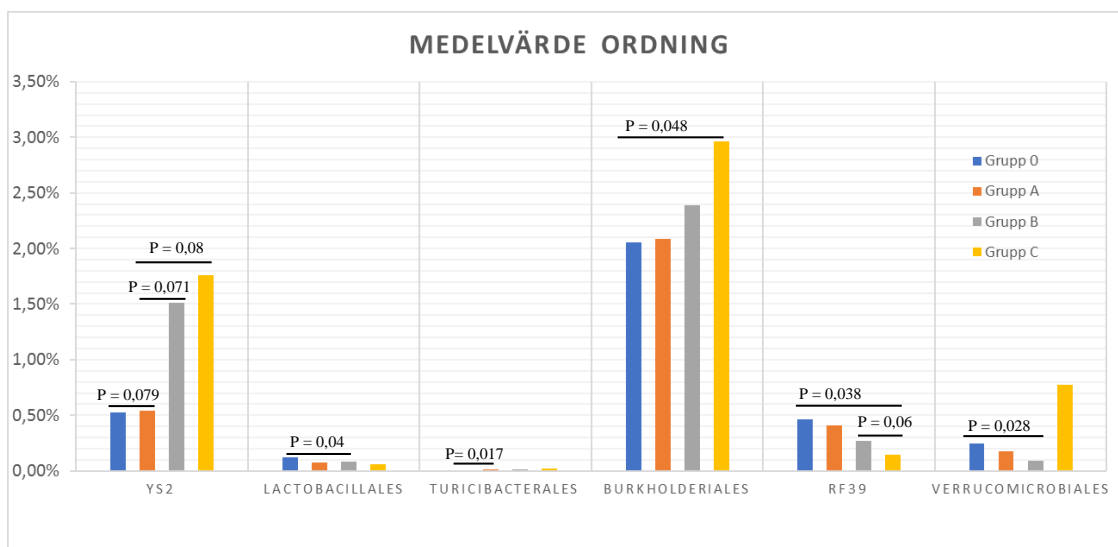


Figur 11. Fördelning av individuella svar i fylat Verrucomicrobia. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

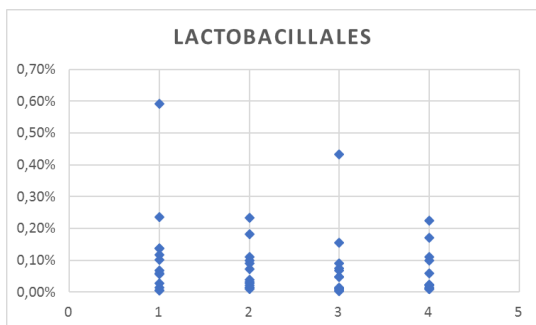
3.5.3 Analys på ordnings-nivå

Vid analys av ordning sågs en signifikant ökning mellan grupp 0 och grupp A gällande *Turicibacterales* ($P = 0,017$) (Fig. 12). Mellan grupp 0 och B sågs en signifikant minskning av *Lactobacillales* ($P = 0,040$) och *Verrucomicrobiales* ($P = 0,028$) (Fig.12). Mellan grupp 0 och C sågs fanns en signifikant ökning av *Burkholderiales* ($P = 0,048$) och en signifikant minskning av *RF39* ($P = 0,038$) (Fig. 12).

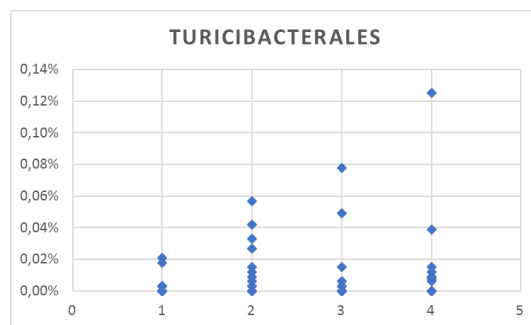
Trendmässigt sågs en skillnad hos ordning *YS2* mellan grupp 0–A ($P = 0,079$), A–B ($P = 0,071$) och A–C ($P = 0,08$) (Fig 12). En trend sågs även mellan grupperna B–C gällande *RF39* ($P = 0,06$) (Fig 12).



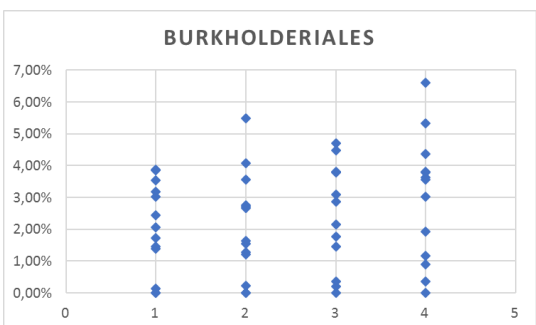
Figur 12. Medelvärde i procent för ordning *YS2*, *Lactobacillales*, *Turicibacterales*, *Burkholderiales*, *RF39* och *Verrucomicrobiales*, med markerade P-värden.



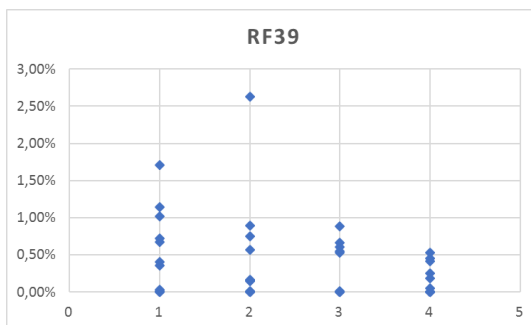
Figur 13. Fördelning av individuella svar i ordningen *Lactobacillales*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



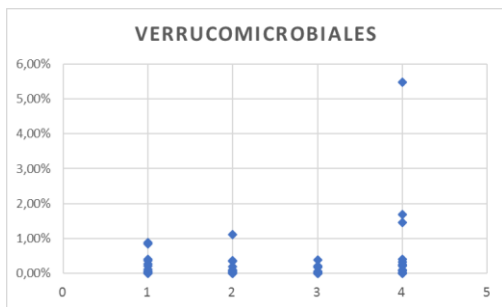
Figur 14. Fördelning av individuella svar i ordningen *Turicibacterales*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



Figur 15. Fördelning av individuella svar i ordningen *Burkholderiales*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



Figur 16. Fördelning av individuella svar i ordningen *RF39*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

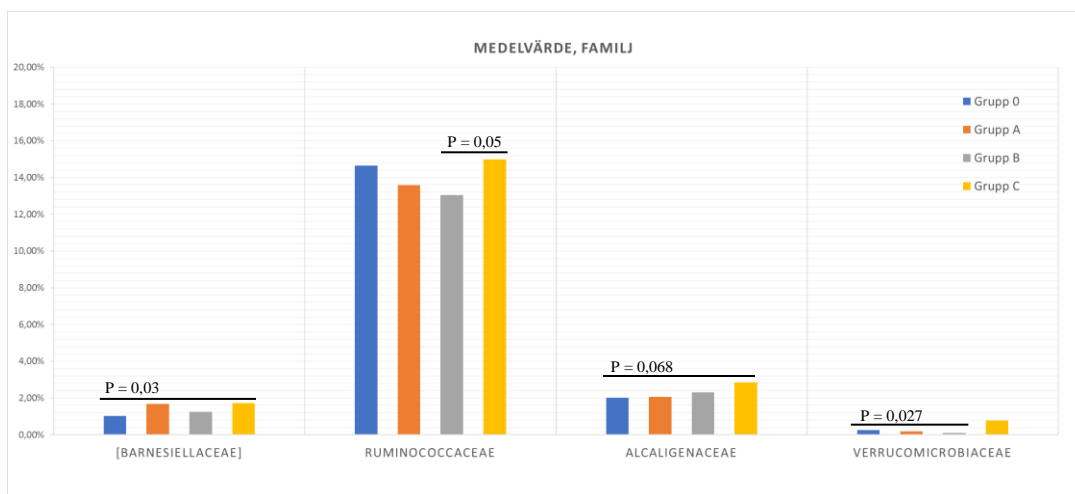


Figur 17. Fördelning av individuella svar i ordningen *Verrucomicrobiales*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

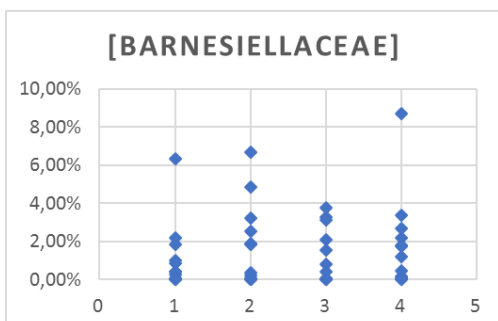
3.5.4 Analys på familje-nivå

I familje-nivån sågs en signifikant minskning av *Verrucomicrobiaceae* mellan grupp 0 och grupp B ($P = 0,027$) (Fig. 18). Även en signifikant ökning sågs mellan grupp B och C gällande *Ruminococcaceae* ($P = 0,05$) (Fig. 18). Signifikant skillnad sågs även mellan grupp 0 och C gällande [*Barnesiellaceae*], som ökat för grupp C ($P = 0,03$) (Fig. 18).

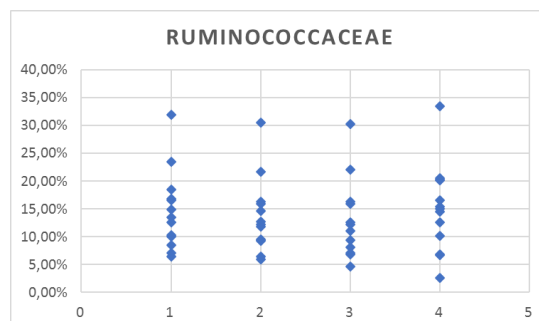
En trend sågs mellan grupp 0 och C gällande *Alcaligenaceae*, som verkade öka i grupp C ($P = 0,068$) (Fig. 18).



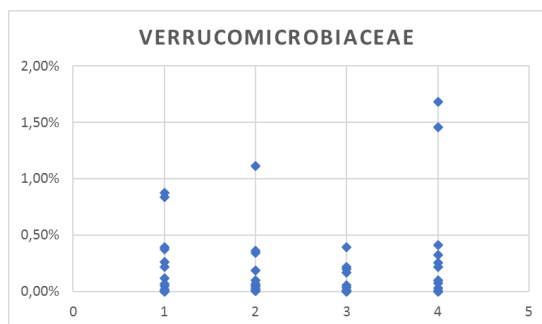
Figur 18. Medelvärde i procent för familjerna [*Barnesiellaceae*], *Ruminococcaceae*, *Alcaligenaceae* och *Verrucomicrobiaceae*, med markerade P-värden.



Figur 19. Fördelning av individuella svar i familjen [*Barnesiellaceae*]. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



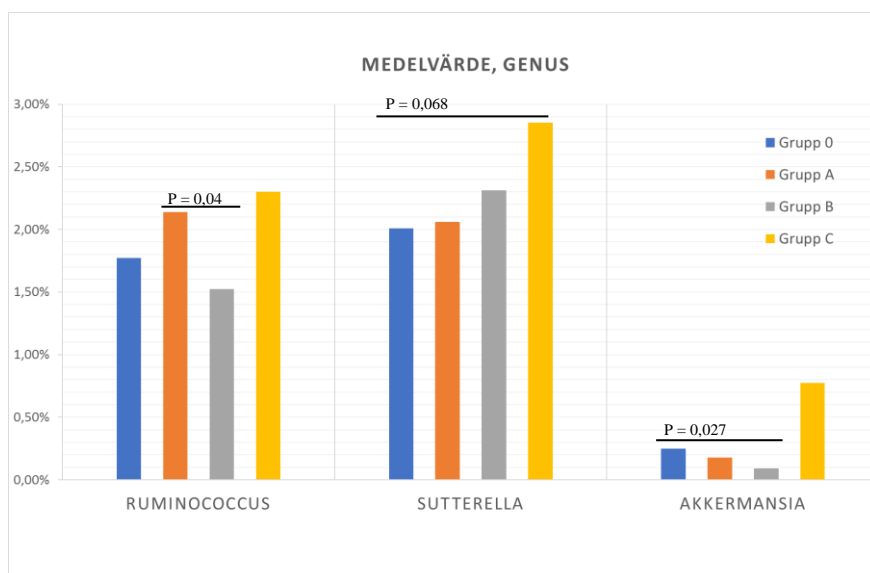
Figur 20. Fördelning av individuella svar i familjen *Ruminococcaceae*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



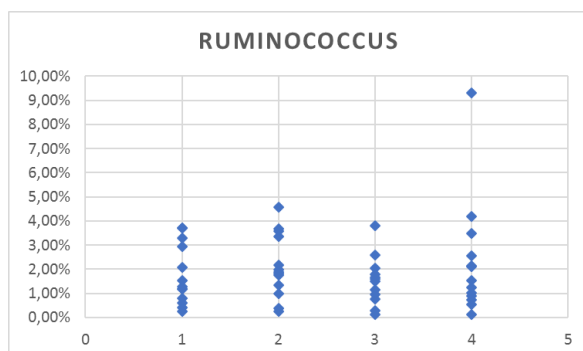
Figur 21. Fördelning av individuella svar i familjen *Verrucomicrobiaceae*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

3.5.5 Analys på släktes-nivå (genus)

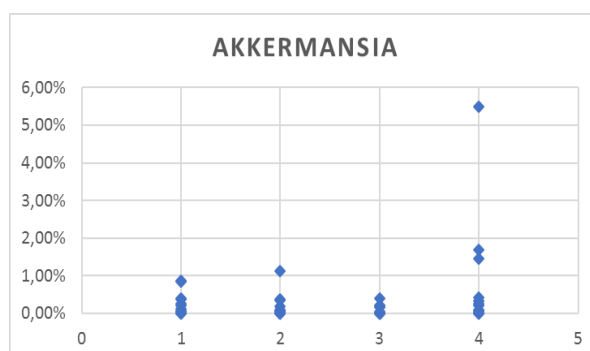
Mellan grupp A och grupp B sågs en signifikant minskning av *Ruminococcus* ($P = 0,04$) (Fig. 22). Mellan grupp 0 och grupp B sågs en signifikant minskning av *Akkermansia* ($P = 0,027$) (Fig.22). Trendmässigt sågs en skillnad mellan grupp 0 och grupp C där *Sutterella* ökade ($P = 0,068$) (Fig.22).



Figur 22. Medelvärde i procent för genus *Ruminococcus*, *Sutterella* och *Akkermansia*, med markerade P-värden.



Figur 23. Fördelning av individuella svar i genuset *Ruminococcus*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.



Figur 24. Fördelningen av individuella svar i genuset *Akkermansia*. 1 = grupp 0, 2 = grupp A, 3 = grupp B, och 4 = grupp C.

4. Diskussion

4.1 Examensarbetet, ett stickprov

Det är viktigt att notera att detta examensarbete endast innefattar 13 stycken av de 39 försökspersoner som deltog, vilket innebär att de slutgiltiga resultaten för sötningsmedelsstudien, vid skrivandet av detta arbete, ännu inte är färdigställt. Både de signifikanta och trendmässiga resultaten i detta examensarbete är således endast ett stickprov som kan ge en uppfattning om studiens slutgiltiga resultat.

4.2 Jämförelse med Nature-artikeln

Nature-artikeln ”Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota” visade att sackarin påverkade bland annat Actinobacteria, Firmicutes, *Clostridiales*, *Enterobacteriaceae*, och *Bacteroides* (7).

Sötningsmedlen i detta arbete är okända och är därför inte nödvändigtvis jämförbara med resultaten i artikeln gällande sackarin.

I denna studie sågs inga signifikanta skillnader inom fylat Actinobacteria, familjen *Enterobacteriaceae* eller genuset *Bacteroides*. Däremot sågs signifikanta förändringar inom fyla Proteobacteria och Verrucomicrobia, ordning *Turicibacteriales*, *Lactobacillales*, *Verrucomicrobiales*, *Burkholderiales* och *RF39*, familjerna *Ruminococcaceae* (fylat Firmicutes), *Verrucomicrobiaceae* och [*Barnesiellaceae*], och genus *Ruminococcus* (ordning *Clostridiales*) och *Akkermansia*. Dessutom sågs trender för fylat Cyanobacteria, ordning *YS2* och *RF39*, familjen *Alcaligenaceae*, och genuset *Sutterella*.

Resultaten i den här studien visar således på att sötningsmedlen A, B och C påverkar sammansättningen av tarmfloran.

4.3 Kopplingar till hälsa

Att sötningsmedlen A, B och C visat sig kunna påverka sammansättningen av tarmfloran kan verka dramatiskt. Dock bör det noteras att förändringarna i många fall var små, och att eventuella konsekvenser av detta är svåra att fastställa. Dock finns det en del forskning på området som skulle kunna ge en uppfattning om hur de konstaterade förändringarna skulle kunna påverka individens hälsa.

4.3.1 Proteobacteria

Sötningsmedlet i grupp B gav en signifikant ökning av Proteobacteria jämfört med grupp 0 och grupp A. Fylat Proteobacteria har i studier visat en positiv korrelation med de pro-inflammatoriska cytokinerna IL-6 och IL-8 (27), vilket i så fall skulle kunna innebära att sötningsmedlet i grupp B skulle kunna öka inflammation i kroppen. Till fylat Proteobacteria och ordningen *Burkholderiales* tillhör bland annat genuset *Sutterella*. (58). I detta examensarbete sågs dock inga signifikanta skillnader mellan grupp 0 och grupp B gällande *Sutterella*, vilket tyder på att det är andra bakterier än de i *Sutterella* som ökat i grupp B. Istället sågs en trendmässig ökning hos grupp C för *Sutterella* jämfört med grupp 0. En del studier har visat på att genuset *Sutterella* associerats till autismspektrumstörningar (ASD), vilket oftast innebär individuella svårigheter kring kommunikation och sociala beteenden (28).

Det är svårt att säga vilka bakterier inom fylat Proteobacteria som påverkats då det finns otroligt många. Men att det skett en förändring öppnar upp för tankar om att det skulle

kunna påverka värdens hälsa. Vilka hälsoeffekter är dock svårt att veta utan att veta vilka bakterier och i vilken grad som de påverkats.

4.3.2 Verrucomicrobia

Resultaten visade på en signifikant minskning av fylat Verrucomicrobia i grupp B jämfört med grupp 0. Här var det genuset *Akkermansia* som skapade den signifikanta minskningen. Till detta genus tillhör arten *Akkermansia muciniphila*, som verkar kunna påverka vår hälsa. Arten bryter ned glykoproteinet mucin som är en viktig komponent i tarmens slemhinna (mucus) (20). Arten finns i lägre antal hos individer med inflammatoriska tarmsjukdomar (59) och fetma (60). Dessutom har *Akkermansia muciniphila* i studier på möss visat sig förbättra glukostoleransen. Arten verkar dessutom kunna påverka immunförsvaret genom bland annat öka förekomsten av cytokinerna IL-6 och IL-8 (60). Men arten har inte bara hälso-positiva kopplingar utan har i andra studier visat sig vara överrepresenterad hos patienter med tjocktarmscancer (20, 61). Dock har patienter med tjocktarmscancer ofta överuttryck av mucin vilket motsäger att arten skulle vara orsaken i sambandet (61). Med tanke på *Akkermansia muciniphilas* eventuella hälsoeffekter, skulle sötningsmedlet i grupp B i denna studie kunna påverka värdens hälsa, möjligen på ett negativt sätt.

4.3.3 Lactobacillales

Ordningen *Lactobacillales* tillhör fylat Firmicutes. Hit hör genuset *Lactobacillus* med många olika arter, så som *Lactobacillus acidophilus*, och *Lactobacillus plantarum* (62). Vissa studier har visat att genuset *Lactobacillus* kan producera antifungala substanser. En av de arter som verkar producera sådana substanser är *Lactobacillus plantarum* (63). I denna studie sågs en signifikant minskning av ordningen *Lactobacillales* mellan grupp 0 och grupp B. Om sötningsmedlet som användes i grupp B kan ge upphov till minskning av antalet *Lactobacillales* skulle detta kunna innebära hälsoeffekter med tanke på att ordningen *Lactobacillales* innefattar arter med studerade effekter på hälsan.

4.3.4 Turibacterales och RF39

Angående ordningarna *Turibacterales* och *RF39* sågs signifikanta skillnader mellan grupp 0 och A för *Turibacterales* och 0 och C för *RF39*. Dock var skillnaden mellan *Turibacterales* väldigt liten, från ett medelvärde på 0,00 % till 0,02%, vilket troligen inte har några större effekter på värden. För ordningen *RF39* sågs en minskning i grupp C jämfört med grupp 0, från 0,47% till 0,14%, vilket inte heller är några stora förändringar. Dessutom finns få studier på *RF39*, vilket gör det svårt att diskutera eventuella effekter.

4.3.5 Ruminococcaceae och Ruminococcus

Genuset *Ruminococcus* tillhör fylat Firmicutes, ordningen *Clostridiales*, och familjen *Ruminococcaceae* (64). I denna studien sågs en signifikant ökning av *Ruminococcaceae* mellan grupp B och grupp C och en signifikant minskning mellan grupp A och grupp B gällande *Ruminococcus*. Grupp B hade alltså en lägre förekomst av *Ruminococcaceae* än grupp C och en lägre förekomst av *Ruminococcus* är grupp A.

I tvillingstudier har det visat sig att patienter med ulcerös colit har lägre procentuell förekomst av familjen *Ruminococcaceae* jämfört med sina friska tvillingar (20). Detta skulle kunna innebära att sötningsmedlet i grupp B kan ge negativa konsekvenser på värdens hälsa.

Till genuset *Ruminococcus* tillhör flera olika arter som kan påverka världens hälsa. Bland annat har *Ruminococcus callidus*, vid ökad förekomst, ha en koppling till uppblåsthet och smärta i mag-tarm-området. Patienter med Chrons sjukdom har i studier setts sig ha en ökad förekomst av *Ruminococcus gnavus*. *Ruminococcus lactaris* har däremot visat sig finnas i lägre antal hos personer med smärtproblematik kring mag-tarm-kanalen (20). Då denna studien inte går ner på art-nivå är det svårt att säga vilka effekter sötningsmedlen skulle kunna ha. Men med tanke på förändringarna, främst de låga nivåerna av *Ruminococcus* i grupp B, skulle detta absolut kunna påverka hälsan.

4.3.6 [Barnesiellaceae]

Signifikant ökning sågs mellan grupp 0 och C gällande [Barnesiellaceae]. I en studie på patienter med primär skleroserande kolangit (PSC), en kronisk leversjukdom med inflammation i lever och gallgångar, undersöktes patienternas tarmflora. Forskarna i studien såg att signifikant ökning av familjen *Barnesiellaceae* i prover hos patienter med PSC jämfört med friska kontroller. Forskarna såg att medelvärdet av *Barnesiellaceae* var 1,3 % hos sjuka patienter och 0,16 % hos friska (65). I vår studie var medelvärdet för [Barnesiellaceae] i grupp 0 1,03% och i grupp C 1,73%. Medelvärdet i grupp C låg över det medelvärde som setts hos de sjuka PCS-patienterna. Dock låg även medelvärdet vid baseline (grupp 0) högt jämfört med friska patienter i PCS-studien. Att sötningsmedlet i grupp C ökar halten av [Barnesiellaceae] skulle kunna ha inverkan på individens hälsa.

Noteras bör dock att [Barnesiellaceae] i denna studien står i klamrar, vilket innebär att det finns en viss osäkerhet i QIIME om det verkligen är familjen *Barnesiellaceae* eller om det kan vara en annan familj under ordningen *Bacteroidales*.

4.4 Cyanobacteria, YS2, RF39, Alcaligenaceae.

De förändringarna som sågs i dessa taxa var inte signifikanta, men kan ändå vara relevanta med tanke på att arbetet utgörs av ett stickprov. Här sågs ett P-värde mellan 0,06–0,08. Huruvida dessa förändringar är av intresse kan först ses när alla 39 försökspersoner analyserats, därför görs inga vidare spekulationer kring deras hälsoeffekter i detta arbete.

4.5 Intag av sötningsmedel i grupp 0.

En viktig aspekt att notera i detta arbete är att försökspersonernas intag av sötningsmedel i grupp 0 (baseline) inte är noterat. Försökspersonerna fick enbart uppmaningen att inte förändra sin kost under studiens gång. Detta innebär att om försökspersonerna i sin vanliga kost intar ett visst sötningsmedel som ingår i studien, så kan det ha påverkat resultatet. Till exempel, antag att försökspersonerna generellt får i sig mer av sötningsmedlet i grupp A. Då skulle också resultatet för grupp A vara ganska likt grupp 0 och underskatta eventuella effekter av sötningsmedel A.

4.6 Sötningsmedel grupp B starkast effekt

Resultaten tyder på att sötningsmedlet som användes i grupp B gav störst effekter på tarmfloran, medan sötningsmedel A inte verkade ge några större förändringar. Sötningsmedel C verkade också påverka tarmfloran, men inte lika mycket som sötningsmedlet i grupp B. Dock bör det åter poängteras att detta arbete utgörs av ett stickprov från en större studie, och att resultaten därför kan komma att ändras när alla prov analyserats.

5. Slutsats

De tre testade sötningsmedlen påverkar sammansättningen av tarmfloran. Störst effekt hade sötningsmedel B. Sötningsmedlen i grupp A och grupp C hade inte lika stora effekter på bakteriesammansättningen. Minst effekt hade sötningsmedlet i grupp A. Vilka konsekvenser förändringarna har är svåra att fastställa. Men med mer kunskap kring tarmbakteriers funktion för världens hälsa, blir sådana här förändringar allt mer intressant att studera. Troligen är förändringarna som sågs i denna studie av vikt för individens hälsa. Med tanke på resultaten bör de tre sötningsmedlens eventuella hälsoeffekter studeras vidare.

7. Referenser

1. Sylvetsky AC, Rother KI. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*. 2016 10/1/1 October 2016;164(Part B):446-50.
2. Livsmedelsverket. Sötningemedel [Internet]. 2016 [updated 2016-11-25; cited 2017-02-01]. Available from: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sotningsmedel/>.
3. Livsmedelsverket. Socker [Internet]. 2016 [updated 2016-10-10; cited 2017-02-07]. Available from: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/kolhydrater/socker/>.
4. Basmaa SS, Nevzat A, Mahmoud AA, Omar Fawzi A. Some alternative sweeteners (xylitol, sorbitol, sucralose and stevia): Review. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, Vol 4, Iss 1, Pp 63-70 (2014). 2014 (1):63.
5. Administration USFaD. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States [Internet]. 2015 [updated 2015-05-26; cited 2017-02-02]. Available from: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm>.
6. Nettleton JE, Reimer RA, Shearer J. Review: Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance? *Physiology & Behavior*. 2016 10/1/1 October 2016;164(Part B):488-93.
7. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
8. EFSA. Scientific Opinion on the safety evaluation of the substance, 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxide, sodium salt, CAS No. 128-44-9, for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 2012;10(3).
9. Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*. 2016;74(11):670-89.
10. Authority EFS. EFSA evaluates the safety of steviol glycosides [Internet]. 2010 [updated 2010-04-14; cited 2017-02-02]. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/ans100414>.
11. Deniņa I, Semjonovs P, Fomina A, Treimane R, Linde R. The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *Letters In Applied Microbiology*. 2014;58(3):278-84.
12. Livsmedelsverket. Stevia och steviaglykosider [Internet]. 2017 [updated 2017-01-17; cited 2017-02-02]. Available from: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sotningsmedel/stevia-och-steviolglykosider/>.
13. Koyama E, Kitazawa K, Ohori Y, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*. 2003 1/1/2003;41:359-74.
14. Livsmedelsverket. Aspartam [Internet]. 2016 [cited 2017-03-29]. Available from: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sotningsmedel/aspartam>.
15. Livsmedelsverket. Sukralos [Internet]. 2016 [cited 2017-03-29]. Available from: <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/tillsatser-e-nummer/sotningsmedel/sukralos>.

16. Food EPoFAaNSat. Safety of the proposed extension of use of sucralose (E 955) in foods for special medical purposes in young children. *EFSA Journal*. 2016;14(1):4361-n/a.
17. Sadava D, Hillis DM, Heller HC, Berenbaum MR. *Life, The Science of Biology*. 9nd ed. Sinauer Associates; 2011.
18. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics : Targets & Therapy*, Vol 2011, Iss default, Pp 71-86 (2011). 2011 (default):71.
19. Sankar SA, Lagier J-C, Pontarotti P, Raoult D, Fournier P-E. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015 6/1/June 2015;38:276-86.
20. Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. Basel: MDPI AG; 2015. p. 7493-519.
21. NCBI. Bacteria [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>.
22. NCBI. Euryarchaeota [Internet]. [cited 2017-03-21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=28890&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
23. Daly K, Darby AC, Shirazi-Beechey SP. Review: Low calorie sweeteners and gut microbiota. *Physiology & Behavior*. 2016 10/1/1 October 2016;164(Part B):494-500.
24. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010 01//;11(1):31.
25. Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation: Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System [Internet]. [cited 2017-02-20]. Available from: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.
26. Turnbaugh PJ, Stintzi A. *Human Health and Disease in a Microbial World*. 2011.
27. Hakansson A, Molin G. *Gut Microbiota and Inflammation*. Basel: MDPI AG; 2011. p. 637-82.
28. De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobbetti M. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2015:00-.
29. Anderson RL, Kirkland JJ. The effect of sodium saccharin in the diet on caecal microflora. *Food and Cosmetics Toxicology*. 1980 1980/01/01;18(4):353-5.
30. Chia CW, Shardell M, Tanaka T, Liu DD, Gravenstein KS, Simonsick EM, et al. Chronic Low-Calorie Sweetener Use and Risk of Abdominal Obesity among Older Adults: A Cohort Study. *PLoS ONE*. 2016 11/23//;11(11):1.
31. QIAGEN. QIAamp® DNA Stool Handbook - For DNA purification from stool samples [Internet]. 2012 [cited 2017-02-06]. Second Edition:[Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=e5f66d36-1f1c-4e89-828e-257088bdad53>].
32. International VWR. KIMAX® Solid Borosilicate Glass Beads, Kimble Chase [Internet]. [cited 2017-04-20]. Available from: <https://us.vwr.com/store/product/4541003/kimax-solid-borosilicate-glass-beads-kimble-chase>.

33. Invitrogen. Qubit® 2.0 Fluorometer [Internet]. 2010 [updated 2010-10-04; cited 2017-02-07]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp32866.pdf>.
34. ThermoFisher S. Qubit® dsDNA HS Assay Kit [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32851>.
35. ThermoFisher S. Qubit® Assay Tubes [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32856>.
36. QIAGEN. Buffer EB [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.qiagen.com/no/shop/lab-basics/buffers-and-reagents/buffer-eb/#orderinginformation>.
37. BIORAD. Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, semi skirted, clear/clear #HSL9601 [Internet]. [cited 2017-03-14]. Available from: <http://www.bio-rad.com/en-se/sku/hs19601-hard-shell-96-well-pcr-plates-low-profile-semi-skirted-clear-clear>.
38. Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2017-04-20]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/sweden.html>.
39. KAPABIOSYSTEMS. KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: https://www.kapabiosystems.com/assets/KAPA_HiFi_HotStart_ReadyMix_TD_S.pdf.
40. BIORAD. CFX96™ Real-Time Detection System [Internet]. 2017 [cited 2017-03-20]. Available from: <http://www.bio-rad.com/en-us/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system>.
41. BECKMANCOULTER LS. PCR Purification Agencourt AMPure XP [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <http://se.beckman.com/nucleic-acid-sample-prep/purification-clean-up/pcr-purification?i=A63881&geolocation=se>.
42. VWR. Horisontella elektroforesystem, kuroGEL Mini 6 [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: https://se.vwr.com/store/catalog/product.jsp?catalog_number=700-0015.
43. VWR. Electrophoresis power supplies, VWR® [Internet]. [cited 2017-02-04]. Available from: <https://se.vwr.com/store/product/20960990/electrophoresis-power-supplies-vwr>.
44. ThermoFisher S. TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (50X) [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B49?ICID=search-product>.
45. ThermoFisher S. Agarose I (Molecular Biology Grade) [Internet]. [cited 2017-03-06]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17852?ICID=search-product>.
46. ThermoFisher S. SYBR® Safe DNA Gel Stain [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S33102>.
47. ThermoFisher S. BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10816015?ICID=search-10816015>.
48. ThermoFisher S. 50 bp DNA Ladder [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10416014>.
49. Azure B. Azure c150 [Internet]. [cited 2017-02-24]. Available from: <https://www.azurebiosystems.com/imaging-systems/azure-c150/>.

50. Illumina. Nextera DNA Library Preparation Kit [Internet]. [cited 2017-04-20]. Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-dna.html>.
51. *Illumina*. TruSeq Custom Amplicon v1.5 [Internet]. [cited 2017-04-20]. Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-custom-amplicon.html>.
52. Illumina. Focused power on the MiSeq System [Internet]. [cited 2017-03-14]. Available from: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>.
53. Sodium hydroxide solution [Internet]. Analytics Shop; [cited 2017-03-14]. Available from: <http://www.analytics-shop.com/gb/fl319511-500ml-gb.html>.
54. Illumina. MiSeq Reagent Kits v2 [Internet]. [cited 2017-03-04]. Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/miseq-reagent-kit-v2.html>.
55. Illumina. PhiX Control v3 [Internet]. [cited 2017-03-14]. Available from: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/phix-control-v3.html>.
56. Illumina. MiSeq® Reagent Kit v2 Reagent Preparation Guide [Internet]. 2012 [cited 2017-03-14]. Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myillumina/cebfb8b82-b1d9-4384-a64b-002db4193cbe/miseqreagentkit_v2_reagentprepguide_15034097_b.pdf.
57. QIIME. QIIME [Internet]. 2015 [cited 2017-03-20]. Available from: <http://qiime.org/>.
58. NCBI. Proteobacteria [Internet]. [cited 2017-04-22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1224>.
59. Passel MWJv, Kant R, Zoetendal EG, Plugge CM, Derrien MMN, Malfatti SA, et al. The Genome of Akkermansia muciniphila, a Dedicated Intestinal Mucin Degradar, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. PLoS One. 2011;6(3).
60. Ottman N, Reunanen J, Meijerink M, Pietila TE, Kainulainen V, Klievink J, et al. Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function.(Research Article)(Report). PLoS ONE. 2017;12(3):e0173004.
61. Weir TL, Manter DK, Sheflin AM, Barnett BA, Heuberger AL, Ryan EP. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. PloS one. 2013;8(8):e70803.
62. NCBI. Lactobacillales [Internet]. [cited 2017-04-22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=186826&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
63. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by Lactobacillus plantarum IMAU10014. PLOS ONE. 2012;7(1):e29452.
64. NCBI. Ruminococcus [Internet]. [cited 2017-04-22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1263&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
65. Torres J, Bao X, Goel A, Colombel JF, Pekow J, Jabri B, et al. The features of mucosa-associated microbiota in primary sclerosing cholangitis. Aliment Pharmacol Ther. 2016 Apr;43(7):790-801.