

LIST OF PUBLICATIONS

The PhD thesis is based on the three following papers:

PAPER I Nicola Procházková, Gwen Falony, Lars O. Dragsted, Tine R. Licht, Jeroen Raes, Henrik M. Roager. Advancing human gut microbiota research by considering gut transit time. *Gut* 2023;**72**:180-191 doi:10.1136/gutjnl-2022-328166

PAPER II Nicola Procházková & Naomi Venlet, Mathias L. Hansen, Christian B. Lieberoth, Lars O. Dragsted, Martin I. Bahl, Tine R. Licht, Michiel Kleerebezem, Lotte Lauritzen, Henrik M. Roager. Effects of a wholegrain-rich diet on markers of colonic fermentation and bowel function, and their associations with the gut microbiome: a randomised controlled cross-over trial. *Frontiers in Nutrition* 2023;**10**:1187165 doi.org/10.3389/fnut.2023.1187165

PAPER III Nicola Procházková, Martin F. Laursen, Giorgia L. Barbera, Eirini Tsekitsidi, Malte S. Jørgensen, Morten A. Rasmussen, Jeroen Raes, Tine R. Licht, Lars O. Dragsted, Henrik M. Roager. Gut environmental factors explain variations in the gut microbiome composition and metabolism within and between healthy adults. (In preparation for *Cell Host & Microbe*)

I have also contributed to the following paper during my PhD:

Jos Boekhorst, Naomi Venlet, Nicola Procházková, Mathias L. Hansen, Christian B. Lieberoth, Martin I. Bahl, Lotte Lauritzen, Oluf Pedersen, Tine R. Licht, Michiel Kleerebezem, Henrik M. Roager. Stool energy density is positively correlated to intestinal transit time and related to microbial enterotypes. *Microbiome* **10**, 223 (2022). doi:10.1186/s40168-022-01418-5

SUMMARY

Background: Human gut microbiome research has grown over the past 15 years and the scientific society has identified numerous factors that affect gut microbiota composition. Among these, diet, demographics and medication are commonly acknowledged. Yet, gut environmental factors such as transit time and pH are often overlooked despite the existing links to the human gut microbiome composition. Moreover, the current knowledge of the role of gut environmental factors on gut microbial metabolism in humans is limited.

Objective: Thus, the overall objective of this PhD thesis was to explore the possible links between gastrointestinal transit time and pH, and diet-microbiota interactions in humans.

Methods: This was achieved through 1) reviewing the current body of scientific evidence linking gastrointestinal transit time to the gut microbiota composition and metabolism (**Paper I**), 2) investigating the effects of whole-grain vs refined-grain diets on markers of colonic fermentation and bowel function, and how these markers associated with the faecal microbiome in a cross-over intervention trial (**Paper II**), and 3) by conducting a 9-day human study to explore associations between segmental transit times and pH, other gut environmental factors and diet-microbiota interactions in healthy volunteers using multi-omics approach (**Paper III**).

Results: Firstly, in **Paper I**, which is the first comprehensive review of the links between gut transit time, microbiota composition and metabolism, we found rather strong evidence that gut transit time varies between and within individuals and that these differences are linked to human gut microbiome composition in several cases. In contrast, based on the review, little evidence exists on the relation between the intra- and inter-individual variations in gut transit time and pH, and gut microbial metabolism.

Furthermore, in **Paper II** we found that a whole-grain diet led to an increased microbial saccharolysis reflected by higher levels of faecal butyrate and caproate as well as to an increased stool frequency when compared to the refined-grain diet, emphasising that whole grains can modulate gut microbial metabolism and bowel habits. Moreover, faecal microbiota composition was associated with colonic transit time, faecal pH, and stool energy density indicating that differences in gut environmental factors are coupled to variations in the faecal microbiome.

Lastly in **Paper III**, we demonstrated that colonic transit time and pH and their respective proxy markers (stool moisture, faecal pH) significantly contributed to the intra- and inter-individual variations in the urine metabolome and/or faecal microbiome in healthy Danish adults. In particular, colonic transit time and stool moisture explained 6.2 % and 3.1 % of the inter- and intra-individual variation in the urine metabolome, respectively, while pH in the distal colon and faecal

SUMMARY

pH explained 5 % and 2.5 % of the inter- and intra-individual variations in the faecal microbiome, respectively, which has not been shown before. Importantly, we observed large day-to-day fluctuations in many microbial-derived metabolites measured in breath, urine, and faeces including microbial saccharolytic (short-chain fatty acids) and proteolytic products (branched-chain fatty acids, indoxyl-sulphate, p-cresol sulphate, phenylacetylglutamine, and other aromatic amino acid-derivatives) over the 9 days of the study. While shorter transit time was associated with higher faecal concentrations of short-chain fatty acids, longer transit time was associated with increased abundance of microbial proteolytic metabolites as well as faecal dicarboxylic acids, and breath methane. Remarkably, a higher daily intake of dietary fibres was associated with lower levels of many of the proteolytic metabolites including the uremic toxin p-cresol sulphate suggesting that fibres can regulate microbial proteolysis.

Conclusion: In summary, this thesis demonstrates that transit time and pH within the gastrointestinal tract are important determinants not only of the faecal microbiome composition but importantly of the gut microbial metabolism. Regional interactions between microbes, metabolites, and transit time and pH along the gastrointestinal tract remain to be elucidated, nonetheless, inter-individual differences in the gut environment may contribute to individualized gut microbiota compositions and microbiome-responses to foods.

RESUMÉ (Danish summary)

Baggrund: Igennem de sidste 15 år er forskning i menneskets tarmmikrobiom blevet intensivert, da mikrobiomet i stigende grad er blevet koblet til vores sundhed. En række faktorer er blevet identificeret som værende afgørende for sammensætningen af tarmens mikrobiom. Blandt disse er kost, demografi og medicin almindeligt anerkendt. Tarmmiljøfaktorer som transittid og pH er dog i modsætning ofte blevet negligeret på trods af deres potentielle væsentlige betydning for tarmmikrobiomet. Derfor er vores nuværende viden om betydningen af disse tarmmiljøfaktorer for tarmens mikrobielle sammensætning og aktivitet hos mennesker stadig mangelfuld.

Formål: Det overordnede formål med denne ph.d.-afhandling var at undersøge de mulige sammenhænge mellem tarmens transittid og pH i relation til interaktionerne mellem kost og mikrobiota hos mennesker.

Metoder: Dette blev opnået gennem 1) gennemgang af den nuværende videnskabelige litteratur om betydningen af tarmens transittid for tarmmikrobiotens sammensætning og aktivitet (**artikel I**), 2) undersøgelse af effekterne af en fuldkornskost i forhold til en raffineret korn på markører for fermenteringen i tyktarmen og tarmfunktionen, samt en undersøgelse af hvordan disse markører er relateret til tarmmikrobiomet i et overkrydsnings-interventionsforsøg (**artikel II**) og endelig 3) at udføre et 9-dages forsøg med raske danskere for at udforske sammenhænge mellem segmentelle transittider og pH, andre tarmmiljøfaktorer og kost-mikrobiota interaktioner ved hjælp af multiomics-metoder (**artikel III**).

Resultater: For det første fandt vi i **artikel I**, som er den første omfattende gennemgang af sammenhængen mellem transittid, mikrobiotasammensætning og aktivitet, at transittiden varierer mellem individer og kan variere indenfor det samme individ henover tid. Endvidere fandt vi konsistent evidens for, at disse forskelle er forbundet med sammensætningen af menneskets tarmmikrobiom. Dog er der kun begrænset viden på, hvordan intra- og inter-individuelle variationer i tarmtransittid og pH er koblet med interaktioner mellem menneskets kost, mikrobiota og stofskifte.

I **artikel II** viste vi, at en fuldkornskost førte til en øget mikrobiel kulhydrat fermentering (saccharolyse) afspejlet ved et højere niveau af fækal butyrat og caproat. Desuden gav en fuldkornskost en øget afføringsfrekvens sammenlignet med den raffinerede korndiæt. Dette understreger, at fuldkorn kan påvirke både afføringsvaner og tarmens mikrobielle metabolisme. Derudover var sammensætning af tarmmikrobiota forbundet med transittid i tyktarmen, fækal pH og afføringens energitæthed, hvilket indikerer, at forskelle i tarmmiljøfaktorer er koblet til variationer i tarmmikrobiomet.

RESUMÉ (Danish summary)

Endelig viste vi i **artikel III**, at transittid og pH samt deres proxy-markører (fæces vandindholdet, fækal pH) bidrog signifikant til intra- og inter-individuelle variationer i urin metabolomet og/eller tarmmikrobiomet hos raske danske voksne. Især tyktarmspassagetiden og fæces vandindholdet forklarede henholdsvis 6,2 % og 3,1 % af den inter- og intra-individuelle variation i urin metabolomet, mens pH distalt i tyktarmen og pH i fæces forklarede 5 % og 2,5 % af henholdsvis inter- og intra-individuelle variationer i det tarmmikrobiom, hvilket ikke tidligere er blevet beskrevet. En vigtig observation i dette studie var desuden, at vi observerede store daglige udsving i mange mikrobielt-afledte metabolitter målt i udåndingen, urin og fæces. Dette inkluderede både saccharolytiske (kortkædede fedtsyrer) og proteolytiske molekyler (forgrenede kortkædede fedtsyrer, indoxylsulfat, p-cresolsulfat, phenylacetylglutamin og andre aromatiske aminosyrederivater). Mens kortere transittid var forbundet med højere niveauer af kortkædede fedtsyrer i fæces, var længere transittid forbundet med højere niveauer af mikrobielle proteolytiske metabolitter i både urin og fæces, øgede niveauer af dicarboxylsyrer i fæces, samt højere niveauer af metan i udåndingen. Bemærkelsesværdigt var det, at et højere dagligt indtag af kostfibre var forbundet med lavere niveauer af en række proteolytiske metabolitter, herunder det uremiske toksin p-cresolsulfat, hvilket kunne tyde på, at kostfibre kan regulere mikrobiel proteolyse i tyktarmen.

Konklusion: Sammenfattende viser afhandlingen, at transittid og pH i mave-tarmkanalen er vigtige faktorer, der påvirker både sammensætningen af tarmmikrobiomet og kost-mikrobiota interaktioner. De regionale interaktioner mellem kost, tarmbakterier, transittid og pH langs mave-tarmkanalen mangler dog at blive belyst. Ikke desto mindre er den viden, som er generet i denne afhandling fundamental for forskningsfeltet, da resultaterne indikerer, at forskelle i tarmmiljøet kan bidrage til at forstå variationer i sammensætningen og aktiviteten af tarmmikrobiotaen, hvilket kunne være en nøgle til at forstå, hvorfor vi reagerer forskelligt på maden vi spiser.

ABSTRAKT (Czech summary)

Úvod: Výzkum lidského střevního mikrobiomu se za posledních 15 let rozrostl a dnes již víme, že složení lidského střevního mikrobiomu závisí na mnoha faktorech. Mezi něž patří především stravovací návyky, demografické faktory a užívání léků. Nicméně existují také spojitosti mezi faktory definujícími střevní prostředí jako jsou pH a tranzitní doba, a složením střevního mikrobiomu, které jsou často opomíjeny. Navíc o tom jakou roli hrají tyto faktory v produkci metabolitů (malých molekul) střevními bakteriemi toho víme jen velmi málo.

Cíl: Právě proto bylo cílem této disertační práce najít možné spojitosti mezi střevní tranzitní dobou a pH, a složením a metabolismem lidského střevního mikrobiomu.

Metody: Toho bylo dosaženo 1) prostřednictvím literární rešerše současných vědeckých studií zabývajících se spojitostmi mezi střevní tranzitní dobou a střevním mikrobiomem (**Článek I**), 2) zkoumáním účinků celozrnných obilovin versus rafinovaných obilovin na střevní funkci a fermentaci v randomizované zkřížené studii (**Článek II**) a 3) zkoumáním vztahů mezi stravou, tranzitní dobou a pH v tenkém a tlustém střevě, a střevním mikrobiomem v 9denní studii se zdravými dobrovolníky (**Článek III**).

Výsledky: Za prvé, v **Článku I**, který poskytuje první rozsáhlý přehled na toto téma, jsme našli poměrně mnoho důkazů, že střevní tranzitní doba se liší nejen mezi jednotlivci ale také v čase, a že tyto rozdíly jsou spojeny s rozdíly ve střevním mikrobiomu. Naopak, na základě naší rešerše, existuje jen málo poznatků o tom, jak tranzitní doba a pH souvisí s metabolismem střevních bakterií. Dále jsme v **Článku II** zjistili, že celozrnná strava vedla k vyšším koncentracím butyrátu (důležitý zdroj energie pro výstelku střevních buněk) ve stolici a zvýšené frekvenci defekace v porovnání s rafinovanou stravou. Tyto výsledky tak zdůrazňují důležitost celozrnné stravy pro zdravou funkci střeva. Dále bylo zjištěno, že střevní mikrobiom byl zásadně ovlivněn tranzitní dobou, pH a hustotou energie ve stolici, což poukazuje na to, že střevní prostředí určuje složení mikrobiomu. Nakonec jsme v **Článku III** prokázali, že tranzitní doba a pH v tlustém střevě mají vliv na to, jaké bakterie a metabolity se nacházejí ve stolici a v moči u zdravých dánských jedinců, což doposud nebylo prokázáno. Zatímco kratší tranzitní doba byla spojena s vyššími koncentracemi prospěšných krátkých nasycených mastných kyselin ve stolici, delší tranzitní doba byla spojena se zvýšenou hladinou toxických mikrobiálních latek v moči.

Závěr: Tato disertační práce celkově dokazuje, že střevní tranzitní doba a pH jsou důležitými faktory, které ovlivňují nejen složení ale také metabolismus střevního mikrobiomu s vlivem na naše zdraví.

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION AND OBJECTIVES	1
1.1. Introduction and motivation for the PhD thesis	1
1.2. Objectives	2
2. BACKGROUND	3
2.1. Gut microbiota.....	3
2.2. Gastrointestinal tract and its microbial residents	4
2.3. Gastrointestinal transit time and pH	5
2.3.1. Transit time assessment	8
2.4. Gut microbial metabolism	9
2.4.1. Short-chain fatty acids	9
2.4.2. Intestinal gases.....	10
2.4.3. Microbial-derived metabolites of polyphenols	11
2.4.4. Microbial-derived metabolites of proteins.....	12
2.4.5. Microbial-derived metabolites of lipids.....	13
2.4.6. Microbial-derived vitamins	14
2.5. Factors affecting gut microbial metabolism.....	15
2.5.1. Effects of diet on the gut microbiome	15
2.5.2. Effects of dietary fibres and whole grains on the gut microbial metabolism.....	16
2.5.3. Effects of gut transit time and pH on the gut microbial metabolism	17
2.6. Strategies for studying gut microbial metabolism	19
2.6.1. Microbiome profiling.....	19
2.6.2. Metabolomics	20
2.6.3. Breath analyses	23
2.7. Human diet-microbiome study design.....	23
3. METHODS	25
3.1. Study designs	25
3.2. Assessment of gastrointestinal transit time and pH using SmartPill	29
3.3. Statistical methods to explore the effects of gut environmental factors on the gut microbiome and metabolomes	31
3.4. Strategies to identify metabolites linked to gut environmental factors.....	32

Table of Contents

4. SUMMARY OF THE RESULTS34

4.1. Paper I 34

4.2. Paper II..... 39

4.3. Paper III 43

4.4. Other results 52

4.4.1. Associations between metabolites, gut microbiota, and gut environmental factors 52

4.4.2. Transit time and pH differ between genders 54

4.4.3. Uremic toxin levels differ between vegetarians and non-vegetarians..... 55

4.4.4. Comparisons of various transit time assessments 57

5. DISCUSSION59

5.1. The role of gut environment for gut microbial metabolism..... 59

5.2. Transit time – a possible confounder in microbiome studies..... 61

5.3. The interplay between whole grains, fibres and colonic fermentation 62

5.4. Are the various transit time assessments comparable? 64

5.5. Strengths and limitations 65

6. CONCLUSION..... 66

7. PERSPECTIVES 68

8. REFERENCES 70

9. APPENDICES 89

PAPER I

PAPER II

PAPER III

SUPPLEMENTARY MATERIALS