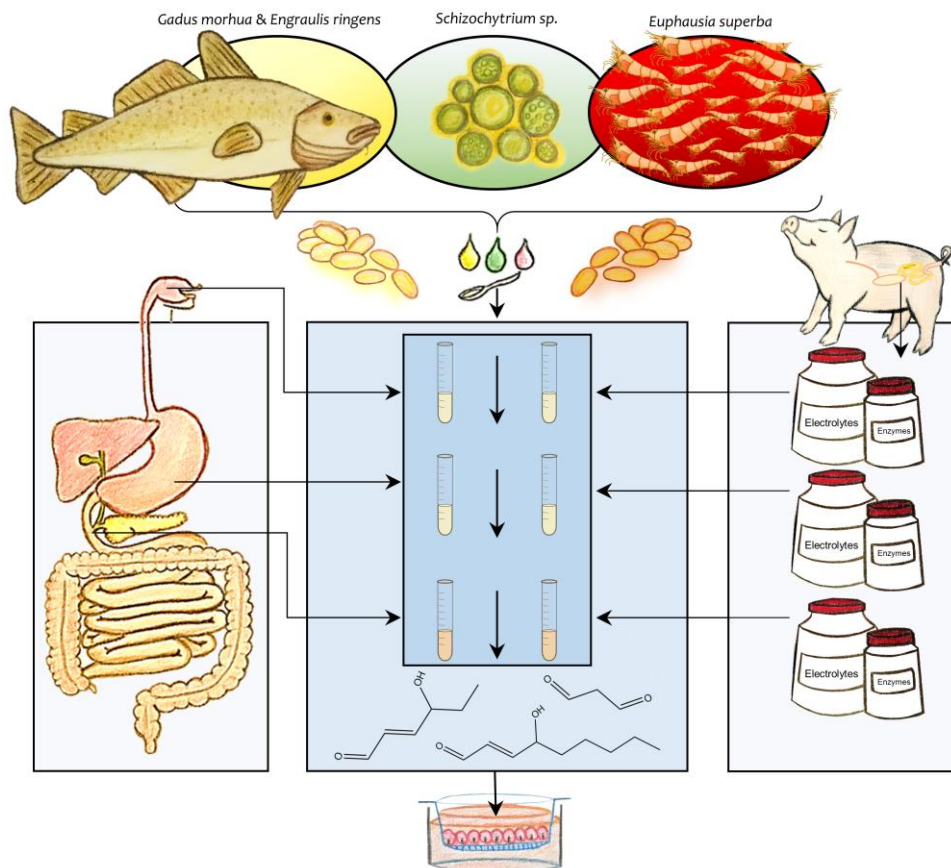




CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



Oxidation of marine oils during *in vitro* gastrointestinal digestion and its effects on stress in human intestinal Caco-2 cells

CECILIA TULLBERG

Food and Nutrition Science Department of Biology and Biological Engineering
CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
Gothenburg, Sweden 2018

ABSTRACT

Marine oils are attracting public interest due to the preventive effects, e.g., on inflammation, which are linked to the long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFAs). However, LC n-3 PUFAs are highly susceptible to oxidation, which could interfere with their positive effects. It has been shown *in vitro* that marine lipids not only oxidize during storage, but also during gastrointestinal (GI) digestion. Little is so far known about the marine lipid oxidation reaction under human GI conditions.

In this work, oxidation of marine oils during *in vitro* GI digestion was investigated targeting the highly reactive lipid oxidation products malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-*trans*-2-hexenal (HHE), and 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal (HNE); all three with documented carcinogenic and genotoxic properties. Variables studied during the digestions were; source of the GI-fluids (porcine/human), presence of additional gastric lipase (from rabbit) or addition of a lipase inhibitor, type of *in vitro* model (static/dynamic), physical status (bulk/emulsified), oxidation status and origin of the marine oil, as well as additions of food-derived pro- and antioxidants. Furthermore, effects from marine oil digests related to intestinal cell stress were studied.

Aldehyde levels increased over time in the intestinal phase during digestion of cod liver oil, in a static *in vitro* digestion model with human digestive fluids (HDF) or simulated digestive fluids (SDF, i.e., electrolyte solution with enzymes and bile of porcine origin). The highest aldehyde levels were reached during the intestinal phase (t=210 min) using HDF (60 μ M of MDA, 0.96 μ M of HHE, and 1.6 μ M of HNE). In the static model with HDF, lipolysis was found to correlate positively to lipid oxidation, as shown when adding rabbit gastric lipase or orlistat, a lipase inhibitor, to cod liver oil. Aldehydes also increased during digestion of cod liver oil in a dynamic digestion model (tiny-TIM) with SDF. Cod liver oil having a higher degree of oxidation at start of the digestion reached higher levels of aldehydes during GI conditions compared to non-oxidized oils. Pre-emulsification of cod liver oil was slightly protective in the gastric phase, but had a pro-oxidative effect during the intestinal phase. Addition of fish hemoglobin (Hb) as a pro-oxidant to emulsified cod liver oil strongly promoted aldehyde formation, while the metal chelator EDTA had a protective effect during gastric digestion. Industrially relevant levels of tocopherols (α -tocopherol, and Covi-ox[®] T 70 EU; 4.5 mg/g oil) were protective to cod liver oil oxidation in the static *in vitro* digestion model with HDF. In the same model, detected aldehyde levels in intestinal digests from four different marine oils were ranked as: cod liver oil ~ whole fish oil >> krill oil ~microalgae oil.

To study cellular effects of GI oxidation, a cultured human intestinal epithelium (Caco-2 cell line) was treated with cod liver-, fish-, and algae oil digests, and corresponding levels of pure MDA and HHE (0-90 μ M). Cell viability was not affected by the digests, nor their levels of MDA and HHE. Stress-related proteins were not found to increase upon exposure to digests or aldehydes, rather the opposite.

To summarize, MDA, HHE, HNE were formed during *in vitro* GI digestion of marine oils in all the models tested; absolute levels were, however, affected by pre-treatment of the oils, and were higher with HDF than SDF. Although bulk oils digested without added pro- or antioxidants did *not* induce a stress response in the Caco-2 cells, studies in humans are needed to be able to say if the absence of stress effects from aldehydes or other oxidation products can be translated to *in vivo* conditions.

Keywords: lipid oxidation, marine oils, LC n-3 PUFAs, *in vitro* digestion, human digestive fluids, gastrointestinal, aldehydes, MDA, HHE, HNE, Caco-2 cells

SAMMANFATTNING

Allmänhetens intresse för omega-3-fettsyror ("omega-3") från fisk har ökat de senaste åren på grund av de positiva hälsoeffekter som de associeras med, exv. hämmande av inflammation. De omättade omega-3-fettsyrorna är dock känsliga för oxidation – i folkmun härskning – vilket kan leda till försämrad lukt och smak hos omega-3-rika produkter. Det kan även bildas reaktiva härskningsprodukter, som aldehyder, vilka kan reagera med proteiner och DNA, vilket skulle kunna vara skadligt. Detta innebär att långt gången härskning skulle kunna motverka fördelarna med marina omega-3-fettsyror. Tidigare studier har visat att marina oljor inte bara härsknar under lagring, utan även under matsmältningen. Miljön i mage och tarm tycks dessutom öka risken för härskning – hur och i vilken grad är dock ännu oklart.

I denna avhandling undersöktes härskningsprocessen när olika typer av omega-3-rika marina oljor spjälkas under matsmältnings-betingelser. Vi undersökte också hur man kan motverka sådan härskning så att de värdefulla omega-3-fettsyrorna bevaras hela vägen fram till tarmen där de tas upp. I en studie undersöktes också hur härskningsprodukterna som bildats påverkar stress hos tarmceller. Ett stort fokus har lagts vid att hitta en modell för att studera fetthärskning under matspjälkningsprocessen som är relevant för humana förhållanden. För att skapa betingelser för matsmältning används vanligtvis simulerad matsmältningssaft (SDF) baserad på enzym och gallsalter från djur. I denna avhandling har främst humana matsmältningssafter (HDF) använts, vilket ökar jämförbarheten med humana förhållanden.

I våra studier följdes halten reaktiva aldehyder (MDA, HHE och HNE) som markörer för härskning under simulerad matsmältning av olika marina oljor. Variabler som undersöktes var; typ av matsmältningssväska (human/simulerad), typ av matsmältningssmodell (statisk/dynamisk), tillsats av externt maglipas (från kanin) och tillsats av lipashämmare (orlistat), fysisk status hos oljorna (bulkolja, emulsion), oljornas härskningsgrad, oljeursprung och tillsatts av pro- och antioxidanter.

Vid jämförelse av matsmältningssmodeller såg vi att torskleverolja härsknade mer under matsmältning när HDF används än när vi använde SDF, vilket inte tidigare studerats. Emulgering av oljan hade en något skyddande effekt under matsmältningen i mage, men ökade härskningen i tarmen. Vidare spelade lipolys, d.v.s. spjälkning av fettmolekylerna, en viktig roll – tillsats av lipashämmare gav minskad härskning. När fiskhemoglobin blandades i oljan ökade koncentrationerna av aldehyder kraftigt. Torskleverolja som redan hunnit härskna före intag gav upphov till högre halter av härskningsprodukter under matsmältningen, jämfört med färsk olja. Att tillsätta antioxidanten tokoferol i industriellt relevanta mängder till färsk torskleverolja hade däremot en skyddande effekt. En mix av olika tokoferoler var mer effektiv jämfört med endast α -tokoferol. Avhandlingen visade också att oljor från olika källor (torsklever, fisk, krill och mikroalger), var olika känsliga för härskning. Torskleverolja och fiskolja gav högst halter av aldehyder, medan krillolja och algolja var stabilare. Härskning av marina oljor skedde främst under tarmbetingelser i alla matsmältningssmodeller som användes.

Även cellulärt intressanta upptäckter gjordes. En human tarmcellinje (Caco-2) utsattes för tarmsaft innehållande spjälkade marina oljor (torsklever-, fisk- och algolja), samt för motsvarande nivåer av rena aldehyder. Cellöverlevnad påverkades varken av exponering för tarmsaft med härsken olja, eller för rena aldehyder. Dessa behandlingar gjorde inte heller att nivåerna av stressrelaterade protein ökade - snarare tvärtom.

Denna avhandling visar att formulering av marina oljor spelar en stor roll för dess stabilitet mot härskning under matsmältningen. Även om färsk torskleverolja utan tillsatser inte inducerade en stressrespons i humana tarmceller, så behövs nya studier för att studera om aldehyder eller andra härskningsprodukter påverkar cellerna i tarmen i människa.